

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Ana LAZAR

**VLOGA GENOV, VKLJUČENIH V SIGNALIZACIJSKO POT
PROTEINSKIH KINAZ, PRI OKUŽBI KROMPIRJA (*Solanum
tuberosum* L.) S KROMPIRJEVIM VIRUSOM Y**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**FUNCTION OF PROTEIN KINASE GENES IN SIGNALLING OF
POTATO (*Solanum tuberosum* L.) RESPONSE TO POTATO VIRUS
Y INFECTION**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2014

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa 31. seje Komisije za doktorski študij Univerze v Ljubljani z dne 19. 9. 2012 (po pooblastilu Senata Univerze z dne 20. 1. 2009) je bilo potrjeno, da kandidatka izpolnjuje pogoje za opravljanje doktorata znanosti na Interdisciplinarnem doktorskem študijskem programu Bioznanosti, znanstveno področje biotehnologije. Za mentorico je bila imenovana prof. dr. Jana Žel ter za somentorico prof. dr. Kristina Gruden.

Doktorsko delo je potekalo na Oddelku za biotehnologijo in sistemsko biologijo Nacionalnega inštituta za biologijo (NIB) v Ljubljani. Kloniranje nekaterih genov in začetne eksperimente s konfokalno mikroskopijo smo opravili na Inštitutu za biokemijo in biofiziko, v Laboratoriju za rastlinsko patogenezo v Varšavi na Poljskem. Analize s konfokalnim mikroskopom smo opravili na Kemijskem inštitutu. Raziskovalno delo je financirala Javna agencija za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije (P4-0165 in J1-4268).

Komisija za oceno in zagovor:

- Predsednica: prof. dr. Branka JAVORNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za
agronomijo
- Članica: prof. dr. Jana ŽEL
Ljubljana, Nacionalni inštitut za biologijo
- Članica: prof. dr. Kristina GRUDEN
Ljubljana, Nacionalni inštitut za biologijo
- Član: prof. dr. Borut ŠTRUKELJ
Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo

Datum zagovora: 14. 10. 2014

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.

Ana Lazar

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dd
DK 633.491:632.38(043.3)=163.6
KG krompir/*Solanum tuberosum*/PVY/MAPK/preobčutljivostni odgovor
AV LAZAR, Ana, univ. dipl. biologinja
SA Žel, Jana (mentorica)/GRUDEN, Kristina (somentorica)
KZ SI-1000, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni doktorski študij
Bioznanosti, znanstveno področje: biotehnologija
LI 2014
IN VLOGA GENOV, VKLJUČENIH V SIGNALIZACIJSKO POT
PROTEINSKIH KINAZ, PRI OKUŽBI KROMPIRJA (*Solanum tuberosum* L.)
S KROMPIRJEVIM VIRUSOM Y
TD Doktorska disertacija
OP XIV, 101 str., 5 pregl., 33 sl., 2 pril., 203 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Z metodami funkcijske genomike smo ovrednotili vlogo z mitogeni aktiviranih proteinskih kinaz (MAPK) v odzivu netransgenega krompirja sorte Rywal (preobčutljivostni odziv) in transgenega NahG-Rywala (okvarjena sinteza salicilne kisline) na okužbo s krompirjevim virusom Y (PVY). Signalizacija MAPK je eden ključnih regulatorjev odziva rastline na napad patogenov. Sproži se po principu kaskade, v kateri so aktivirane tri kinaze, rezultat pa je aktivacija obrambnih genov in proteinov. Negativni regulatorji kaskade so fosfataze MAPK. Prikazali smo filogenetske odnose krompirjevih MAPK in ortologov modelne rastline *A. thaliana* in ugotovili slabšo zastopanost teh genov v krompirju. Rezultati izražanja genov netransgenega krompirja sorte Rywal in transgenega NahG-Rywala po okužbi s PVY kažejo tri različne vzorce izražanja, najpogosteje imajo geni v primerjavi s kontrolami v krompirju sorte Rywal nižje, v krompirju NahG-Rywal pa višje izražanje. Za nadaljnje funkcijske analize smo izbrali tri diferencialno izražene gene: MAPK kinazo 6 (*MKK6*), MAPK (z ranitvijo inducirana proteinska kinaza, *WIPK*) in fosfatazo MAPK 1 (*MKPI*). Preučevali smo tudi vpliv virusa PVY na lokalizacijo izbranih treh proteinov. Ugotovili smo, da se protein MKK6 pod kontrolo nativnega promotorja ob okužbi s PVY nakopiči v jedru. Z metodo BiFC (bimolekularna fluorescenčna komplementacija) nismo našli potencialnih substratov proteina StMKK6. Vpliv utišanja gena StWIPK s prehodno transformacijo rastline *S. venturii* na hitrost širjenja fluorescenčno označenega virusa ni vplival.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd
DC 633.491:632.38(043.3)=163.6
CX potato/*Solanum tuberosum*/PVY/MAPK/hypersensitive response
AU Lazar, Ana
AA ŽEL, Jana (supervisor)/GRUDEN, Kristina (co-supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Interdisciplinary doctoral programme Biosciences, scientific field: Biotechnology
PY 2014
TI FUNCTION OF PROTEIN KINASE GENES IN SIGNALLING OF POTATO (*Solanum tuberosum* L.) RESPONSE TO POTATO VIRUS Y INFECTION
DT Doctoral Dissertation
NO XIV, 101 p., 5 tab., 33 fig., 2 ann., 203 ref.
LA sl
AL sl/en
AB We evaluated role of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) in response of non-transgenic potato cv. Rywal (hypersensitive resistance) and transgenic NahG-Rywal (salicylic acid deficient) to *Potato virus Y* (PVY) infection, using functional genomics approaches. MAPK signalling is one of the key regulators of plant response to pathogen attack. It is triggered in a form of a cascade, where three kinases are sequentially phosphorylated, which results in activation of defence genes and proteins. Negative regulators of the cascade are MAPK phosphatases. We analysed phylogenetic relationship of potato MAPKs in comparison to the model plant species *A. thaliana* and observed poorer representation of MAPKs in potato. The expression results of the non-transgenic potato cv. Rywal and transgenic NahG-Rywal in defence response against PVY show three different expression patterns. Most commonly, the genes are repressed in Rywal and induced in NahG-Rywal. We selected three differentially expressed genes for further functional analysis: MAP kinase kinase 6 (*MKK6*), MAP kinase (wound-induced protein kinase, *WIPK*) and MAP kinase phosphatase 1 (*MKPI*). Protein StMKK6, under the control of its native promoter, accumulated in nucleus after the infection. Using bimolecular fluorescent complementation (BiFC), we did not find any substrates of StMKK6 protein. Additionally, silencing of StWIPK in the transiently transformed plants of *S. venturii* did not have any effect on the spread of the GFP-marked PVY.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VIII
KAZALO SLIK.....	IX
KAZALO PRILOG	XI
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XII
1 UVOD.....	1
1.1 CILJI DOKTORSKE NALOGE.....	2
1.2 HIPOTEZE.....	2
2 PREGLED OBJAV.....	4
2.1 DRUŽINA PROTEINSKIH KINAZ.....	4
2.1.1 MAPK	5
2.2 FOSFATAZE MAPK	6
2.3 RASTLINSKI IMUNSKI SISTEM.....	7
2.4 SALICILNA KISLINA.....	9
2.5 MAPK VKLJUČENE V RASTLINSKI OBRAMBNI SISTEM.....	10
2.6 KROMPIRJV VIRUS Y	13
2.6.1 Odziv rastline na okužbo s PVY	14
3 MATERIALI IN METODE.....	15
3.1 ANALIZA PODATKOVNIH BAZ.....	15
3.1.1 Analiza rezultatov ekspresijskih mikromrež v odzivu na okužbo s PVY 15	
3.1.2 Analiza rezultatov izražanja izbranih genov iz baz »The eFP browser« in »Genevestgator«.....	15
3.1.3 Filogenetska analiza	15
3.2 POMNOŽEVANJE IZBRANIH GENOV	16
3.2.1 Konstruiranje začetnih oligonukleotidov.....	16
3.2.2 Verižna reakcija s polimerazo (PCR).....	18
3.2.2.1 Gelska elektroforeza	20
3.2.2.2 Čiščenje produktov PCR.....	20
3.3 PCR V REALNEM ČASU (qPCR)	20
3.4 KLONIRANJE IZBRANIH GENOV	22
3.4.1 Kloniranje v plazmid pJET1.2.....	22
3.4.2 Kloniranje v vstopna plazmida Gateway.....	22
3.4.3 Transformacija bakterije <i>Escherichia coli</i>	24

3.4.4	Izolacija plazmidov in sekvenciranje	24
3.4.5	Kloniranje v ekspresijske plazmide za študij lokalizacije in interakcij...25	25
3.4.6	Kloniranje v ekspresijski plazmid za študij utišanja gena <i>StWIPK</i> z metodo VIGS	27
3.4.7	Transformacija bakterije <i>Agrobacterium tumefaciens</i> z ekspresijskimi plazmidi.....	28
3.5	RASTLINSKI MATERIAL ZA FUNKCIJSKE ANALIZE GENOV	29
3.5.1	Priprava krompirjev sorte Rywal za analizo izražanja genov z mikromrežami	29
3.5.2	Priprava rastlin vrste <i>N. benthamiana</i> in vrste <i>S. venturii</i> za funkcijsko analizo genov s prehodno transformacijo	30
3.5.2.1	Priprava rastlin vrste <i>N. benthamiana</i> za preučevanje lokalizacije izbranih proteinov in za preučevanje interakcij	30
3.5.2.2	Priprava rastlin vrste <i>N. benthamiana</i> in <i>S. venturii</i> za preučevanje vpliva utišanja gena <i>StWIPK</i> (VIGS).....	31
3.5.3	Konfokalna mikroskopija	33
4	REZULTATI	34
4.1	ANALIZA REZULTATOV IZ PODATKOVNIH BAZ.....	34
4.1.1	Diferencialno izražene krompirjeve MAPK, MKK in MKP v preobčutljivostnem odzivu na PVY	34
4.1.2	Potrditev rezultatov mikromrež za gene <i>StMKK6</i> , <i>StWIPK</i> in <i>StMKP1</i> s qPCR.....	36
4.1.3	Izražanje krompirjeve družine <i>MKK</i> ter genov <i>StWIPK</i> in <i>StMKP1</i> v različnih tkivih in v odzivu na stres.....	36
4.2	SEKVENČNA ANALIZA DRUŽIN MKK, MAPK IN MKP V KROMPIRJU	39
4.2.1	Analiza družine MKK v krompirju	39
4.2.2	Analiza družine MAPK v krompirju	40
4.2.3	Analiza družine dvojno specifičnih fosfataz v krompirju	42
4.3	SEKVENČNA ANALIZA IZOLIRANIH GENOV <i>StMKK6</i> , <i>StWIPK</i> IN <i>StMKP1</i>	42
4.3.1	Analiza gena <i>StMKK6</i>	42
4.3.1.1	Ortologi gena <i>StMKK6</i> v rastlinskem kraljestvu	43
4.3.2	Analiza gena <i>StWIPK</i>	45
4.3.3	Analiza gena <i>StMKP1</i>	47
4.4	SEKVENČNA ANALIZA PROMOTORJEV GENOV <i>StMKK6</i> , <i>StWIPK</i> IN <i>StMKP1</i>	49
4.4.1	Promotor gena <i>StMKK6</i>	49

4.4.2	Promotor gena <i>StWIPK</i>	50
4.4.3	Promotor gena <i>StMKP1</i>	51
4.5	SUBCELIČNA LOKALIZACIJA PROTEINOV <i>StMKK6</i> , <i>StWIPK</i> IN <i>StMKP1</i>	51
4.6	INTERAKCIJE <i>MKK6</i> IN <i>MAPK</i>	56
4.7	Z VIRUSOM INDUCIRANO UTIŠANJE GENA <i>StWIPK</i> (VIGS).....	61
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	65
5.1	RAZPRAVA	65
5.1.1	Krompir ima v primerjavi z modelno rastlino <i>A. thaliana</i> manj predstavnikov <i>MAPK</i>.....	65
5.1.2	Geni <i>StMKK6</i>, <i>StWIPK</i> in <i>StMKP1</i> so vključeni v odziv na ranitev.....	67
5.1.3	Med okužbo s PVY se v krompirju sproži več kaskad <i>MAPK</i>.....	69
5.1.3.1	Gena <i>StWIPK</i> in <i>StMKP1</i> v odzivu na PVY	69
5.1.3.2	Gen <i>StMKK6</i> v odzivu na PVY	71
5.1.4	Geni <i>StMKK6</i>, <i>StWIPK</i> in <i>StMKP1</i> so vključeni v preobčutljivostni odgovor na različne patogene.....	73
5.1.5	V celicah rastlin, okuženih s PVY, se protein <i>StMKK6</i> nakopiči v jedru	75
5.2	SKLEPI	78
6	POVZETEK (SUMMARY)	81
6.1	POVZETEK	81
6.2	SUMMARY	83
7	VIRI.....	85

ZAHVALA

PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1: Seznam oligonukleotidnih začetnikov, ki smo jih uporabili za pomnoževanje genov in promotorjev	17
Pregl. 2: Seznam oligonukleotidnih začetnikov za qPCR	20
Pregl. 3: Seznam uporabljenih fluorescenčnih proteinov z ekscitacijsko in emisijsko valovno dolžino	33
Pregl. 4: Potrditev rezultatov mikromrež s qPCR za gene <i>StMKK6</i> , <i>StWIPK</i> in <i>StMKPI</i>	36
Pregl. 5: Rezultati testiranih interakcij proteina <i>StMKK6</i> s proteini <i>StWIPK</i> , <i>StMAPK4_1</i> , <i>StMAPK4_2</i> , <i>StMAPK6</i> in <i>StMAPK13</i>	60

KAZALO SLIK

Sl. 1: Signalizacija MAPK v odzivu na napad patogenov.....	12
Sl. 2: Shema plazmida pJET1.2.....	22
Sl. 3: Shema plazmida pENTR TM /D-TOPO [®]	23
Sl. 4: Shema plazmida pCR [®] 8/GW/TOPO [®]	23
Sl. 5: Shematski prikaz binarnega ekspresijskega plazmida za fuzijo gena z YFP (pH7YWG2).....	25
Sl. 6: Shematski prikaz binarnega ekspresijskega plazmida za fuzijo gena s CFP (pH7CWG2).....	26
Sl. 7: Shematski prikaz binarnega ekspresijskega plazmida za študij interakcij med proteini z N-terminalnim koncem proteina YFP (p35S_SPYNE).....	26
Sl. 8: Shematski prikaz ekspresijskega plazmida za študij interakcij med proteini s C-terminalnim koncem proteina YFP (p35S_SPYCE).....	27
Sl. 9: Shematski prikaz ekspresijske kasete v plazmidu za utišanje tarčnega gena s sistemom VIGS.....	28
Sl. 10: Diferencialno izraženi geni družine MKKK (A), MKK (B), MAPK (C) in MKP (D) v krompirju sorte Rywal in transgenem krompirju NahG-Rywal v treh časovnih točkah 1, 3 in 6 dpi (Baebler in sod., 2014).....	36
Sl. 11: Izražanje gena <i>StMKK6</i> v biotskem in abiotskem stresu.....	37
Sl. 12: Izražanje gena <i>StWIPK</i> v biotskem in abiotskem stresu.....	38
Sl. 13: Izražanje gena <i>StMKP1</i> v biotskem in abiotskem stresu.....	39
Sl. 14: Filogenetsko drevo genov iz družine <i>MKK</i> v razhudnikovkah in rastlini <i>A. thaliana</i>	40
Sl. 15: Filogenetsko drevo MAPK iz skupine A in B v krompirju in rastlini <i>A. thaliana</i>	41
Sl. 16: Aminokislinska poravnava dveh sekvenc proteina <i>StMKK6</i> iz krompirja sorte Rywal ter krompirja podvrste Phureja, klon DM.....	43
Sl. 17: Filogenetsko drevo krompirjevega gena <i>MKK6</i> in ortologov v rastlinskih vrstah.....	44
Sl. 18: Aminokislinska poravnava petih sekvenc proteina <i>WIPK</i> iz krompirja sort Désirée in Rywal, sekvence krompirja iz genske banke (Genbank: AB206552.1) in krompirja podvrste Phureja, klona DM.....	46
Sl. 19: Aminokislinska poravnava štirih sekvenc proteina <i>StMKP1</i> iz krompirja sorte Rywal, sekvenc krompirja iz genske banke (GenBank: BAE4444) ter krompirja podvrste Phureja, klon DM.....	49
Sl. 20: Predvidene regulatorne domene promotorja gena <i>StMKK6</i> iz sorte Rywal.....	50
Sl. 21: Lokalizacija fluorescenčnih markerjev CFP in YFP, pod močnim virusnim promotorjem (CaMV 35S) brez fuzije s preučevanimi geni.....	52
Sl. 22: Lokalizacija proteina <i>StMKK6</i> , pod močnim virusnim promotorjem (CaMV 35S), s fuzijo s CFP.....	52
Sl. 23: Lokalizacija proteina <i>StMKK6</i> , pod močnim virusnim promotorjem (CaMV 35S), s fuzijo z YFP.....	53
Sl. 24: Lokalizacija proteina <i>StMKK6</i> pod nativnim promotorjem, s fuzijo z YFP.....	54

Sl. 25: Lokalizacija proteina StWIPK pod močnim virusnim promotorjem (CaMV 35S), s fuzijo s CFP.....	55
Sl. 26: Lokalizacija proteina StWIPK pod močnim virusnim promotorjem (CaMV 35S), s fuzijo z YFP	55
Sl. 27: Lokalizacija proteina StMKP1 pod močnim virusnim promotorjem (CaMV 35S), s fuzijo z YFP	56
Sl. 28: Pozitivna kontrola eksperimenta BiFC	57
Sl. 29: Nepotrjena interakcija med proteinoma StMKK6 in StMAPK4_1 (a), StMAPK4_2 (b), StMAPK6 (c) in StMAPK13 (d).....	59
Sl. 30: Izražanje potrjenih substratov proteina StMKK6 v krompirju sorte Rywal in NahG-Rywal, 1, 3 in 6 dpi (Baebler in sod., 2014)	60
Sl. 31: Jakost izražanja genov <i>StMKK6</i> , <i>StMAPK4_2</i> , <i>StMAPK6</i> in <i>StMAPK13</i> 1dpi v slepo inokuliranih listih krompirja.....	61
Sl. 32: Širjenje virusa PVY ^N -GFP v zgornjih, neinokuliranih listih rastline <i>S. venturii</i> po utišanju ali brez utišanja gena <i>StWIPK</i> , v treh časovnih točkah: 18, 21 in 27 dpi	64
Sl. 33: Shema sproženih kaskad MAPK v prirojenem imunskem odzivu rastlin (zgoraj) ter preobčutljivostnem odgovoru krompirja (v sredini) ter tobaka (spodaj).....	80

KAZALO PRILOG

Priloga A: Sekvence genov *StWIPK*, *StMKK6*, *StMKP1*, *StMAPK4_1*, *StMAPK4_2*, *StMAPK6* in *StMAPK13*, izoliranih iz krompirja sorte Rywal.

Priloga B: Sekvenci promotorja gena *StMKK6*, izoliranega iz krompirja sort Rywal in Santé.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

- 6K1 – prvi protein, z velikostjo 6 kDa (first 6 kDa protein)
6K2 – prvi protein, z velikostjo 6 kDa (second 6 kDa protein)
ATP – adenzin tri fosfat (adenosine triphosphate)
Avr – avirulenčni (gen)
bp - bazni par (base pair)
BiFC – bimolekularna fluorescenčna komplementacija (bimolecular fluorescent complementation)
BSA – goveji serumski albumin (bovine serum albumine)
CaMK – od Ca^{2+} /kalmodulina odvisna proteinska kinaza (Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase)
CaMV – mozaični virus cvetače (cauliflower mosaic virus)
cDNA - komplementarna DNA (complementary DNA)
CFP – modri fluorescenčni protein (cyan fluorescent protein)
CI – citoplazemski inkluzijski protein (cytoplasmic inclusion protein)
CMV - virus mozaika kumar (cucumber mosaic virus)
CP – plaščni protein (coat protein)
Cq - cikel PCR v realnem času, kjer fluorescenca preseže nastavljeni prag
CTR1 – gen konstitutivnega trojnega odgovora1 (constitutive triple response 1)
EDR1 – gen povečane odpornosti na bolezn 1 (enhanced disease resistance 1)
cv. – sorta (cultivar)
ddH₂O – bidestilirana voda
DAMP – molekularni vzorec, povezan s poškodbo (damage-associated molecular pattern)
DNA - deoksiribonukleinska kislina (deoxyribonucleic acid)
dpi – dni po okužbi (days post infection)
DsPTP – dvojnospetsifčna proteinska tirozinska fosfataza (dual specificity protein tyrosine phosphatase)
dsRNA – dvojnovijačna RNA (double-stranded RNA)
ER – ekstremna rezistenca (extreme resistance)
ETI – z efektorji sprožena imunost (effector-triggered immunity)
GFP – zeleni fluorescenčni protein (green fluorescent protein)
HC/HC-Pro – proteinaza s pomožno komponento (helper component)
HR - preobčutljivostni odgovor (hypersensitive resistance)
INA – 2,6-dikloro-izonikotinska kislina (2,6-dichloroisonicotinic acid)
IBR – indol-3-butirična kislina-odzivna fosfataza (indole-3-butyric acid-response phosphatase)
JA – jasmonska kislina (jasmonic acid)
MAPK - z mitogeni aktivirana proteinska kinaza (mitogen-activated protein kinase)

MKK - MAP kinaza kinaza
MKKK - MAP kinaza kinaza kinaza
MEKK – podskupina MAP kinaz kinaz kinaz
MKP – fosfataza MAP kinaz
mRNA - informacijska RNA (messenger RNA)
NahG – salicilat-hidroksilaza (salicylate hydroxylase)
NIa – mali jedrni inkluzijski protein (small nuclear inclusion protein)
NIb – veliki jedrni inkluzijski protein (large nuclear inclusion protein)
NO – dušikov monoksid
NPR1 – angl. »nonexpresser of PR genes 1«
P1 – prvi protein (first protein)
P3 – tretji protein (third protein)
PAMP – s patogenom povezan molekularni vzorec (pathogen-associated molecular pattern)
PCR – verižna reakcija s polimerazo (polymerase chain reaction)
PHS1 – propizamid-preobčutljivostna fosfataza 1 (propyzamide hypersensitive phosphatase 1)
PR – s patogenezo povezan (pathogenesis-related)
PRR – receptor za prepoznavo vzorcev (pattern recognition receptor)
PTGS – posttranslacijsko utišanje gena (post-translational gene silencing)
PTI – s PAMP-i sprožena imunost (PAMP-triggered immunity)
PTK – tirozinska proteinska kinaza (protein tyrosine kinase)
PTP – proteinska tirozinska fosfataza (protein tyrosine phosphatase)
PSTP – serinsko-treoninska fosfataza (serine-threonine phosphatases)
PVY - krompirjev virus Y (Potato virus Y)
PVY^{NTN} - nekrotični različek krompirjevega virusa Y
RAF – podskupina MAP kinaz kinaz kinaz
RFP – rdeči fluorescenčni protein (red fluorescent protein)
RISC kompleks – RNAi kompleks za utišanje (RNAi silencing complex)
RNA - ribonukleinska kislina (ribonucleic acid)
ROS – aktivni kisikovi radikali (reactive oxygen species)
R protein – rezistenčni protein (resistance protein)
qPCR – verižna reakcija s polimerazo v realnem času (quantitative polymerase chain reaction)
SA - salicilna kislina (salicylic acid)
SAG - O- β -glukozid
SAR – sistemsko pridobljena rezistenca (systemic acquired resistance)
SIPK – proteinska kinaza, ki jo inducira salicilna kislina (salicylic acid-induced protein kinase)
siRNA – mala interferenčna RNA (small interfering RNA)
ssRNA – enovijačna RNA (single-stranded RNA)

TAE – raztopina Trisa, acetata in EDTA

TE – raztopina Trisa in EDTA

T_m - temperatura, pri kateri se 50% molekul dvoverižne DNA razpre (melting temperature)

TRV – virus tobačnega mozaika (Tobacco rattle virus)

YFP – rumeni fluorescenčni protein (yellow fluorescent protein)

VIGS - utišanje gena, inducirano z virusom (virus induced gene silencing)

Vpg - protein, povezan z genomom virusa (viral protein genome-linked)

WIPK – z ranitvijo inducirana proteinska kinaza (wound-induced protein kinase)

Standardne kratice za nukleinske baze:

A - adenin

C - citozin

G - gvanin

T – timin

Standardne enočrkovne in tričrkovne kratice za aminokisljine:

A	Ala	alanin
R	Arg	arginin
N	Asn	asparagin
D	Asp	asparaginska kislina
C	Cys	cistein
E	Glu	glutaminska kislina
Q	Gln	glutamin
G	Gly	glicin
H	His	histidin
I	Ile	izolevcin
L	Leu	levcin
K	Lys	lizin
M	Met	metionin
F	Phe	fenilalanin
P	Pro	prolin
S	Ser	serin
T	Thr	treonin
W	Trp	triptofan
Y	Tyr	tirozin
V	Val	valin

1 UVOD

Rastline so v okolju podvržene biotskim in abiotskim stresnim dejavnikom. Biotske stresne dejavnike predstavljajo herbivori ter rastlinski patogeni, kot so virusi, glive in bakterije. Glede na tip patogena so rastline na okužbo občutljive ali odporne. V obeh primerih so ti odzivi zelo kompleksni, saj vključujejo preplet signalnih poti (Baena-González in Sheen, 2008).

Ena pomembnejših interakcij med patogenom in rastlinskim gostiteljem, ki jih je pomembno razumeti, je tudi povezava med krompirjevim virusom Y (PVY) in njegovim rastlinskim gostiteljem krompirjem (*Solanum tuberosum*), saj je PVY ekonomsko najpomembnejši krompirjev virusni patogen in je razširjen po vsem svetu (Pompe-Novak in sod., 2005). Ker je krompir tretja ekonomsko najpomembnejša kulturna rastlina na svetu, je razumevanje poteka okužbe in odziva gostitelja na okužbo zelo pomembno, saj pripomore k razvoju rastlin, ki so bolj odporne na virus.

Krompirjev virus Y uvrščamo v družino *Potyviridae* in obsega več različkov, najbolj agresiven je PVY^{NTN}. Nekaj dni po okužbi se na listih občutljive sorte krompirja pojavijo primarni simptomi, ki se izrazijo kot kloroze in nekrotične lise. Kasneje, ko se virus razširi po celotni rastlini, se pojavijo še sistemski simptomi, med drugim tudi obročkaste nekroze gomoljev. Bolezen so prvič opisali na Madžarskem, konec 80-ih pa je povzročila hudo epidemijo tudi v Sloveniji (Kus, 1995). Odporne sorte krompirja se pred virusom obranijo s t.i. preobčutljivostnim odgovorom, kar je simptomatično opazno kot lezije na površini listov, virus pa se izven teh nekroz ne širi naprej (Desender in sod., 2007). S tovrstnim mehanizmom se pred okužbo s PVY brani tudi krompir sorte Rywal, medtem ko je transgeni krompir NahG-Rywal, z okvarjeno sintezno potjo salicilne kisline, na okužbo občutljiv (Baebler in sod., 2014). Občutljive sorte se pred sistemsko okužbo ne uspejo braniti in zbolijo.

V odziv krompirja na okužbo je vključen širok spekter obrambnih molekul, ki se sintetizirajo kot rezultat zapletenega sistema signalnih poti. Med tovrstne komponente signalizacije štejemo tudi signalizacijo s kaskadami od mitogenov odvisnih proteinskih kinaz (MAPK) in z njimi povezano aktivacijo sinteze rastlinskih obrambnih hormonov (Meng in Zhang, 2013).

MAPK so specifična in tekom evolucije zelo ohranjena skupina proteinskih kinaz, signal pa se običajno prenaša v obliki kaskade (Hamel in sod., 2006). MAPK kaskade lahko zasledimo v skoraj vseh evkariontskih organizmih in se izražajo v večini tkiv. V rastlinah regulirajo odzive na okužbo s patogeni, škodljivci, odzive na abiotski stres, procese normalne celične rasti, delitve, diferenciacije in celične smrti (Rodriguez in sod., 2010).

MAPK kaskado sestavljajo tri zaporedno aktivirane proteinske kinaze, na dnu kaskade pa zadnja MAPK fosforilira transkripcijske faktorje, ostale kinaze ali druge encime (Bardwell in Shah, 2006). Negativni regulatorji MAPK kaskad so fosfataze MAPK, ki substratu odvzamejo fosfat (Theodosiou in Ashworth, 2002). V signalizacijo z MAPK se lahko vključijo tudi efektorji patogenov, ki regulirajo kaskado in vplivajo na potek signalizacije na različnih stopnjah prenosa signala (Colcombet in Hirt, 2008).

V odzivu rastline na okužbo so najbolj aktivne naslednje MAPK: MAPK3, -4, in -6 ter MKK1, -2, -4 in -5. Te MAPK so osrednji faktorji signalizacije tako v biotskem kot v abiotskem stresu (Rodriguez in sod., 2010). Največ modulov MAPK in informacij o njihovi regulaciji je znanih za odzive na glivne, oomicetne ali bakterijske patogene, medtem ko je podatkov o odzivu na okužbe z virusi bistveno manj.

Katere in kakšno vlogo imajo MAPK v odzivu rastline na okužbo s PVY doslej še ni bilo raziskano. Namen tega doktorskega dela je raziskati vlogo MAPK v krompirju, ki se na okužbo s PVY odzove s preobčutljivostnim odzivom in s pomočjo prehodne transformacije rastlin preučiti vlogo izbranih genov v tem odzivu.

1.1 CILJI DOKTORSKE NALOGE

- Preučiti dinamiko izražanja MAPK v preobčutljivostnem odzivu krompirja na okužbo s PVY ter izbrati nekaj genov za nadaljnje funkcijske študije.
- Analizirati zastopanost izbranih genov v genomu krompirja in v drugih rastlinskih vrstah.
- Preučiti odziv izbranih MAPK in fosfataz MAPK na različne okoljske strese.
- Preučiti vpliv okužbe s PVY na lokalizacijo preučevanih MAPK in fosfataz MAPK.
- Na gensko spremenjenih sortah krompirja z zmanjšanim izražanjem gena *StWIPK* (angl. »wound-induced protein kinase«) preveriti, ali je mogoče na tak način povečati odpornost občutljivih sort na okužbo s PVY.

1.2 HIPOTEZE

Rastline reagirajo na biotske in abiotske stresne dejavnike z aktivacijo signalnih poti MAPK in drugih efektorjev. Spremembe v izražanju MAPK so odkrili tudi v odzivu rastlin na okužbo z rastlinskimi virusi, vendar pa vključitev signalizacije MAPK v odziv krompirja na okužbo s krompirjevim virusom Y doslej še ni bila raziskana.

- Aktivacija MAPK je ključen dejavnik signalizacije rastlin pri obrambi pred patogeni. Tudi v odzivu krompirja na okužbo s PVY pričakujemo dinamičen odziv MAPK in predvidevamo, da so diferencialno izražene MAPK v krompirju po okužbi del gostiteljevega preobčutljivostnega odgovora.
- Rezultat učinkovitega obrambnega odziva je hitra prepoznavna patogena in hiter odziv z regulacijo prepisovanja obrambnih genov. Predvidevamo, da okužba s PVY vpliva na spremembo lokalizacije MAPK oziroma MAPK fosfataz.
- Povečanje ali zmanjšanje izražanja ključnih obrambnih genov lahko vodi v učinkovitejši odgovor rastline na okužbo ali celo do odpornosti. Predvidevamo, da zmanjšanje izražanja ključnih komponent obrambe vpliva na hitrost širjenja virusa po transgeni rastlini.

2 PREGLED OBJAV

2.1 DRUŽINA PROTEINSKIH KINAZ

Fosforilacija proteinov je proces, s pomočjo katerega poteka znotrajcelična komunikacija in drugi kompleksni procesi. Vsi procesi fosforilacije v evkariontih potekajo znotraj velike družine proteinov, proteinskih kinaz (Manning in sod., 2002). Evkariontske proteinske kinaze definiramo kot skupino encimov, ki uporabljajo γ -fosfat iz adozin tri fosfata (ATP) za fosforilacijo serinskih, treoninskih ali tirozinskih ostankov proteinov. Proteinskim kinazam je skupna protein-kinazna domena, dolga dvesto petdeset do tristo amino kislin in odgovorna za prenos fosfata (Hanks in Hunter, 1995). Ob objavi genoma modelne rastline *Aarabidopsis thaliana* L. So identificirali preko tisoč proteinskih kinaz (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Analiza človeškega genoma pa je razkrila petsto osemnajst proteinskih kinaz (Manning in sod., 2002). Proteinske kinaze tako kodira 1-2 % vseh funkcionalnih genov, kar kaže na pomembnost te skupine proteinov v celični regulaciji evkariontov. V rastlinah so proteinske kinaze komponente mnogih signalnih poti, kot je odziv na biotski stres, svetlobo, rastlinske hormone in okoljske spremembe. Imajo tudi vlogo pri regulaciji cirkadianega ritma, celičnega cikla, razvojnih procesov, znotrajceličnem in medceličnem transportu in regulaciji celičnega metabolizma (Lehti-Shiu in Shiu, 2012). V rastlinah je približno petkrat več proteinskih kinaz kot v kvasovki (*Saccharomyces cerevisiae*) in dva- do trikrat več kot v drugih evkariontskih organizmih, vključno s sesalci. Rastlina *A. thaliana* pa v rastlinskem kraljestvu niti ne spada med vrste z največ geni za proteinske kinaze; od vseh doslej sekvenciranih rastlinskih genomov sta riž in topol vrsti z največ proteinskimi kinazami; imata jih namreč preko tisoč petsto (Ding in sod., 2009; Lehti-Shiu in sod., 2009; Shiu in sod., 2004). Glavni mehanizem ekspanzije proteinskih kinaz v rastlinah v primerjavi z drugimi evkarionti so tandemske podvojitve in podvojitve genoma (Zhang, 2003).

Proteinske kinaze so razdeljene na tiste, ki fosforilirajo serin in/ali treonin ter na tiste, ki fosforilirajo tirozin. Na osnovi filogenetske analize je družina rastlinskih proteinskih kinaz razdeljena v pet skupin: (a) skupina »AGC« (ciklične nukleotidno-odvisne kinaze in kalcij-fosfolipidno odvisne kinaze), (b) skupina »CaMK« (od kalcija/kalmodulina odvisne proteinske kinaze in SNFI/AME aktivirane proteinske kinaze), (c) skupina »CMGC« (ciklinske kinaze, MAPK, GSK-3 in CKII kinaze), (d) skupina »PTK« (tirozinske proteinske kinaze), (e) ostale proteinske kinaze (RLK, CTR1, TsI) (Hanks in Hunter, 1995).

2.1.1 MAPK

Od mitogenov odvisne proteinske kinaze (MAPK) so evolucijsko ohranjene signalizacijske molekule v vseh evkariontih. Njihova osnovna funkcija je prenos zunajceličnega signala preko membranskih receptorjev v notranjost celice vzdolž kaskade MAPK in regulacija celičnega odziva na okoljske spremembe. Rastlinske MAPK imajo ključno vlogo pri regulaciji razvojnih procesov in odziva na stres, vključno z odzivom na okužbo s patogeni, ranitvijo, temperaturnim stresom, sušo, slanostjo, UV sevanjem, ozonom in aktivnimi kisikovimi radikali (Meng in Zhang, 2013).

V splošnem modelu kaskade MAPK se kaskada začne z aktivacijo najvišje kinaze v kaskadi, MAPK kinaze kinaze (MKKK), ki jo s fosforilacijo aktivira membranski receptor. MKKK nadalje fosforilira mesto serina ali treonina v MAPK kinazi (MKK) in sicer na S/T-X3-5-S/T aminokislinskem motivu. MKK aktivira spodnjo MAPK s fosforilacijo treonina in tirozina na ohranjenem T-X-Y motivu aktivacijske zanke (Rodriguez in sod., 2010). Aktivirana MAPK prenese signal naprej, do drugih proteinskih kinaz, elementov citoskeleta, ribosomskih proteinov ali transkripcijskih faktorjev.

Rastline imajo vzdolž celotnega rastlinskega kraljestva zelo različno število MAPK. Število je večje predvsem pri kopenskih rastlinah, saj se je kompleksnost signalizacije ob prehodu rastlin na kopno precej povečala, v prvih vaskularnih rastlinah (*Selaginella moellendorffii*), v mahovih (*Physcomitrella patens*) in vse do cvetnic (Robert Dóczy in sod., 2012).

Genom modelne rastline *A. thaliana* kodira 60 MKKK, 10 MKK in 20 MAPK (Ichimura in sod., 2002). Vsaka izmed MKKK ali MKK lahko aktivira več različnih substratov, zato je možno število modulov MAPK veliko. Tako je signalizacija organizirana v več tisoč specifičnih kombinacij MKKK-MKK-MAPK z določeno mero redundantnosti. Da ne prihaja do navzkrižne aktivacije pa so posamezne komponente strogo regulirane (Andreasson in Ellis, 2010).

Skupina MKKK je razdeljena v dve veliki podskupini: MEKK in RAF. V rastlini *A. thaliana* je 10 predstavnikov družine MEKK, medtem ko imajo zgodnejše rastline, kot so vrste iz rodu *Physcomitrella* in *Selaginella*, od šest do osem predstavnikov. MEKK sodelujejo pri MAPK signalizaciji, kjer aktivirajo spodnje MKK. Gen *AtMEKK1* je najbolj preučevana rastlinska MKKK. Vključena je v signalizacijo odziva na sušo in slanost (Teige in sod., 2004) ter v signalizacijo imunskega odziva (Su in sod., 2013; Suarez-Rodriguez in sod., 2007). Izmed kinaz RAF pa sta najbolj preučevani kinazi CTR1 in EDR1, za kateri je znano, da sodelujeta pri signalizaciji etilena med

obrambnim odzivom, vendar ne kot del MAPK kaskadne signalizacije (Huang in sod., 2003; Kieber in sod., 1993).

MKK so v rastlini *A. thaliana* razdeljene v štiri skupine na osnovi sekvenčne podobnosti: A (*MKK1*, -2 in -6), B (*MKK3*), C (*MKK4* in -5) in D (*MKK7*, -8, -9 in -10) (Hamel in sod., 2006; Ichimura in sod., 2002). AtMKK1 in -2 aktivirata AtMAPK4 pri odzivu na mraz, slanost in odzivu na patogene (Qiu in sod., 2008; Teige in sod., 2004). AtMKK6 sodeluje pri citokinezi in regulaciji celičnega cikla (Takahashi in sod., 2010). AtMKK3 aktivira AtMAPK6 pri regulaciji jasmonske kisline (JA) (Takahashi in sod., 2007a) in je vključena v odziv na patogene (Dóczi in sod., 2007); povečano izražanje AtMKK3 vodi do izrazitejše odpornosti na sol in povečane občutljivosti na abscizinsko kislino (Hua in sod., 2006). AtMKK4 in -5 aktivirata AtMAPK3 in -6 v regulaciji rastlinskega razvoja in obrambe pred patogeni (Asai in sod., 2002; Cho in sod., 2008; Meng in Zhang, 2013). AtMKK9 je vključena v signalizacijo etilena (Yoo in sod., 2008), senescenco listov (Zhou in sod., 2009), AtMKK7 pa sodeluje pri rastlinski bazalni in sistemski rezistenci (Zhang in sod., 2007).

Skupina MAPK je razdeljena v štiri podskupine (A-D); pri skupinah A, B in C je fosforiliran aminokislinski motiv TEY, pri skupini D pa motiv TDY (Ichimura in sod., 2002). Skupina A vključuje dve najbolj preučevani MAPK: MAPK3 in MAPK6. Vključeni sta v razvojne procese ter v odziv na abiotske in biotske strese (Beckers in sod., 2009; Müller in sod., 2010; Wang in sod., 2007).

Na koncu MAPK kaskade MAPK nadalje aktivirajo transkripcijske faktorje (WRKY, EIN3, ERF104, VIP1, SPEECHLESS, ACS6), elemente citoskeleta ali druge encime (Andreasson in Ellis, 2010).

2.2 FOSFATAZE MAPK

Pri signalizaciji MAPK je odziv celice odvisen od jakosti in trajanja aktivacije MAPK, ki pa je pogojena z defosforilacijo kaskadnih komponent. To regulirajo fosfataze MAPK, podskupina dvojno specifičnih fosfataz, ki so negativni regulatorji MAPK. Regulatorno vlogo imajo v mnogih celičnih procesih, kot je na primer breorganizacija citoskeleta ter tudi v odzivu na stres in v signalizaciji z rastlinskimi hormoni (Bartels in sod., 2010). MAPK deaktivira odvzem fosfata (defosforilacija) na treoninu in/ali tirozinu v aktivacijskem mestu. To funkcijo v rastlinah opravljajo proteinske tirozinske fosfataze (PTP), serinske treoninske fosfataze (PSTP) ali dvojnospecifične (Ser/Thr in Tyr) fosfataze (DSP) (Keyse, 2008). Ker je za popolno deaktivacijo MAPK proteinu treba odvzeti oba fosfata, so dvojno specifične fosfataze MAPK (MKP) najpomembnejša skupina negativnih regulatorjev signalizacije MAPK (Camps in sod., 2000; Theodosiou in Ashworth, 2002). Rastlina *A. thaliana* ima pet dvojno specifičnih fosfataz MAPK: dvojno specifična proteinska tirozinska fosfataza 1 (DsPTP1),

fosfataza MAPK 2 (MKP2), indol-3-butirična kislina-odzivna fosfataza 5 (IBR5), propizamid-preobčutljiva fosfataza 1 (PHS1) in fosfataza MAPK 1 (MKP1) (Gupta in sod., 1998; Lee in Ellis, 2007; Lee in sod., 2009).

DsPTP1 je edina fosfataza, katere aktivnost še ni bila dokazana *in vivo*. *In vitro* deaktivira MAPK4 (Gupta in sod., 1998), njeno izražanje pa preko kalmodulina regulira kalcij (Yoo in sod., 2004). MKP2 je pozitiven regulator oksidativnega stresa v križnicah in *in vitro* defosforilira MAPK3 in -6 v odzivu na ozon (Lee in Ellis, 2007). IBR5 je pozitiven regulator odzivov na avksin in abscizinsko kislino (Monroe-Augustus in sod., 2003; Strader in sod., 2008). Edini znani substrat proteina IBR5 je AtMAPK12, ki je negativen regulator signalizacije avksina (Lee in sod., 2009). Fosfataza PHS1 je vključena v organizacijo mikrotubulov (Naoi in Hashimoto, 2004) in defosforilira MAPK12 in -18 (Walia in sod., 2009). PHS1 je tudi negativen regulator signalizacije z abscizinsko kislino (Quettier in sod., 2006). Fosfataza MKP1 je vključena v odziv na različne okoljske strese, kot so UV sevanje, slanost, ranitev in odziv na okužbo s patogeni (Bartels in sod., 2009; Kalbina in Strid, 2006; Katou in sod., 2005a; Seo in sod., 2007; Ulm in sod., 2001; Ulm in sod., 2002).

Poleg tega še dve skupini fosfataz negativno regulirata MAPK: PP2C serin-treonin proteinske fosfataze in protein tirozin fosfataze (PTP).

Ker število MAPK močno presega število fosfataz MAPK, lahko en tip fosfataze defosforilira več MAPK oziroma nasprotno lahko eno MAPK deaktivira več različnih fosfataz. Kljub temu je do sedaj znanih le pet interakcij MAPK z dvojno specifičnimi fosfatazami.

2.3 RASTLINSKI IMUNSKI SISTEM

Pri rastlinah poznamo dva osnovna mehanizma obrambe pred patogeni (patogeni virusi, bakterije, glive in oomicete): imunost, ki jo sprožijo s patogenom povezani molekularni vzorci ali PTI (angl. »pathogen-associated molecular pattern«, PAMP; angl. »PAMP-triggered immunity«, PTI) oziroma bazalna imunost ter z efektorji sprožena imunost (angl. »effector-triggered immunity«, ETI). Prvi mehanizem temelji na prepoznavi s patogeni povezanih molekularnih vzorcev preko transmembranskih receptorjev PRR (angl. »pattern recognition receptor«). Po rastlinski prepoznavi specifičnega PAMP-a (npr. bakterijski flagelin, lipopolisaharidi, elongacijski faktor Ef-Tu, peptidogligani, hitin) se sproži produkcija aktivnih kisikovih radikalov, spremembe zunajceličnega pH v bazično in fosforilacija s povezano regulacijo genov, ki omeji rast patogena (Gómez-Gómez in sod., 1999; Rasmussen in sod., 2012; Zipfel in sod., 2006). PTI oziroma bazalna odpornost je šibkejša kot ETI in kljubuje šibkejšim patogenom. Nekateri patogeni v celice gostiteljske rastline sproščajo tudi efektorske proteine, ki pa jih

rastline v procesu ETI prepoznajo z rezistenčnimi proteini (proteini R). Tovrstni imunski odziv poteka znotraj celice in rezultat je odpornost na bolezen in preobčutljivostni odgovor (angl. »hypersensitive resistance«, HR).

Preobčutljivostni odgovor se izraža kot lokalna celična smrt z vidnimi nekrozami na mestu vdora mikroorganizma. Na molekularnem nivoju tovrstni odgovor spremlja vdor kalcija v celico, porast koncentracije aktivnih kisikovih radikalov, signalizacija z dušikovim oksidom ter sinteza salicilne kisline (SA), kar vodi v programirano celično smrt (Mur in sod., 2008). Del preobčutljivostnega odgovora so tudi interakcije med proteini R gostitelja in avirulenčnimi proteini (avr) patogena. Od nekaj ur do več dni po razvoju HR neinkulirani deli rastline pogosto izražajo povečano količino proteinov PR (angl. »pathogenesis-related protein«), kar sproži razvoj dolgo trajajoče in širokospektralne sistemske rezistence SAR (angl. »systemic acquired resistance«) (Vlot in sod., 2009). Fenotip in časovni okvirji razvoja preobčutljivostnega odgovora lahko v odvisnosti od kombinacije rastlinskega gostitelja in tipa patogena precej variirajo (Holub in sod., 1994; Krzymowska in sod., 2007). Razlike so posledica različnih mehanizmov okužbe s patogeni (oomicete, glive, bakterije ali virusi).

Sistemska odpornost je induciran, široko spektralen imunski odziv rastline, nespecifičen za tip začetne okužbe. Patogen, ki na mestu okužbe sproži programirano celično smrt, lahko sproži SAR s pomočjo serije signalov, akumulacije SA in sinteze PR proteinov. Posledično je celotna rastlina zaščitena za obdobje enega tedna ali večih mesecev. SAR se lahko z epigenetskimi spremembami celo prenaša na potomce. Glavni regulator SAR v rastlini *A. thaliana* je gen *NPR1* (angl. »nonexpresser of PR genes 1«), ki ga neposredno regulira SA (Fu in Dong, 2013).

Eden od signalizacijskih mehanizmov rastlinske obrambe pred okužbo je utišanje virusne RNA, mehanizem, ki omeji sintezo, stabilnost in prepisovanje RNA molekul. Utišanje RNA deluje tarčno in je specifično za določeno sekvenco RNA. Ta mehanizem zniža nivo izražanja genov na tri načine: z razgradnjo transkriptov oziroma mRNA, inhibicijo translacije mRNA in metilacijo DNA (Carr in sod., 2010). Utišanje RNA ima vlogo pri signalizaciji SA pri obrambi rastline pred virusno okužbo in pri inhibiciji izražanja virusnih genov ter pomnoževanju med preobčutljivostnim odzivom. Tovrstni mehanizem je aktiven tudi med ohranjanjem bazalne odpornosti na PVY (Rakhshandehroo in sod., 2009).

Rastline sintetizirajo male RNA, ki so komplementarne sekvenci tarčne RNA. Mehanizem utišanja genov z regulacijo RNA imenujemo tudi post-transkripcijsko utišanje genov (PTGS). Sprožitelj PTGS v gostiteljski rastlini je dsRNA, ki je podvojena iz virusne ssRNA. dsRNA cepijo »Dicer« proteini na krajše fragmente - siRNA (mala interferenčna RNA), dolge 21-24 nukleotidov. Te so kot enovijačne

molekule vključene v RISC kompleks (angl. »RNAi silencing complex«), ki prepozna in uničuje RNA, komplementarno siRNA. To utišanje se nadalje sistemsko širi po rastlini (Becker in Lange, 2010).

Naravna selekcija pa v oboroženi vojni z gostiteljem usmerja patogene, da zaobidejo rastlinski obrambni sistem tako, da spremenijo svoje efektorske proteine do te mere, da jih rastlinski receptorji ne prepoznajo več ali kako drugače zavrejo rastlinski obrambni sistem (Jones in Dangl, 2006). Tako se mora gostiteljski odziv ETI vzpostaviti ponovno.

2.4 SALICILNA KISLINA

Salicilna kislina je v rastlinah sintetizirana spojina s fenolnim obročem in hidroksilno skupino (Halim in sod., 2006). V rastlinah je vključena v več različnih procesov: kalitev semen, razvoj mlade rastline, celično rast, respiracijo, zapiranje listnih rež, senescenco, odziv na abiotične strese, termotoleranco, nodulacijo v stročnicah, zorenje semen, termogenezo in je ključna za imunski odgovor na napad patogenov (Vlot in sod., 2009).

Salicilno kislino lahko rastlina sintetizira po dveh encimskih poti, obakrat preko metabolita horizmata (Wildermuth, 2006). Horizmat je lahko pretvorjen v SA preko vmesnih intermediatov benzoata ali kumarične kisline ali pa je lahko pretvorjen v SA preko izohorizmata (Wildermuth in sod., 2001). Večino SA, ki se sintetizira v rastlini, pretvori encim SA glukoziltransferaza v SA *O*- β -glucozid (SAG) (Dean in Mills, 2004; Dean in sod., 2005). Sinteza SA najverjetneje poteka v kloroplastih (Garcion in sod., 2008), SA glukoziltransferaza pa se nahaja v citoplazmi. SA *O*- β -glucozid se aktivno transportira iz citosola v vakuolo, kjer služi kot zaloga in se lahko pretvarja nazaj v SA (Dean in sod., 2005).

Salicilna kislina je ključni regulator rastlinske odpornosti na glive, bakterije in viruse. Tretiranje rastlin s SA inducira izražanje genov *PR* in posledično vzpostavi odpornost na virusne, bakterijske in glivne patogene v gostiteljski rastlini. Poleg tega sproži prepis istih genov, ki so aktivni tudi med sistemsko rezistenco (Vlot in sod., 2009).

Pri preučevanju vloge SA v rastlinski obrambi se uporabljajo transgene rastline z okvarjeno sintezno potjo SA. To so rastline z vnesenim bakterijskim genom *NahG*, ki kodira protein salicilat-hidroksilazo. Ta encim metabolizira SA do neaktivnega katehola in tako preprečuje akumulacijo aktivne SA v transgeni rastlini (Halim in sod., 2007). Po okužbi s patogenom takšne rastline niso sposobne vzpostaviti učinkovitega obrambnega sistema, kot je sistemska odpornost, ali prepisati gene *PR*, zato so bolj občutljive na patogene (Gaffney in sod., 1993). Po tretiranju *NahG* transgenih rastlin z analogom SA, 2,6-dikloro-izonikotinske kisline (INA), pa se rastlinam povrne zmožnost sistemske odpornosti in prepisovanja genov *PR* (Vernooij, 1995).

Indukcija genov s signalizacijo SA je lahko hitra, v roku 30-ih minut (Horvath in sod., 1998) ali kasnejša, preko indukcije gena *PR-I* (Lebel in sod., 1998). Promotor gena *PR-I* vsebuje regulatorne domene za vezavo transkripcijskega faktorja TGA (Lebel in sod., 1998), ki je poleg proteinov WRKY, ERF in R2R3-MYB eden najpomembnejših transkripcijskih faktorjev v regulaciji SA (Eulgem, 2005; Kesarwani in sod., 2007).

Znano je, da je SA vključena tudi v navzkrižno signalizacijo z drugimi rastlinskimi hormoni. Najbolje raziskana je navzkrižna signalizacija SA in jasmonske kisline (JA). Oba hormona sta vključena v obrambo pred patogeni, vendar sta specializirana za različne strategije škodljivcev; signalizacija SA se prednostno sproži pri obrambi pred biotrofnimi patogeni in virusi, medtem ko signalizacija JA rastlino ščiti pred nekrotrofnimi patogeni in žuželkami (Pieterse in sod., 2012). Glavna negativna regulacija poteka s strani JA proti SA (Glazebrook in sod., 2003). Rezultat vzajemnega učinkovanja SA in JA je optimiziran imunski odgovor na specifični patogen. Ob okužbi rastline z bakterijo *Pseudomonas syringe* sta v začetnih fazah imunskega odgovora stimulirana oba hormona (Spoel in sod., 2003), vendar v naravi rastlini vedno grozi več kot en sam škodljivec, vsak s svojim načinom okužbe oziroma napada. Zato je prilagoditev rastline na tip patogena z vzajemno komunikacijo SA in JA smiselna, saj lahko tako prilagodi signalizacijo glede na tip patogena (Pieterse in sod., 2012).

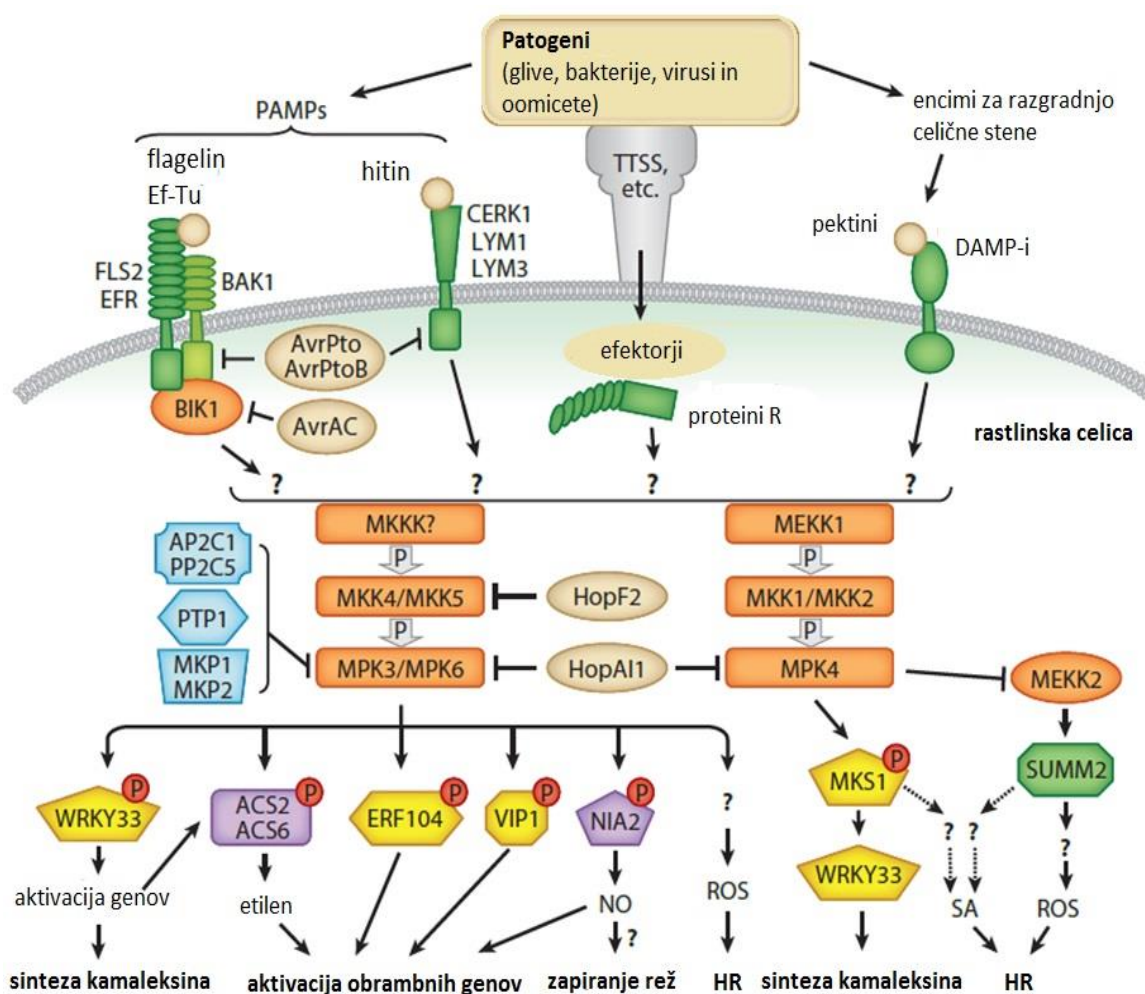
Poleg povezanosti signalnih poti SA z JA pa je signalizacija SA povezana tudi z drugimi rastlinskimi hormoni; giberelinska kislina vpliva na ravnovesje med SA in JA v imunskem odzivu (Navarro in sod., 2008). Rastni hormon avksin poveča dovzetnost rastline za okužbo s patogenom, SA pa ga zavira (Wang in sod., 2007). Tudi abscizinska kislina je vključena v signalizacijo SA. Primarno regulira odziv na abiotski stres, vendar tudi signalizacijo med SA in JA v odzivu na biotski stres (Mauch-Mani in Mauch, 2005).

2.5 MAPK VKLJUČENE V RASTLINSKI OBRAMBNI SISTEM

V rastlini *A. thaliana* so najpomembnejše MAPK, vključene v imunski odziv, AtMAPK3, -4 in -6. AtMAPK3 in -6 pozitivno regulirajo signalizacijo SA, medtem ko je AtMAPK4 negativni regulator signalizacije SA (Colcombet in Hirt, 2008). Povezavo med SA in MAPK signalizacijo so prvič odkrili med študijem dveh tobakovih proteinskih kinaz *SIPK* (ortolog *AtMAPK6*) (Zhang in Klessig, 1997) in *WIPK* (ortolog *AtMAPK3*). Za gen *SIPK* so ugotovili, da ga regulira SA (*SIPK*, angl. »salicylic acid-induced protein kinase«), *WIPK* pa aktivira ranitev rastline (*WIPK*, angl. »wound-induced protein kinase»). Gena *SIPK* in *WIPK* sta vključena v odziv na biotski stres (okužba) in abiotski stres (ranitev, mraz, suša, UV sevanje in ozon) (Zhang in Klessig, 2001). Utišanje *AtMAPK3* vodi k dovzetnosti rastline na okužbo z biotrofnimi patogeni (Menke in sod., 2004), aktiven protein pa je del sistemske rezistence, prav tako

AtMAPK6 (Beckers in sod., 2009). Tretiranje rastlin z analogom SA inducira kopičenje neaktivne oblike AtMAPK3 in -6, ob dodatnem stresu pa sta ti fosforilirani in aktivirani, tako kot tudi izražanje gena *PR-1* (Beckers in sod., 2009). MAPK pa so lahko tudi del pozitivne povratne zanke SA; povečano izražanje *MKK7* vodi v odpornost na biotrofne patogene, povečano izražanje gena *PR-1* in sistemsko rezistenco (Zhang in sod., 2007). MAPK AtMAPK4, pa skupaj s substrati MKS1, WRKY25 in/ali WRKY33 zavira signalizacijo SA in aktivira JA (Andreasson in sod., 2005; Petersen in sod., 2000). AtMAPK4 je aktivirana tudi pri okužbi rastline z bakterijo *P. syringae* ali s tretiranjem rastline z elicitorjem flg22 iste bakterije; je regulator navzkrižne signalizacije SA in JA (Colcombet in Hirt, 2008; Vlot in sod., 2008). Poleg *MAPK4* je v s PAMP-i sproženo signalizacijo vključen tudi gen *MAPK11* vključen (Bethke in sod., 2012).

Ne glede na to, da so MAPK3, -4 in -6 najpomembnejše MAPK v obrambnem odzivu rastlin pred patogeni (Slika 1), pa so različno regulirane že na nivoju transmembranskih receptorjev; receptorski kinazi BAK1 in BKK1 prepoznata PAMP-e in sprožita obrambno signalizacijo preko povezave s transmembranskimi receptorji preko MAPK3 in -6, medtem ko negativno regulirata MAPK4 (Roux in sod., 2011; Schwessinger in sod., 2011). Študij signalizacije ob rastlinski zaznavi elicitorja flg22 je razkril celotno kaskado MAPK, ki se sproži ob obrambnem odzivu. Kaskado sestavljajo MEKK1 (MKKK), dve MKK4/5 in MAPK3/6 (Asai in sod., 2002). Kasneje so odkrili še eno signalizacijsko pot MAPK, ki jo tvorijo MEKK1, MKK1/2 ter MAPK4 (Gao in sod., 2008; Qiu in sod., 2008).



Slika 1: Signalizacija MAPK v odzivu na napad patogenov

Kaskade MAPK se sprožijo v odzivu rastlin na PAMP-e na z ranitvijo povezane molekularne vzorce (angl. »damage-associated molecular patterns« DAMP) in v odzivu ETI. PAMP-e in DAMP-e prepoznajo receptorji PRR (angl. »pattern recognition receptors«), kar vodi v PTI. Patogeni skušajo z efektorjskimi molekulami zavreti imunski odziv gostitelja. Rastline v citoplazmi zaznajo efektorje s proteini R, kar vodi v odziv ETI. Aktivacija MAPK kaskade je eden prvih dogodkov rastlinske obrambe pri mehanizmih PTI in ETI. Preko fosforilacije tarčnih proteinov, kot so transkripcijski faktorji in encimi, MAPK nadzoruje sintezo in signalizacijo obrambnih hormonov, aktivacijo obrambnih genov, sintezo antimikrobnih metabolitov, zapiranje listnih rež in HR. Patogeni so razvili mehanizme zaviranja rastlinske signalizacije MAPK preko tarčenja najzgodnejših komponent kaskade ali preko tarčenja končnih substratov MAPK. Negativni regulatorji MAPK so proteinske fosfataze (AP2C1, PP2C5, PTP1, MKP1 in MKP2), ki defosforilirajo in posledično deaktivirajo MAPK. Na tak način tudi regulirajo jakost in trajanje kinazne signalizacije (povzeto po Meng in Zhang, 2013).

Figure 1: MAPK signalling in response to pathogen attack

Activation of MAPK cascades is part of plant response to PAMPs, DAMPs (damage-associated molecular patterns) and of ETI. PAMPs and DAMPs are recognised by PRR (plant pattern recognition) receptors, which leads to PTI. Pathogens use effector molecules to interfere with host defense response. In the cytoplasm of the infected plant cell, R proteins recognise pathogen effectors, which leads to the ETI response. Activation of MAPK cascade is one of the first responses in the PTI and ETI. Through the phosphorylation of the target proteins, such as transcription factors and enzymes, MAPKs control the

synthesis and signalling of defence hormones, the activation of defence genes, the synthesis of antimicrobial metabolites, the stomatal closure, and HR-like cell death. Pathogens have developed mechanisms to suppress MAPK signalling through targeting MAPKs or final substrates of the cascade. Negative regulators of MAPK cascades are protein phosphatases (AP2C1, PP2C5, PTP1, MKP1 and MKP2) which dephosphorylate MAPKs and stop the cascade. In that way they regulate magnitude, duration and physiological outcome of MAPK activation (Meng and Zhang, 2013).

2.6 KROMPIRJEV VIRUS Y

Krompirjev virus Y (PVY) je najbolj agresiven krompirjev virus in hkrati eden izmed desetih ekonomsko najpomembnejših rastlinskih virusov (Scholthof in sod., 2011). Uvrščamo ga v družino *Potyviridae* in ima širok spekter rastlinskih gostiteljev, večinoma iz družine razhudnikovk (*Solanaceae*). Prenaša se preko okuženega semenskega krompirja, preko žuželčjih prenašalcev, listnih uši ali mehansko (Kogovšek in Ravnikar, 2013). Genom PVY je enoverižna, pozitivno usmerjena molekula RNA, dolga 9700 nukleotidov (nt) in tvori en polipeptid. Ta se nadalje cepi v več funkcionalnih proteinov: prvi protein (angl. »first protein« P1), proteinazo s pomožno komponento (angl. »helper component-proteinase«, HC-Pro), tretji protein (angl. »third protein«, P3), prvi protein z velikostjo 6 kDa (angl. »first 6 kDa protein«, 6K1), citoplazemski inkluzijski protein (angl. »cytoplasmic inclusion protein«, CI), drugi protein z velikostjo 6 kDa (angl. »second 6 kDa protein«, 6K2), protein, povezan z genomom virusa (angl. »viral protein genome-linked«, Vpg), mali jedrni inkluzijski protein (angl. »small nuclear inclusion protein«, NIa), veliki jedrni inkluzijski protein (angl. »large nuclear inclusion protein«, NIb) in plaščni protein (angl. »coat protein«, CP) (Kerlan, 2006).

Najbolj agresivna seva virusa PVY sta PVY^O in PVY^N. Podskupina seva PVY^N, imenovana PVY^{NTN} na gomoljih krompirja povzroča najhujšo obliko simptomov PVY, obročasto nekrozo gomoljev, kar vodi v veliko izgubo pridelka (Beczner in sod., 1984). PVY^{N-Wi}, prvič opisan na primeru poljske sorte Wilga, pa povzroča nekrozo žil v tobaku *Nicotiana tabacum* L., sorti Samsun, in simptome mozaika na listih krompirja (Chrzanowska, 1991). PVY^{N-Wi} je v primerjavi s PVY^{NTN} bolj infektiven, vendar povzroča šibkejšo simptome, obročasto nekrozo gomoljev pa le izjemoma (Piche in sod., 2004).

Gostiteljske rastline lahko z virusom PVY vzpostavijo kompatibilne ali nekompatibilne interakcije. V rastlini, kjer se virus ne more pomnoževati in širiti, je rastlina z virusom v nekompatibilni interakciji, torej neobčutljiva oziroma odporna. Če se v gostitelju virus lahko pomnožuje in širi, pa temu pravimo kompatibilna interakcija (Valkonen, 1994), rastlina je za okužbo z virusom dovzetna. Rastline, dovzete za okužbo, so lahko tolerantne in ne razvijejo bolezenskih simptomov (npr. sorta Pentland Squire), ali pa so

občutljive in simptome razvijejo (npr. sorta Igor). V tolerantnih rastlinah se lahko virus neovirano razmnožuje, vendar v rastlini bolezni ne bo povzročil.

Po vstopu virusa v rastlino se virus po začetnem pomnoževanju na mestu vstopa širi med celicami preko plazmodezem, na daljše razdalje pa preko žil (Carrington in sod., 1996). Pri širjenju virusov iz družine *Potyviridae* sodelujejo virusni proteini, kot je plaščni protein (CP) (Dolja in sod., 1994).

2.6.1 Odziv rastline na okužbo s PVY

Občutljive sorte krompirja na mestu okužbe razvijejo lokalne simptome, na delih rastline, kjer ni prišlo do neposrednega stika z virusom, pa rastline razvijejo sistemske simptome. Lokalni simptomi so kloroze, nekrotične lezije, rumenenje in odpadanje listov ter obročkaste nekroze gomoljev, obseg simptomov pa je odvisen tudi od okoljskih dejavnikov kot so svetloba, temperatura in vlažnost (Draper in sod., 2002; Kus, 1995). Na celičnem nivoju v občutljivih sortah virus PVY^{NTN} vpliva na strukturo kloroplastov, ki so v sredini nekroze skrčeni, tilakoidne membrane razpadajo, poleg tega razpada tudi vakuola, citoplazma je zgoščena, celična stena zgubana, skrči se celotna celica. To vodi v popolno uničenje celice in je del procesa apoptoze, ki spremlja razvoj simptomov po okužbi z virusom PVY (Poljšak-Prijatelj in Ravnikar, 1992; Pompe-Novak in sod., 2002).

Pri krompirju poznamo dva tipa odpornosti na PVY, ekstremno rezistenco (ER) in preobčutljivostni odgovor (HR). V obeh primerih se razvijejo nekrotične lezije, ki omejijo širjenje virusa. Posledica ekstremne rezistence je omejitev pomnoževanja virusa v zgolj prvotno okuženih celicah, omejitev širjenja na zgolj nekaj sosednjih celic ter malo ali nobenih bolezenskih simptomov (Kogovšek in Ravnikar, 2013). Za ekstremno rezistenco na virus PVY je odgovoren gen *Ry* (Valkonen, 1994), ki se pojavlja v treh različnih vrstah rodu *Solanum*: *S. tuberosum andigena* (*Ry_{adg}*), *S. stoloniferum* (*Ry_{sto}*) in *S. chacoense* (*Ry_{chc}*), vsi pa so zelo pomembni za vzgojo novih odpornih sort.

Za preobčutljivostni odziv na PVY je odgovoren gen *Ny-1*, ki sproži HR po okužbi z virusnimi različki PVY^O, PVY^N, PVY^{N-Wi} in PVY^{NTN} (Szajko in sod., 2008). S preobčutljivostnim odgovorom na PVY se odzove tudi krompir sorte Rywal kjer se HR kaže v obliki nekrotičnih lezij na inokuliranih listih 3 dni po inokulaciji (dpi), omejeno je pomnoževanje in širjenje virusa. Odziv je odvisen tudi od temperature, saj rast rastlin pri višjih temperaturah (28 °C) prepreči HR in omogoči virusu sistemsko širjenje (Szajko in sod., 2008).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 ANALIZA PODATKOVNIH BAZ

3.1.1 Analiza rezultatov ekspresijskih mikromrež v odzivu na okužbo s PVY

Rezultate izražanja genov po okužbi s PVY smo pridobili iz predhodno objavljenih rezultatov mikromrež. Eksperiment je bil izveden na netransgenem krompirju sorte Rywal s preobčutljivostnim odgovorom na okužbo s PVY^{N-Wi} ter na občutljivem transgenem NahG-Rywalu z okvarjeno sintezno potjo SA (Baebler in sod., 2014).

Iz rezultatov mikromrež smo na osnovi anotacije poiskali vse diferencialno izražene MAPKKK, MAPKK, MAPK in MKP ter pripadajoče sonde ter jih povezali s pripadajočimi ortolognimi, PGSC ali iTAG geni krompirja (Ramšak in sod., 2014).

3.1.2 Analiza rezultatov izražanja izbranih genov iz baz »The eFP browser« in »Genevestigator«

Vrednosti izražanja mRNA izbranih genov v netretiranih tkivih krompirja in v biotskem in abiotskem stresu smo pridobili iz podatkovne baze »The-Bioanalytic Resource for Plant Biology«, natančneje iz orodja »The Potato eFP Browser« (Winter in sod., 2007). Orodje prikaže izražanje gena v vseh vegetativnih in reproduktivnih organih rastline ter po tretiranjih z različnimi abiotskimi in biotskimi stresi. Za vsak gen so bile določene FKPM vrednosti RNA signala. Vrednosti izražanja genov so bile določene s sekvenciranjem RNA krompirja *S. tuberosum* Phureja, klon DM (Massa in sod., 2011) ter *S. tuberosum* Tuberosum, klon RH (Potato genome sequencing consortium, 2011). Rezultate izražanja ortologov posameznih genov v rastlini *A. thaliana* smo pridobili tudi iz podatkovne baze Genevestigator (Hruz in sod., 2008). Vse rezultate, pri katerih je bila razlika v izražanju gena v primerjavi s kontrolo vsaj dvakratna, smo šteli za signifikantne.

3.1.3 Filogenetska analiza

Z algoritmom tBLASTx (Altschul in sod., 1990) smo celotnim nukleotidnim zaporedjem MKK, MAPK in MKP iz vrste *A. thaliana* (Ichimura in sod., 2002) iskali podobne sekvence v krompirju (Potato genome sequencing consortium, 2011). Družino genov MKK iz vrste *A. thaliana* smo dodatno primerjali tudi z geni v tobaku (*N. tabacum*), paradižniku (*Solanum lycopersicum* L.), vrsti *Nicotiana attenuata* ter vrsti *Nicotiana benthamiana*. Gene smo poimenovali z imeni njihovih ortologov v vrsti *A. thaliana*. Dodatno smo raziskali tudi baze NCBI (angl. "National Center for

Biotechnology Information"), UniProt (angl. "Universal Protein Resource"), "Plant GDB", "Potato Oligo Chip Initiative" (POCI), "The Gene Index Project" in "TIGR Plant Transcripts Assemblies".

Aminokislinske poravnave smo izvedli s pomočjo algoritma MAFFT verzije 7 (Kato in Standley, 2013). V programu MEGA5 (Tamura in sod., 2011) smo z metodo "Neighbour joining" (Saito in Nei, 1987) na podlagi aminokislinskih poravnave konstruirali filogenetska drevesa. Podporo filogenetskega drevesa smo izračunali z metodo "Bootstrap" s tisoč ponovitvami.

Analizo regulatornih domen izoliranih promotorjev smo izvedli s programom PlantCare (Lescot in sod., 2002).

Seznam možnih substratov proteina StMKK6 smo pridobili iz znanstvenega članka "Arabidopsis Interactome Network Map" (Arabidopsis Interactome Mapping Consortium, 2011).

3.2 POMNOŽEVANJE IZBRANIH GENOV

Preučevali smo MAPK in MAPK fosfataze iz krompirja sorte Rywal. Izbrali smo sedem genov: *StMKK6*, *StWIPK* (ortolog vrste *A. thaliana* *AtMAPK3*), *StMAPK4_1*, *StMAPK4_2*, *StMAPK6*, *StMAPK13* in *StMKP1*. Kot osnovo za konstruiranje oligonukleotidnih začetnikov smo uporabili nukleotidno poravnavo pripadajočih sekvenc unigenov iz eksperimenta POCI mikromrež ("POCI"), PGSC (Potato genome sequencing consortium, 2011), »The Gene Index Project«, »TIGR Plant Transcripts Assemblies« in NCBI ("National Center for Biotechnology Information").

3.2.1 Konstruiranje začetnih oligonukleotidov

Na osnovi poravnave obstoječih sekvenc smo konstruirali začetne oligonukleotide (Preglednica 1) za pomnoževanje genov *StMKK6* (POCI sonda MICRO.17148.C1), *StWIPK* (POCI sonda MICRO.633.C4), *StMAPK4_1* (POCI sonda MICRO.7088C2), *StMAPK4_2* (POCI sonda MICRO.5536.C1), *StMAPK6* (POCI sonda MICRO.633.C4), *StMAPK13* (POCI sonda MICRO.1181.C1), ter za *StMKP1* (POCI sonda BF_LBCHXXXX_0041H12_T3M.SCF). Oligonukleotidne začetnike smo konstruirali tako, da smo pokrili celoten gen od start (ATG) do stop (TAA) kodona. Da bi klonirali gene v plazmid pENTRTM/D-TOPO[®], smo prvemu oligonukleotidu pred start kodon dodali zaporedje CACC, na koncu zaporedja pa odstranili stop kodon. Da bi klonirali promotor v destinacijski plazmid, smo levi in desni oligonukleotid konstruirali tako, da je bilo prvih oziroma zadnjih 27-30 nt komplementarnih sekvenci destinacijskega plazmida na mestu, kamor je bil promotor kloniran.

Preglednica 1: Seznam oligonukleotidnih začetnikov, ki smo jih uporabili za pomnoževanje genov in promotorjev

Seznam je razdeljen na seznama oligonukleotidnih začetnikov za pomnoževanje genov ali promotorjev iz cDNA ali genomske knjižnice ter oligonukleotidnih začetnikov za pomnoževanje fragmentov za nadaljnje kloniranje. Podčrtani deli sekvenc oligonukleotidnih začetnikov za kloniranje predstavljajo sekvenco, ki je komplementarna sekvenci destinacijskega plazmida ali sekvenco za prepoznavo restriktivskega encima.

Pomnoževanje genov	
Ime začetnika	Zaporedje
WIPK_F	5-ATGGTTGATGCTAATATGGGT-3
WIPK_R	5-GCACACAAGCTAGCACGAAC-3
MKK6_F	5-ATGAAGACGACGAAGCCATT-3
MKK6_R	5-TTTTTGCTGCTAAGTAATTCATTCA-3
MKP1_F	5-ATGTTGGAGGTAGATGAGAAGGA-3
MKP1_R	5-GGTATCCGCGGTGTTTTTAT-3
MICRO.7088.C2 MAPK4_1 F	5-TCCATTTTGGGGTTGATTC-3
MICRO.7088.C2 MAPK4_1 R	5-TCTTTCAATGAGTTGGATCAGG-3
MICRO.5536.C1 MAPK4_2 F	5-ATGGAGGCAAGTTTAGGTGA-3
MICRO.5536.C1 MAPK4_2 R	5-TCTCTCAGTGAGTTGGATCTGG-3
MICRO.3797.C3 MAPK6_F	5-ATGGATGTTTCAGCTCCGCAA-3
MICRO.3797.C3 MAPK6_R	5-TTCACATGCGCTGGTATTCA-3
TA35254_4113_MAPK13_F	5-AGAGCAGAAATGGATGCTGAA-3
TA35254_4113_MAPK13_R	5-TCACTTGTTGTATCGGGATCAAAC-3
Pomnoževanje promotorjev	
Ime začetnika	Zaporedje
MKK6prom_AP1	5-TGAAGATCTATCTCCTTAGTTTCTGA-3
MKK6prom_AP2	5-TGAGTCTGAGTCCTTTCTGGTTCA-3
WIPKprom_AP1	5-GATTTTCTTAACTGCAACCATCT-3
WIPKprom_AP2	5-GCCAATAGGCATGATAGGAGGTCT-3
MKP1_AP1	5-CAGTTGGTCTAGTAATGGAAAGAG-3
MKP1_AP2	5-GCTTTGCTGTTCCATTGTGGTTT-3
F_PGSC_MKPprom	5-TGTCTGCCTTCCAGTGAGTT-3
F_PGSC_MEKprom	5-TGTCTTCGAATGGCTCCAAC-3
F_PGSC_WIPKprom	5-TTGAAAAGGTAGAACTTCTTGAAAAT-3
Kloniranje	
Ime začetnika	Zaporedje
WIPK_GW_F	5-CACCATGGTTGATGCTAATATGGGT-3
WIPK_GW_R	5-AGCATATTCAGGATTCAACGCCAA-3
MKP1_GW_F	5-CACCATGTTGGAGGTAGATGAGAA-3
MKP1_GW_R	5-CTTGACCCCAACATCTAATGC-3
MKK6_GW_F	5-CACCATGAAGACGACGAAGCCATT-3
MKK6_GW_R	5-TCTTGAAAATTTACTGGTGGTTCC-3
MAPKprom-YFP__F	5- <u>GCTAAGCTTGAGCTCTCCCATATGGTCACTATAGGGCACGCGT</u> GGT-3
WIPK_VIGS_F	5- <u>AATTT</u> GCCCTCAGAACTAAGGAG-3
WIPK_VIGS_R	5- TAAGCTCCATGAAGATGCAACTAG-3

3.2.2 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Gene smo pomnožili iz cDNA vzorca krompirja sorte Rywal, že izolirane in uporabljene v Baebler in sod., 2014. Promotorje smo pomnožili iz genomske DNA vzorca sorte Rywal ter iz genomske knjižnice sorte Santé.

V vsaki PCR reakciji je bil končni volumen reakcijske zmesi 10 μ l.

Za pomnoževanje genov iz cDNA ter za pomnoževanje genov iz plazmidov pJET smo uporabili polimerazo Velocity (Bioline). Vsaka reakcijska mešanica je vsebovala 1x HiFi pufer (vsebuje 10 mM Mg^{2+} ; Bioline), 500 μ M raztopino dNTP-jev, 0.9 μ M vsakega od oligonukleotidnih začetnikov in 0.5 enote Velocity DNA polimeraze (Bioline). Uporabili smo aparaturo za PCR, GenAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems). Verižna reakcija s polimerazo je potekala po sledečem programu:

96 °C 2 minuti		začetna denaturacija
<hr/>		
96 °C 30 sekund		denaturacija
65 °C* 30 sekund	15 ciklov	prileganje začetnih oligonukleotidov
72 °C 1 minuta/kbp		podaljševanje verige
<hr/>		
96 °C 30 sekund		denaturacija
45 °C 30 sekund	20 ciklov	prileganje začetnih oligonukleotidov
72 °C 1minuta/kbp		podaljševanje verige
<hr/>		
72 °C 10 minut		končno podaljševanje verige
4 °C		inkubacija po končani reakciji

*- v vsakem ciklu je bila temperatura prileganja začetnih oligonukleotidov za 1 °C nižja

Za pomnoževanje promotorjev iz genomske DNA smo uporabili polimerazo Phusion[®] High-Fidelity (New England Biolabs[®]). Vsaka reakcijska mešanica je vsebovala 1x Phusion HF pufer (vsebuje 10 mM Mg^{2+} ; New England Biolabs[®]), 250 μ M raztopino dNTP-jev, 0.5 μ M vsakega od oligonukleotidnih začetnikov in 0.3 enote polimeraze Phusion[®] High-Fidelity (New England Biolabs[®]). Uporabili smo aparaturo za PCR GenAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems). Verižna reakcija s polimerazo je potekala po sledečem programu:

96 °C 2 minuti		začetna denaturacija
<hr/>		
96 °C 30 sekund		denaturacija
65 °C* 30 sekund	15 ciklov	prileganje začetnih oligonukleotidov
72 °C 1 minuta/kbp		podaljševanje verige
<hr/>		

96 °C 30 sekund		denaturacija
50 °C 30 sekund	20 ciklov	prileganje začetnih oligonukleotidov
72 °C 1 minuta/kbp		podaljševanje verige
72 °C 5 minut		končno podaljševanje verige
4 °C		inkubacija po končani reakciji

*- v vsakem ciklu je bila temperatura prileganja začetnih oligonukleotidov za 1 °C nižja

Za pomnoževanje promotorjev iz genomske knjižnice smo uporabili polimerazo Advantage 2 Polymerase Mix (Clontech Laboratories, Inc.). Vsaka reakcijska mešanica je vsebovala 1x Advantage 2 PCR pufer, 500 µM raztopino dNTP-jev, 0.2 µM vsakega od oligonukleotidnih začetnikov in 1x Advantage 2 Polymerase Mix. Uporabili smo aparaturo za PCR GenAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems). Izvedli smo dvostopenjsko verižno reakcijo s polimerazo, ki je potekala v dveh korakih: primarna in sekundarna PCR reakcija. V sekundarno PCR reakcijo smo prenesli 50x redčino primarne PCR reakcije.

Primarna PCR reakcija:

94 °C 15 sekund	7 ciklov	denaturacija
72 °C 3 minute		podaljševanje verige
94 °C 15 sekund	5 ciklov	denaturacija
72 °C* 3 minute		podaljševanje verige
94 °C 15 sekund	27 ciklov	končno podaljševanje verige
67 °C 3 minute		inkubacija po končani reakciji
67 °C 4 minute		končno podaljševanje verige
4 °C		inkubacija po končani reakciji

*- v vsakem ciklu je bila temperatura za 1 °C nižja

Sekundarna PCR reakcija:

94 °C 15 sekund	5 ciklov	denaturacija
72 °C* 3 minute		podaljševanje verige
94 °C 15 sekund	30 ciklov	končno podaljševanje verige
65 °C 3 minute		inkubacija po končani reakciji

67 °C 4 minute

končno podaljševanje verige

4 °C

inkubacija po končani reakciji

3.2.2.1 Gelska elektroforeza

Prisotnost in dolžino pomnoženih fragmentov smo preverili na 1-odstotnem agaroznem gelu. Agarozo smo segreti v pufru TAE (40mM Tris-acetat, 1 mM EDTA, pH 8.0). Raztopljeni agarozni dodali 0.75 µl etidijevega bromida in vse skupaj vlili v nosilec za gel. Ohlajen gel smo prenesli v banjico za elektroforezo. V prvo vdolbino smo nanesti 5 µl označevalca velikosti Mass Ruler (Thermo Scientific). RNA ali DNA vzorec smo pred nanosom na gel zmešali z nanašalno raztopino v razmerju vzorec : nanašalna raztopina – 1:3. Nanašalna raztopina sestavlja 100ul 6x Loading Dye (Fermentas), 500 µl glicerola in 500 µl ddH₂O. Gelska elektroforeza je potekala 45-60 minut pri napetosti 100 V. Uporabljali smo napajalnik POWER/PAC 1000 (BIO-RAD). Po koncu elektroforeze smo gel slikali s sistemom GelDoc Mega (s programom UVI Photo MW, Biosystematica).

3.2.2.2 Čiščenje produktov PCR

Produkte PCR smo očistili s kompletom Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) po navodilih proizvajalca. Očiščene produkte PCR smo uporabili za pripravo plazmidnih vektorjev.

3.3 PCR V REALNEM ČASU (qPCR)

Z metodo PCR v realnem času smo določevali izražanje genov *StMKK6*, *StWIPK* in *StMKP1* iz predhodno izolirane RNA krompirjev sorte Rywal in transgenih krompirjih NahG-Rywal. Uporabili smo oligonukleotidne začetnike iz Preglednice 2.

Preglednica 2: Seznam oligonukleotidnih začetnikov za qPCR

qPCR		
Ime začetnika	Zaporedje	Referenca
MKK6_F qPCR	5-AGCAGATCAATTTTCCCCAGAA-3	Lazar in sod., 2014
MKK6_R qPCR	5-GACTCAAAAGGTCCAAAGCTGAA-3	Lazar in sod., 2014
MKK6_S qPCR	FAM/5-TCTGTTTCGTTTGTCTGCTTGCATTCAAA-3/Zen Iowa BlackTM FQ	Lazar in sod., 2014
Ime začetnika	Zaporedje	Referenca
MKP1_F qPCR	5-CAAGGCAGAATGGATGGAGTAGA-3	Baebler in sod., 2014
MKP1_R qPCR	5-GGAAGCTGTGATAAATTCTTTCATTATTCCA-3	Baebler in sod., 2014
MKP1_S qPCR	FAM/5-TTGAGACGGAAATTTT-3/NFQ	Baebler in sod., 2014
WIPK_F qPCR	5-TCATGTAAATCCATTAGCCATTGATCTTGT-3	Petek, 2012

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 2: Seznam oligonukleotidnih začetnikov za qPCR

WIPK_R qPCR	5-GGTATGGATGAGCTAATGCTTCCT-3	Petek, 2012
WIPK_S qPCR	FAM/5-ACCCTACTAGAAGAATTAC-3/MGB	Petek, 2012
COX_F	5-CGTCGCATTCCAGATTATCCA-3	Weller in sod., 2000
COX_R	5-CAACTACGGATATATAAGRRCCRRAACTG-3	Weller in sod., 2000
COX_S	FAM/5-TGCTTACGCTGGATGGAATGCCCT-3/TAMRA	Weller in sod., 2000
EF1_F	5-GGAAGCTGCTGAGATGAACAAGA-3	Baebler in sod., 2009
EF1_R	5-CTCACGTTACGCCTTAAGTTTGTC-3	Baebler in sod., 2009
EF1_S	FAM/5-TCATTCAAGTATGCCTGGGTGCT-3/TAMRA	Baebler in sod., 2009

Za vsak vzorec smo vzporedno izvedli reakcijo za določanje tarčnega in referenčnega gena. Vse vzorce smo testirali z dvema ponovitvama in dvema redčenjema in za vse reakcije uporabili TaqMan kemijo (Applied Biosystems). qPCR reakcije smo izvedli na inštrumentu ABI PRISM 9700 HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) v optičnih ploščah formata 384, ki smo jih prekrili z optičnimi adhezivnimi folijami (Applied Biosystems). Reakcijo smo izvedli pri sledečih pogojih pomnoževanja:

50 °C 2 minuti

95 °C 10 minut

95 °C 15 sekund

60 °C 1 minuta

40 ciklov

Vzorce cDNA slepo inokuliranih in s PVY okuženih rastlin sorte Rywal in NahG-Rywal smo testirali z amplikonom, specifičnim za preučevani gen, ter z amplikonom za endogeno kontrolo, citokrom oksidazo, *COX* (Weller in sod., 2000) ali elongacijski faktor 1α , *EF1* (Baebler in sod., 2009).

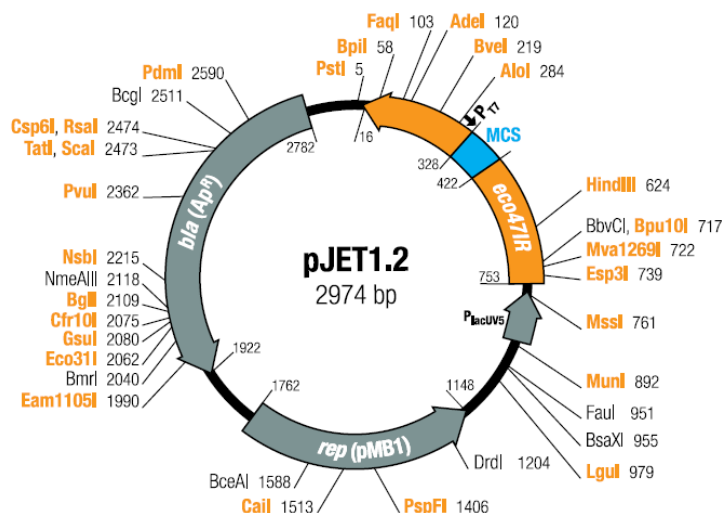
Analizo PCR reakcije smo izvedli v programu SDS 2.3 (Applied Biosystems). Fluorescenco signala smo izračunali po formuli: $\Delta Rn = Rn^+ - Rn^-$, kjer Rn^+ predstavlja emisijo fluorescence produkta v določenem času in Rn^- emisijo. Razlika v fluorescenci predstavlja signal našega vzorca z odštetim signalom ozadja (ROX). Program za vsako posamezno luknjico izriše krivuljo naraščanja fluorescence signala v času (ciklih pomnoževanja, Ct). Izmerjeno vrednost fluorescence, ki je prebila ozadje (Cq, angl. »threshold cycle), smo uporabili kot privzeto vrednost v programu. Vrednost Cq je obratno sorazmerna količini tarčne DNA v vzorcu, zato lahko na osnovi te vrednosti izračunamo relativno vsebnost DNA v vzorcu.

Izražanje genov *StWIPK* in *StMKP1* smo preverjali z 10- in 100-kratnim redčenjem ter izražanje gena *StMKK6* z 10- in 30-kratnim redčenjem.

3.4 KLONIRANJE IZBRANIH GENOV

3.4.1 Kloniranje v plazmid pJET1.2

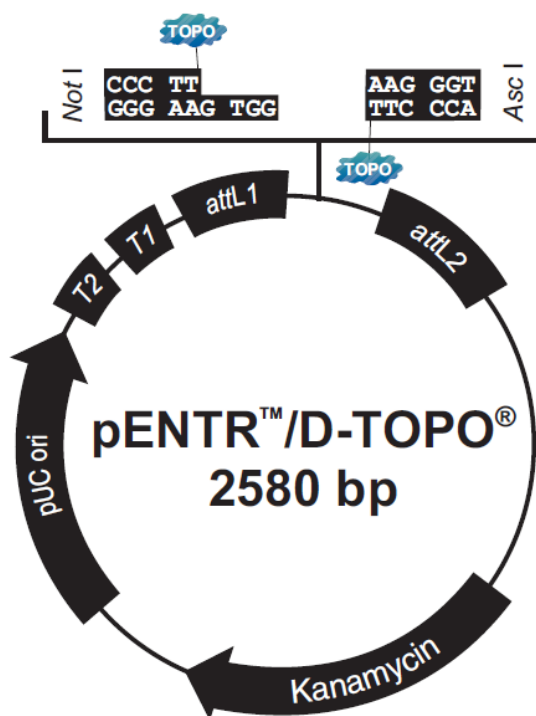
Očiščen gen smo vstavili v plazmid pJET1.2 (Slika 2) s pomočjo kompleta CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Scientific). S tem sistemom smo pripravili fragment za nadaljnje pomnoževanje v plazmide sistema Gateway.



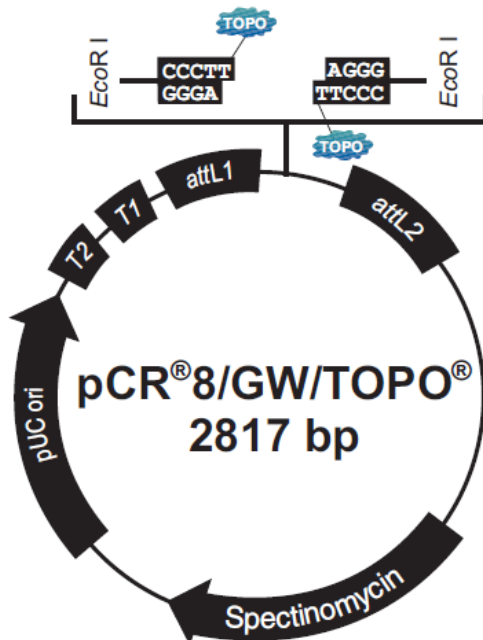
Slika 2: Shema plazmida pJET1.2
Figure 2: Scheme of the pJET1.2 plasmid

3.4.2 Kloniranje v vstopna plazmida Gateway

Po pomnoževanju genov iz plazmida pJET in čiščenju produktov PCR smo očiščene gene vstavili v plazmid pENTRTM/D-TOPO[®] (Slika 3) s pomočjo kompleta pENTRTM Directional TOPO[®] Cloning Kit (Invitrogen) ali v plazmid pCR8[®]/GW/TOPO[®] (Slika 4) kompleta pCRTM8/GW/TOPO[®] TA Cloning[®] Kit (Invitrogen). Plazmida sta del sistema Gateway, ki omogoča usmerjeno kloniranje genov v Gateway destinacijske plazmide preko kompatibilnih vstopnih plazmidov pENTR ali pCR8. Protokol kloniranja smo izvedli po navodilih proizvajalca. V reakcijski mešanici je bilo razmerje plazmida in gena 1:1, dodali smo tudi raztopino soli (24 mM NaCl in 1.2 mM MgCl₂). Po koncu reakcije smo pridobili plazmide pENTR_MKK6, pENTR_WIPK, pENTR_MKP1, pCR8_MKK6, pCR8_MAPK4_1, pCR8_MAPK4_2, pCR8_MAPK6 in pCR8_MAPK13.



Slika 3: Shema plazmida pENTR™/D-TOPO®
Figure 3: Scheme of the pENTR™/D-TOPO® plasmid



Slika 4: Shema plazmida pCR®8/GW/TOPO®
Figure 4: Scheme of the pCR®8/GW/TOPO® plasmid

3.4.3 Transformacija bakterije *Escherichia coli*

S produkti reakcij kloniranja genov v plazmide pENTR in pCR8 smo transformirali kemijsko kompetentne celice bakterij *E. coli* seva One Shot[®] TOP 10 (Invitrogen). V epruveto s 50 µl kompetentnih celic smo dodali 2 µl plazmida in mešanico na ledu inkubirali 30 minut. Nato smo celice prenesli za 30 sekund v vodno kopel s temperaturo 42 °C in jih tretirali z vročinskim šokom. Po šoku smo celice takoj prenesli nazaj na led in jim dodali 250 µl S.O.C. medija (Invitrogen) in epico inkubirali na 37 °C v inkubatorju s stresanjem (250 rpm). Suspenzijo bakterij smo nato enakomerno razmazali na selekcijsko gojišče LB (10 g/l bakto triptona, 5 g/l kvasnega ekstrakta, 5 g/l NaCl, 15 g/l agarja) s kanamicinom (50 µg/ml) za bakterije transformirane s plazmidi pENTR ter s spektinomycinom (75 µg/ml) za bakterije transformirane s plazmidi pCR8. Naslednji dan smo preverili prisotnost plazmidov z vključenimi geni v zraslih bakterijskih kolonijah z reakcijo PCR. Uporabili smo polimerazo KAPA2G Robust HotStart (Kapa Biosystems), protokol, ki smo ga uporabili za PCR, je opisan v spodnji tabeli. Prisotnost fragmentov prave dolžine smo preverili na agaroznem gelu.

95 °C 10 minuti		začetna denaturacija
95 °C 30 sekund		denaturacija
Tm 30 sekund	30 ciklov	prileganje začetnih oligonukleotidov
72 °C 1 minuta/kbp		podaljševanje verige
72 °C 5 minut		končno podaljševanje verige
4 °C		inkubacija po končani reakciji

3.4.4 Izolacija plazmidov in sekvenciranje

Uspešno transformirane bakterije smo čez noč namnožili v 5 ml gojišča LB s kanamicinom (plazmidi pENTR) ali spektinomycinom (plazmidi pCR8). Po 16-ih urah množenja smo iz bakterij izolirali plazmide s kompletom Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) in sledili navodilom proizvajalca.

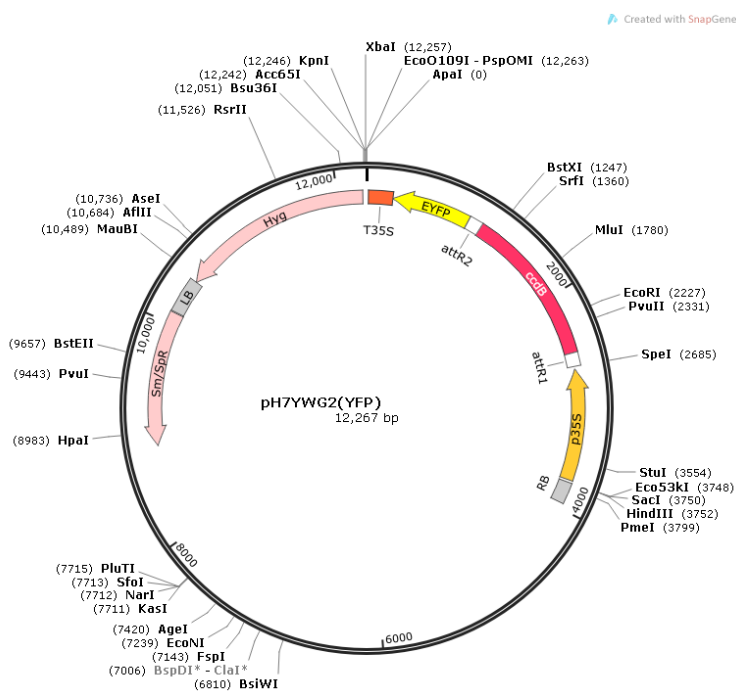
Sekvenco vključkov v izoliranih plazmidih smo preverili s sekvenciranjem v podjetju GATC Biotech. Pridobljena zaporedja smo s programom Bioedit primerjali s sekvencami, uporabljenimi za začetno konstruiranje oligonukleotidnih začetnikov. Izključili smo vse plazmide, ki so imeli vključke z nepravilnim zaporedjem.

3.4.5 Kloniranje v ekspresijske plazmide za študij lokalizacije in interakcij

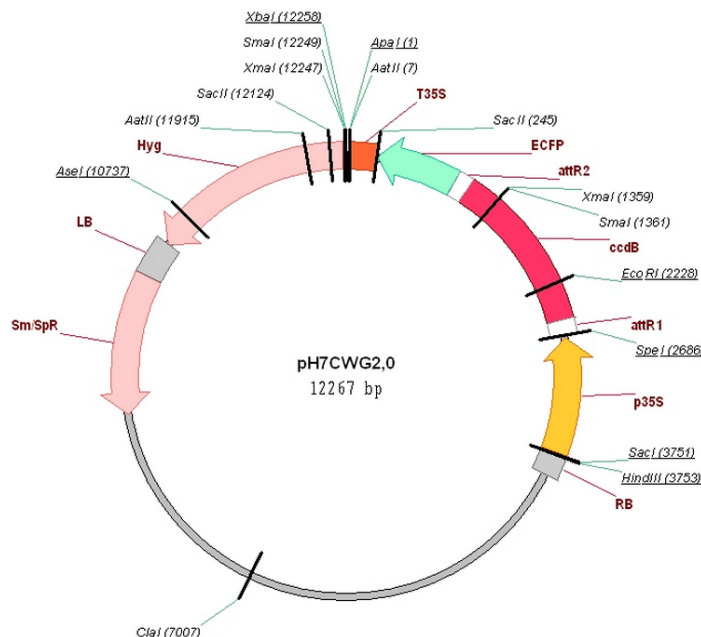
Potrjene plazmide pENTR_MKK6, pENTR_WIPK in pENTR_MKP1 smo vstavili v ekspresijska plazmida pH7YWG2 (Slika 5) in pH7CWG2 (Slika 6) (Karimi in sod., 2005) za fuzijo gena z YFP ali CFP. S kompletom Gateway[®] LR Clonase[™] II Enzyme Mix (Invitrogen) smo po navodilih proizvajalca izvedli rekombinazno reakcijo med vstopnimi pENTR plazmidi ter ekspresijskima plazmidoma. Rezultati reakcij so bili ekspresijski plazmidi pH7YWG2_MKK6, pH7YWG2_WIPK, pH7YWG2_MKP1, pH7CWG2_MAPKK6, pH7CWG2_WIPK in pH7CWG2_MKP1.

Potrjeni plazmid pCR8_MKK6 smo vstavili v ekspresijski plazmid p35S_SPYCE (Slika 7) za fuzijo gena s C-terminalnim koncem YFP. Potrjene plazmide pCR8_MAPK4_1, pCR8_MAPK4_2, pCR8_MAPK6 in pCR8_MAPK13 smo vstavili v ekspresijski plazmid p35S_SPYNE (Slika 8) za fuzijo gena z N-terminalnim koncem YFP. Rezultati reakcij so bili ekspresijski plazmidi p35S_SPYCE_MKK6, p35S_SPYNE_MAPK4_1, p35S_SPYNE_MAPK4_2, p35S_SPYNE_MAPK6 in p35S_SPYNE_MAPK13.

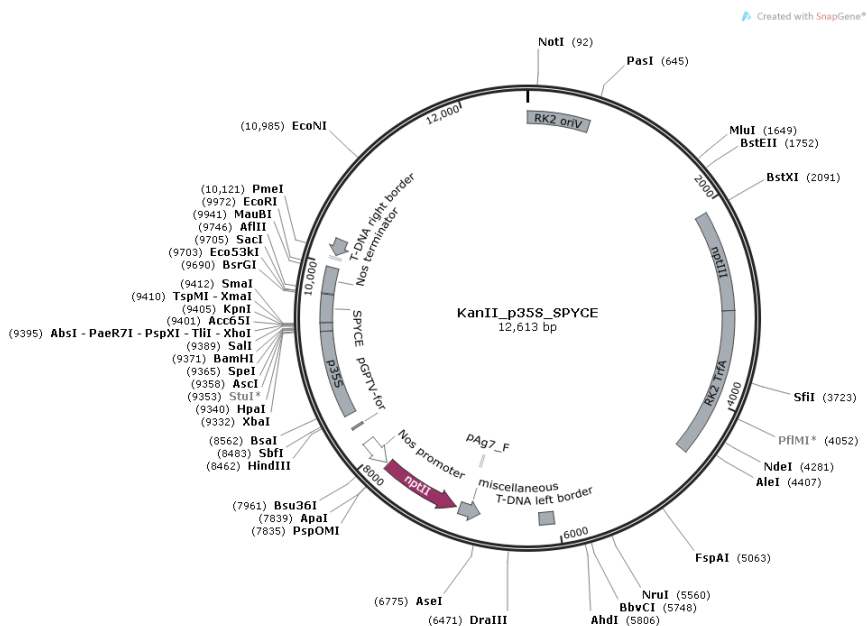
Po rekombinazni reakciji smo s plazmidi transformirali bakterije *E. coli*, kot je opisano v poglavju 3.4.3, ter jih izolirali kot je opisano v poglavju 3.4.4. Plazmide, pripravljene za biolistično bombardiranje, smo namnožili v 50 ml gojišča LB. Po 16-ih urah množenja smo iz bakterij izolirali plazmide s kompletom Wizard[®] Plus SV Midipreps DNA Purification System (Promega) in pri tem upoštevali navodila proizvajalca.



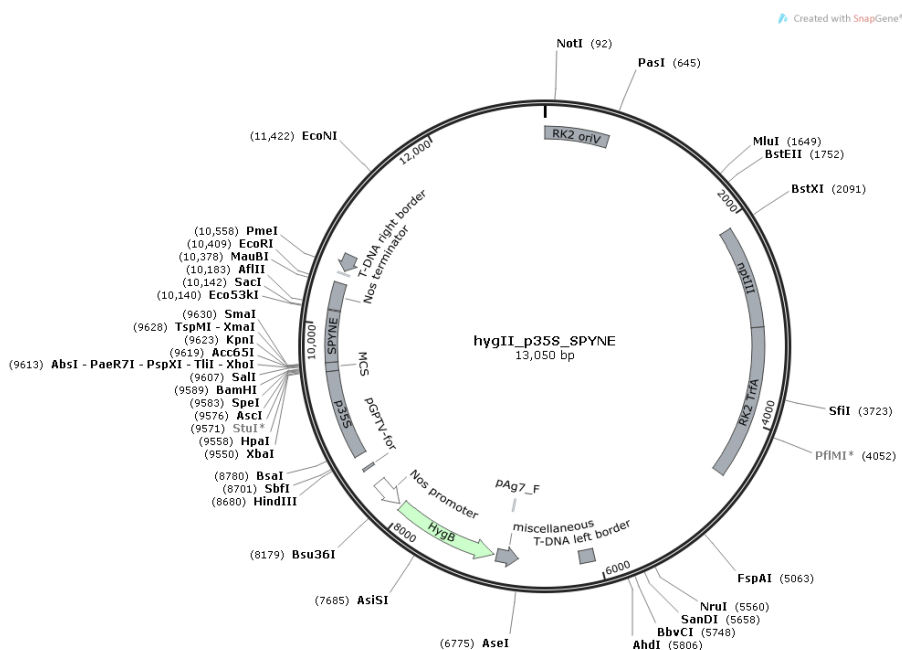
Slika 5: Shematski prikaz binarnega ekspresijskega plazmida za fuzijo gena z YFP (pH7YWG2)
Figure 5: Scheme of the binary expression plasmid (pH7YWG2) with the fusion protein YFP



Slika 6: Shematski prikaz binarnega ekspresijskega plazmida za fuzijo gena s CFP (pH7CWG2)
Figure 6: Scheme of the binary expression plasmid (pH7CWG2) with the fusion protein CFP



Slika 7: Shematski prikaz binarnega ekspresijskega plazmida za študij interakcij med proteini z N-terminalnim koncem proteina YFP (p35S_SPYNE)
Figure 7: Scheme of the binary expression plasmid (p35S_SPYNE) with the N-terminal end of the YFP protein for the interaction studies



Slika 8: Shematski prikaz ekspresijskega plazmida za študij interakcij med proteini s C-terminalnim koncem proteina YFP (p35S_SPYCE)
Figure 8: Scheme of the binary expression plasmid (p35S_SPYCE) with the C-terminal end of the YFP protein for the interaction studies

3.4.6 Kloniranje v ekspresijski plazmid za študij utišanja gena *StWIPK* z metodo VIGS

Gen *StWIPK* smo v krompirju vrste *Solanum venturii* utišali z metodo VIGS oziroma »z virusno induciranim utišanjem gena« (angl. »virus-induced gene silencing»). Fragment za utišanje gena *WIPK*, dolžine 519 bp, smo pomnožili iz plazmida pJET z oligonukleotidnimi začetniki iz Preglednice 1 (*WIPK_VIGS_F* in *WIPK_VIGS_R*). Levemu oligonukleotidnemu začetniku smo dodali štiri nukleotide za prepoznavo z restrikcijskim encimom EcoRI ter desnemu za prepoznavo z encimom XbaI. Fragment smo klonirali v ekspresijski plazmid za utišanje pTRV2 (Slika 9).

Restrikcija plazmidov pJET in pTRV2:

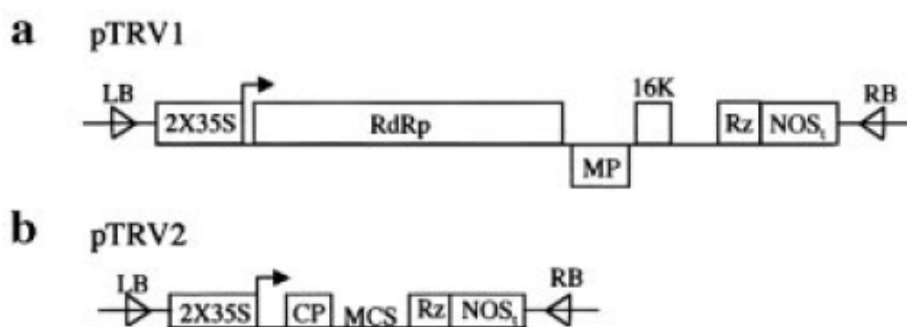
Plazmida pTRV2 in pJET s fragmentom gena *StWIPK* smo razrezali z restrikcijskima encimoma XbaI in EcoRI. V reakcijo smo dodali 8 µl plazmida pTRV2 (100 ng/µl), 1 µl encima XbaI (New England Biolabs), 1 µl encima EcoRI (New England Biolabs), 2 µl 10x NEB pufra 2.1 (New England Biolabs), 0.2 µl 100x BSA in 7.8 µl ddH₂O. Reakcijo smo inkubirali 1 uro pri 37 °C in jo nato prekinili z inkubacijo pri 65 °C za 20 minut. Produkte restrikcije smo očistili po protokolu, opisanem v poglavju 3.2.2.2.

Ligacijska reakcija:

Ligacijo izrezanega in očiščenega fragmenta WIPK in plazmida pTRV2 smo izvedli v reakcijski mešanici s 3 μ l plazmida pTRV (40 ng/ μ l), 1 μ l fragmenta WIPK (25 ng/ μ l), 10x pufra za ligacijo (Fermentas), 0.25 μ l T4 DNA ligaze (Fermentas) in 13.75 μ l ddH₂O. Reakcijo smo 10 minut inkubirali pri 22 °C.

Za transformacijo bakterij *E. coli* smo uporabili 5 μ l ligacijske reakcije. Prisotnost fragmentov v bakterijskih celicah smo preverili z reakcijo PCR. Postopka sta opisana v poglavju 3.4.3.

Po uspešni transformaciji smo plazmide pTRV2_WIPK namnožili in očistili po postopku, opisanem v poglavju 3.4.4. Z očiščenimi plazmidi smo transformirali bakterije vrste *Agrobacterium tumefaciens*.



Slika 9: Shematski prikaz ekspresijske kasete v plazmidu za utišanje tarčnega gena s sistemom VIGS

(a) Ekspresijska kasete pTRV1 s komponentami virusa TRV. (b) Ekspresijska kasete pTRV2 z mestom za kloniranje fragmenta.

Figure 9: Scheme of the plasmid expression cassette for the VIGS

(a) Expression cassette pTRV1 with parts of the TRV virus. (b) Expression cassette pTRV2 with multiple cloning site (MCS).

3.4.7 Transformacija bakterije *Agrobacterium tumefaciens* z ekspresijskimi plazmidi

Ekspresijske plazmide za preučevanje lokalizacije (pH7YWG2_MKK6, pH7YWG2_WIPK, pH7YWG2_MKP1, pH7CWG2_MKK6, pH7CWG2_WIPK, pH7CWG2_MKP1), interakcij (p35S_SPYCE_MKK6, p35S_SPYNE_MAPK4_1, p35S_SPYNE_MAPK4_2, p35S_SPYNE_MAPK6, p35S_SPYNE_MAPK13) in utišanja (pTRV2_WIPK) smo elektroporirali v elektrokompetentne celice *A. tumefaciens*, sev GV3101. Pripravili smo tudi bakterijo *A. tumefaciens* s plazmidi, uporabljenimi v eksperimentih kot kontrole: plazmida pH7YWG2 in pH7CWG2 za lokalizacijske eksperimente, p35S_SPYNE-bZIP in p35S_SPYCE-bZIP za preučevanje

interakcij med proteini in plazmide pTRV2_PDS, pTRV2 in pTRV1 za eksperimente utišanja gena *StWIPK*.

V epruveto s kompetentnimi celicami bakterije *A. tumefaciens* smo dodali 1 μ l plazmida (oziroma največ 150 ng) in mešanico prenesli v ohlajeno kiveto. Bakterije smo elektroporirali 4-5 milisekund z napetostjo 2 kV. Takoj po elektroporaciji smo dodali 1 ml gojišča YM (0.4 g/l kvasnega ekstrakta, 10 g/l manitola, 0.1 g/l NaCl, 0.2 g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ in 0.5 g/l $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$) in suspenzijo prenesli v centrifugirko. Bakterijsko suspenzijo smo inkubirali na stresalniku (250 rpm) 3 ure pri 30 °C. Po končani inkubaciji smo suspenzijo razmazali na selekcijsko gojišče YM z antibiotikoma rifampicinom (25 μ g/ml) in kanamicinom (50 μ g/ml) za ekspresijske plazmide za lokalizacijske študije in študije utišanja (VIGS) ter na selekcijsko gojišče YM z antibiotikoma rifampicinom (25 μ g/ml) in spektinomycinom (75 μ g/ml) za ekspresijske plazmide za študij interakcij. Uspešnost transformacije bakterij smo preverili po dveh dneh. Prisotnost plazmidov z vključki smo preverili z reakcijo PCR, opisano v poglavju 3.4.3.

Uspešno transformirane bakterije smo čez noč namnožili v tekočem gojišču LB s primernimi antibiotiki. Po 16-ih urah gojenja smo iz dela suspenzije pripravili trajno kulturo (750 μ l bakterijske suspenzije in 750 μ l 50-odstotnega glicerola), in jo shranili v zamrzovalniku pri -80 °C. To kulturo bo nadalje uporabili za prehodno transformacijo rastlin z agroinfiltracijo.

3.5. RASTLINSKI MATERIAL ZA FUNKCIJSKE ANALIZE GENOV

3.5.1 Priprava krompirjev sorte Rywal za analizo izražanja genov z mikromrežami

Eksperiment odziva krompirja na okužbo s PVY je bil izveden na krompirju sorte Rywal in transgenem krompirju NahG-Rywal, z vnešenim transgenom *NahG*, ki kodira encim salicilat hidrosilazo. Rastline obeh genotipov so rastle v kontroliranih pogojih (16/8 h dnevno-nočnega cikla pri 20 °C). Štiri tedne stare rastline so bile inokulirane s homogenatom tobaka vrste *Nicotiana tabacum*, sorte Samsun, okužene z različkom virusa PVY, PVY^{N-Wilga}. Trije spodnji listi rastlin so bili popršeni s kremenčevim peskom in podrgnjeni z gazo, predhodno pomočeno v homogenat s PVY okuženega tobaka. Po 10-ih minutah so bili listi sprani z vodo iz vodovoda. Slepno inokulirane rastline so bile namesto z okuženim homogenatom podrgnjene samo z vodo iz vodovoda (Baebler in sod., 2014).

Inokulirani listi so bili pobrani v treh časovnih točkah: 1, 3 in 6 dni po inokulaciji. Iz okuženih listov je bila izolirana RNA po protokolu, opisanem v Baebler in sod. 2009. Izražanje genov je bilo analizirano s pomočjo POCI (POCI, angl. »Potato Chip Oligo

Iniciative«) mikromrež (Agilent) (Kloosterman et al., 2008). Ekspresija genov v okuženih listih je bila primerjana s kontrolo - ekspresijo genov v slepo inokuliranih listih.

3.5.2 Priprava rastlin vrste *N. benthamiana* in vrste *S. venturii* za funkcijsko analizo genov s prehodno transformacijo

3.5.2.1 Priprava rastlin vrste *N. benthamiana* za preučevanje lokalizacije izbranih proteinov in za preučevanje interakcij

Rastline vrste *N. benthamiana* smo tri do štiri tedne vzgajali v rastni komori v sledečih pogojih: pri 75 ± 2 -odstotni relativni zračni vlažnosti in pri temperaturi 22 ± 2 °C tekom 16-urne svetlobe in pri 20 ± 2 °C tekom 8-urne teme. Gostota pretoka fotonov v komori je bila $120-150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (žarnica Osram L36/W77). Rastline smo zalivali z vodo iz vodovoda.

Z virusom PVY^{NTN} smo inokulirali tri tedne stare rastline, osem dni po inokulaciji pa smo inokulirane liste še agroinfiltrirali s konstrukti za sledenje proteinov ali s konstrukti za preverjanje interakcij.

Za mehansko inokulacijo smo rastline razdelili v tri skupine:

- neinokulirane,
- slepo inokulirane in
- rastline inokulirane s PVY.

Rastline smo inokulirali s homogenatom tkivnih kultur krompirja sorte Pentland, in sicer s homogenatom zdravih rastlin ter s homogenatom rastlin, okuženih z virusom PVY^{NTN}.

Rastlinski material smo homogenizirali v pufri za mehansko inokulacijo (2.6 mM NaH₂PO₄, 15.2 mM Na₂HPO₄, 0.1 odstotka polivinilpirolidona, pH 7.6). Pufri smo dodali rastlinski material v razmerju 5 ml pufra na 1 g sveže rastlinske mase. Pred uporabo smo homogenat 5 minut inkubirali.

Rastlinam smo označili tri spodnje liste in jih popršili s karborundom. Nato smo z 1.5 ml pasteurjevo kapalko vsak list pokapali s tremi kapljami homogenata in ga s prsti nežno vtrli v list. Po 10-ih minutah inkubacije smo liste sprali z vodo iz vodovoda.

Prehodna transformacija rastlin z agroinfiltracijo:

Osem dni po mehanski inokulaciji rastlin smo inokulirane liste še agroinfiltrirali z bakterijami *A. tumefaciens*, transformiranimi z ekspresijskimi plazmidi za sledenje lokalizacije proteinov ali z ekspresijskimi plazmidi za preverjanje interakcij.

Bakterije *A.tumefaciens* smo 16 ur množili v 5 ml gojišča LB s primernimi antibiotiki. Nato smo 500 μ l kulture prenesli v 50 ml svežega gojišča LB z antibiotiki in bakterije gojili čez noč. Ko je kultura dosegla optično gostoto OD₆₀₀ med 0.8-1.2 smo jo centrifugirali 10 minut pri 4 °C in 10 000 rpm. Celice smo resuspendirali v 10 ml gojišča LB in jih inkubirali na ledu 10 minut. Ponovili smo centrifugiranje in celice znova resuspendirali v 0.2 mM acetosiringonu (39.3 mg/ml acetosiringona raztopljenega v DMSO za 200 mM založno raztopino) do OD₆₀₀ 0.8. Do agroinfiltracije smo suspenzijo inkubirali na ledu.

Za testiranje interakcij smo pripravili mešanice agrobakterj z različnimi kombinacijami konstruktov: p35S_SPYCE_MKK6 in p35S_SPYNE_MAPK4_1, p35S_SPYCE_MKK6 in p35S_SPYNE_MAPK4_2, p35S_SPYCE_MKK6 in p35S_SPYNE_MAPK6 ter p35S_SPYCE_MKK6 in p35S_SPYNE_MAPK13. Kombinacija plazmidov p35S_SPYNE-bZIP in p35S_SPYCE-bZIP nam je služila kot pozitivna kontrola interakcije.

Bakterije smo v liste agroinfiltrirali s pomočjo siringe preko listnih rež spodnje povrhnjice. Infiltrirali smo celotno površino lista. Agroinfiltrirali smo liste treh intaktnih rastlin, treh slepo inokuliranih rastlin ter liste rastlin, inokuliranih s PVY^{NTN}. 72 ur po agroinfiltraciji spodnje povrhnjice listov vrste *N. benthamiana* smo epidermalne celice listne povrhnjice opazovali pod konfokalnim mikroskopom.

3.5.2.2 Priprava rastlin vrste *N. benthamiana* in *S. venturii* za preučevanje vpliva utišanja gena *StWIPK* (VIGS)

Eksperiment učinka utišanja gena *StWIPK* na širjenje virusa PVY smo izvedli na vrstah *N. benthamiana* in *S. venturii*.

Rastline krompirja *S. venturii* smo razmnožili z nodijsko kulturo in gojili v epruveh v 10 ml MS gojišča (Murashige in Skoog, 1962). Tkivne kulture smo vzgajali v rastni komori v sledečih pogojih: pri 75 \pm 2-odstotni relativni zračni vlažnosti in temperaturi 19 \pm 2 °C tekom 16-urne svetlobe in pri temperaturi 17 \pm 2 °C tekom 8-urne teme. Gostota pretoka fotonov je bila 120-150 μ mol m⁻²s⁻¹ (žarnica Osram L36/W77).

Rastline smo vzgajali tri do štiri tedne v rastni komori pri 75 \pm 2-odstotni relativni zračni vlažnosti in pri temperaturi 22 \pm 2°C tekom 16-urne svetlobe in 20 \pm 2°C tekom 8-urne teme. Gostota pretoka fotonov v komori je bila 120-150 μ mol m⁻²s⁻¹ (žarnica Osram L36/W77). Rastline smo zalivali z vodo iz vodovoda.

Eksperimentalne rastline smo inokulirali s homogenatom listov vrste *Nicotiana glauca*, okužene z virusom PVY^N, označenim z zelenim fluorescenčnim proteinom (PVY^N-GFP) (Rupar in sod., 2014).

Prehodna transformacija rastlin z agroinfiltracijo:

2 ml gojišča LB s primernim antibiotikom smo inokulirali z *A. tumefaciens*, transformiranimi s plazmidi pTRV2_WIPK, pTRV2_PDS, pTRV2 in pTRV1. Bakterije smo inkubirali 16 ur pri 30 °C v inkubatorju s stresanjem (200 rpm). Po končani inkubaciji smo izmerili OD₆₀₀. Izračunali smo vrednost »z« po formuli $z = 80000 / 2^{(\Delta t/2)}$, kjer »t« predstavlja čas (v urah) inokulacije v LB gojišču. Nato smo izračunali še vrednost »x« po formuli $x = z / OD_{600}$. Izračunan volumen suspenzije (x) smo prenesli v 15 ml gojišča YEB (5 g/l govejega ekstrakta, 5 g/l bakto peptona, 5 g/l saharoze, 1 g/l kvasnega ekstrakta, 2 ml 1M MgSO₄). Suspenzijo smo inkubirali 16 ur pri 30 °C v inkubatorju s stresanjem (200 rpm). Bakterije smo centrifugirali 5 minut na 5000 rpm. Pelet smo resuspendirali v gojišču MMA (200 g/l saharoze, 5g/l MS soli brez vitaminov (Duchefa Biochemie), 1.95g/l MES, 1 ml 200 mM acetosiringona; pH=5.6) do optične gostote OD₆₀₀=0.3. Pripravili smo mešanice suspenzij s pTRV2_WIPK in pTRV1, pTRV2_PDS in pTRV1 ter pTRV2_prazen in pTRV1. Suspenzije smo inkubirali 1 uro pri sobni temperaturi.

Bakterije smo s siringo infiltrirali v spodnje 3 liste sledečih serij rastlin:

- v 2 rastlini vrste *N. benthamiana* bakterije z mešanico plazmidov pTRV2_PDS in pTRV1,
- v 2 rastlini vrste *N. benthamiana* bakterije z mešanico plazmidov pTRV2_prazen in pTRV1,
- v 3 rastline vrste *S. venturii* bakterije z mešanico plazmidov pTRV2_WIPK in pTRV1 (za inokulacijo z virusom PVY-GFP),
- v 3 rastline vrste *S. venturii* bakterije z mešanico plazmidov pTRV2_prazen in pTRV1 (za inokulacijo z virusom PVY-GFP),
- v 3 rastline vrste *S. venturii* bakterije z mešanico plazmidov pTRV2_WIPK in pTRV1 (za slepo inokulacijo),
- v 3 rastline vrste *S. venturii* bakterije z mešanico plazmidov pTRV2_prazen in pTRV1 (za slepo inokulacijo) in
- v 3 rastline vrste *S. venturii* bakterije z mešanico plazmidov pTRV2_PDS in pTRV1 (za slepo inokulacijo).

Treh rastlin vrste *S. venturii* nismo agroinfiltrirali, ampak zgolj okužili s PVY-GFP, 2 rastlini vrste *S. venturii* pa smo pustili neinfiltrirani in neinokulirani.

Rastline smo po treh tednih mehansko inokulirali s sokom listov rastline *N. clevelandii*, okužene s PVY^N-GFP. Širjenje virusa v zgornjih, neinokuliranih listih, smo preverili s konfokalnim mikroskopom v časovnih točkah 18 dpi, 21 dpi in 27 dpi.

3.5.3 Konfokalna mikroskopija

S konfokalnim mikroskopom smo tekom študije lokalizacije spremljali lokalizacijo proteinov StMKK6, StWIPK in StMKP1 ter širjenju virusa PVY^N-GFP tekom študije utišanja gena *StWIPK*.

Pri spremljanju lokalizacije proteinov smo tretirane liste pobrali 48 do 72 ur po agroinfiltraciji in fluorescenčni signal preučevanih proteinov opazovali s konfokalnim mikroskopom. Pri spremljanju širjenja virusa PVY^N-GFP tekom študije utišanja gena *StWIPK* smo tretirane liste pobrali in opazovali pod konfokalnim mikroskopom v treh časovnih točkah: 18, 21 in 27 dpi.

Delo z mikroskopom je potekalo na Kemijskem inštitutu v Ljubljani. Vzorce smo opazovali z laserskim konfokalnim mikroskopom Leica TCS SP5, povezanim z Leica DMI 6000 CS invertnim mikroskopom (Leica Microsystems) z HC PL FLUOTAR 10.0x0.30 DRY objektivom. Fluorescenčne proteine smo ekscitirali z argonovim (CFP, GFP, YFP) ali helij/neonovim laserjem (RFP). Nastavljene valovne dolžine za ekscitacijo in detekcijo fluorescence v posameznih proteinih so v Preglednici 3. Autofluorescenco smo spremljali v območju med 690-750 nm. Slike smo obdelali v programu Leica LAS AF Lite (Leica Microsystems).

Preglednica 3: Seznam uporabljenih fluorescenčnih proteinov z ekscitacijsko in emisijsko valovno dolžino

Fluorescenčni protein	Ekscitacija [nm]	Emisija [nm]
CFP	458	475-495
GFP	488	505-520
YFP	514	525-550
RFP	543	570-630

4 REZULTATI

4.1 ANALIZA REZULTATOV IZ PODATKOVNIH BAZ

4.1.1 Diferencialno izražene krompirjeve MAPK, MKK in MKP v preobčutljivostnem odzivu na PVY

Iz že objavljenih rezultatov eksperimenta mikromrež na odzivu krompirja sorte Rywal in transgenega krompirja NahG-Rywal (okvarjena sintezna pot SA) na okužbo z virusom PVY (Baebler in sod., 2014), smo na podlagi anotacije genov, ki jih tarčijo sonde mikromrež, izbrali vse diferencialno izražene MKKK (Slika 10A), MKK (Slika 10B), MAPK (Slika 10C) ter MKP (Slika 10D).

V skupini MKKK (Slika 10A) smo našli osemnajst sond, ki tarčijo štirinajst skupin diferencialno izraženih potencialnih paralogov (Fito ID). Prepoznati je mogoče tri vzorce izražanja tekom vseh treh opazovanih časovnih točk: skupino genov, ki ima v primerjavi s slepo inokulirano kontrolo sorte Rywal višje izražanje v prvem in tretjem dnevu po okužbi (1 in 3 dpi, angl. »days post infection) in nižje izražanje v 6 dpi v transgenih NahG-Rywal rastlinah. Druga skupina genov ima v primerjavi s kontrolo nižje izražanje v 1 dpi in 3 dpi v sorti Rywal in 1 dpi v transgenem krompirju NahG-Rywal, nato pa v 6 dpi višje v transgenem NahG-Rywalu. Zadnja skupina genov ima v primerjavi z neokuženimi kontrolami višje izražanje v vseh treh časovnih točkah, tako v Rywalu kot v NahG-Rywalu, vendar najmočneje v 1 in 3 dpi pri Rywalu ter 3 in 6 dpi pri NahG-Rywalu.

Skupino MKK (Slika 10B) predstavljajo tri diferencialno izražene sonde, ki tarčijo tri gene. Trije geni (*StMKK1/2*, *StMKK4/5* in *StMKK7/9*) imajo v primerjavi s kontrolo višje izražanje v vseh časovnih točkah, dva najmočneje v transgenem NahG-Rywalu (*StMKK1/2* in *StMKK7/9*), medtem ko je *StMKK4/5* razmeroma enakomerno višje izražen v vseh treh časovnih točkah obeh genotipov. Največje razlike v izražanju med okuženimi in neokuženimi rastlinami imata gena *StMKK3* in *StMKK6*, z nasprotnima vzorcema izražanja v sorti Rywal.

Skupino MAPK predstavlja triindvajset diferencialno izraženih sond, ki tarčijo enajst skupin potencialnih paralogov, s tremi različnimi vzorci izražanja (Slika 10C). Ena skupina genov ima v primerjavi s slepo inokuliranimi kontrolami nižje izražanje v prvih dveh časovnih točkah v Rywalu (1 in 3 dpi), v NahG-Rywalu pa le v zadnji, 6 dpi, časovni točki. Druga skupina ima podoben vzorec izražanja kot prva, vendar je v NahG-Rywalu izražanje genov zavrto v 1 dpi. Izražanje tretje skupine genov je večinoma zavrto v primerjavi s kontrolo, a je najmočnejše v 1 in 3dpi v Rywalu in 1 dpi v NahG-Rywalu.

V skupini MKP (Slika 10D) smo našli samo tri sonde, ki tarčijo le eno izmed petih MAPK fosfataz, *StMKP1*. Vse tri sonde kažejo močno nižje izražanje kot v kontroli v Rywalu pri 1 in 3 dpi, v zadnjih dveh točkah NahG-Rywala (3 in 6 dpi) pa je izražanje gena močno inducirano.

A

Sonda	Gen	Fito ID	Rywal			NahG-Rywal		
			1dpi	3 dpi	6 dpi	1 dpi	3 dpi	6 dpi
bf_suspxxxx_0008G12.t3m.scf	Ser/Thr kinaza	Sotub05g015860	-0.99	-0.66	0.55	-0.52	0.05	1.11
cSTB45O9TH	Ser/Thr kinaza	Sotub01g041560	-0.44	-0.17	0.19	-0.31	0.41	1.12
bf_ivroobxx_0036d10.t3m.scf	Ser/Thr kinaza	Sotub02g031890	0.16	0.40	0.24	0.20	1.15	2.36
MICRO.15470.C1	kinezin/MAPKKK3	Sotub01g036760	1.44	1.42	0.30	0.40	-0.75	-1.62
cSTS11C3TH	Ser/Thr kinaza	Sotub07g029020	1.14	0.73	0.45	-0.13	-0.68	-1.20
MICRO.13514.C1	Ser/Thr kinaza	Sotub06g024110	1.22	0.96	-0.37	0.43	-0.47	-1.05
POAE829TP	Ser/Thr kinaza	Sotub07g019110	0.26	0.50	-0.31	0.44	-1.01	-1.60
MICRO.16983.C1	Ser/Thr kinaza	Sotub02g032430	-0.35	-0.75	-0.97	-0.07	-0.92	-2.02
MICRO.9292.C1	Ser/Thr kinaza/MAPKKK	Sotub11g005440	-2.84	-3.19	-0.37	-1.10	0.69	2.51
MICRO.16036.C1	Ser/Thr kinaza	Sotub07g024290	-2.24	-2.88	0.08	-1.51	0.00	1.89
POAE084TP	Ser/Thr kinaza	Sotub06g015880	-2.56	-3.16	0.07	-1.80	-0.35	1.32
cSTS22M23TH	Tir-nbs-lrr rezistenčni protein	Sotub11g014870	-2.39	-2.28	0.37	-1.46	0.17	1.75
cSTB44I15TH	Ser/Thr kinaza	Sotub08g029230	-2.31	-2.40	-0.29	-1.18	0.00	1.33
MICRO.9710.C3	Ser/Thr kinaza	Sotub05g005910	-1.95	-2.13	-0.24	-1.09	-0.03	1.12
PPCAO19TH	Ser/Thr kinaza	Sotub06g015880	-1.82	-2.33	-0.50	-1.01	-0.34	0.53
bf_ivroobxx_0018c07.t3m.scf	Ser/Thr kinaza	Sotub06g015880	-1.22	-1.32	-0.20	-0.61	-0.09	0.91
MICRO.14866.C1	Ser/Thr kinaza	Sotub07g019110	1.24	2.24	0.22	0.81	-0.06	0.61
MICRO.17670.C1	Ser/Thr kinaza	Sotub02g031890	1.03	2.13	0.93	1.67	2.04	3.26

B

Sonda	Gen	Fito ID	Rywal			NahG-Rywal		
			1 dpi	3 dpi	6 dpi	1 dpi	3 dpi	6 dpi
MICRO.6723.C1	MKK1/2	Sotub12g010200	-0.16	0.10	0.25	0.17	0.85	0.95
MICRO.610.C1	MKK3	Sotub03g024510	-1.23	-1.49	0.02	-0.37	-0.02	0.77
MICRO.14487.C2	MKK4/5	Sotub03g034170	0.50	0.65	0.95	0.39	0.39	0.66
MICRO.17148.C1	MKK6	Sotub03g033030	1.40	1.74	-0.17	0.90	0.77	0.65
MICRO.12818.C1	MKK7/9	Sotub03g022560	-0.38	-0.15	0.48	0.27	0.96	1.01

C

Sonda	Gen	Fito ID	Rywal			NahG-Rywal		
			1 dpi	3 dpi	6 dpi	1 dpi	3 dpi	6 dpi
MICRO.5536.C1	MAPK4_2	Sotub01g032370	-0.58	0.67	0.52	-0.02	1.57	1.66
MICRO.633.C4	WIPK	PGSC0003DMG400030058	-1.26	-0.27	0.49	-0.40	0.97	2.54
MICRO.1181.C1	MAPK13	Sotub05g021030	-1.63	-1.41	0.11	-0.97	1.02	1.63
MICRO.2875.C1	MAPK1/2	Sotub04g034130	-1.25	-1.23	0.24	-0.27	0.68	2.30
MICRO.2875.C2	MAPK1/2	Sotub04g034130	-1.27	-1.25	0.67	-0.21	0.34	2.01
bf_mxifxxx_0053f09.t3m.scf	MAPK17	Sotub04g005940	-1.25	-0.93	-0.38	-0.15	0.61	1.03
cPRO22A22TH	MAPK17	Sotub04g005940	-1.20	-0.98	-0.62	-0.39	0.07	1.14
MICRO.695.C5	MAPK17	Sotub04g005940	-1.63	-1.61	-0.01	-0.52	0.18	1.60
bf_arrayxxx_0044h12.t3m.scf	MAPK17	Sotub04g005940	-1.33	-1.56	0.91	-1.12	0.96	2.72
MICRO.13026.C1	MAPK8/9/15/16	PGSC0003DMG400002452	-1.55	-1.51	0.59	-1.15	0.67	2.29
cSTA34I13TH	MAPK8/9/15/17	Sotub06g025910	-1.38	-1.05	0.04	-1.13	0.56	1.78
cSTA13O14TH	MAPK17	Sotub04g005940	-1.04	-0.79	0.20	-0.81	0.54	1.77
MICRO.4979.C1	MAPK1/7/14	Sotub04g034130	-1.85	-2.23	0.52	-0.72	-0.42	0.36
MICRO.2155.C1	MAPK8/19	Sotub10g007660	-1.38	-2.11	-0.07	-1.40	-0.23	0.39
MICRO.13167.C1	MAPK8/19	Sotub10g007660	-1.52	-2.19	-0.35	-1.07	-0.33	0.24
MICRO.2954.C1	MAPK8/19	Sotub10g007660	-0.84	-1.71	0.06	-1.32	-0.56	-0.17
MICRO.5763.C1	MAPK8/9/15/16	Sotub01g022770	-1.43	-2.17	-0.05	-0.95	-0.19	0.60
MICRO.7088.C2	MAPK4_1	Sotub05g022310	1.80	0.93	-0.93	0.84	-0.45	-1.13
MICRO.3258.C1	MAPK8/9/12/15	PGSC0003DMG400002452	2.38	2.05	1.34	0.77	0.34	0.55
MICRO.3258.C2	MAPK8/9/12/15	PGSC0003DMG400002452	1.03	1.28	0.63	0.62	0.19	0.40
MICRO.695.C3	MAPK17	Sotub04g005940	0.80	1.48	1.13	0.40	1.03	1.50
MICRO.695.C7	MAPK17	Sotub04g005940	0.69	1.30	0.79	0.33	0.97	1.46

D

Sonda	Gen	Fito ID	Rywal			NahG-Rywal		
			R1	R3	R6	nah1	nah3	nah6
MICRO.1622.C1	MKP1	Sotub05g014680	-4.27	-2.80	1.31	-1.16	2.66	5.35
MICRO.7822.C1	MKP1	Sotub05g014680	-3.86	-2.46	1.67	-1.09	2.77	5.79
BF_LBCHXXXX_0041H12_T3M.SCF	MKP1	Sotub05g014680	-2.55	-0.64	1.31	-0.06	2.66	4.24

Slika 10: Diferencialno izraženi geni družine MKKK (A), MKK (B), MAPK (C) in MKP (D) v krompirju sorte Rywal in transgenem krompirju NahG-Rywal v treh časovnih točkah 1, 3 in 6 dpi (Baebler in sod., 2014)

Vsaki sondi je pripisan opis gena in Fito ID (Ramšak in sod., 2014). Prikazane so log₂ vrednosti razlik med izražanjem v slepo inokuliranih rastlinah in s PVY inokuliranih rastlinah. Statistično značilne razlike (p<0,05) so odebeljene. Navzdol regulirane vrednosti so obarvane rumeno in navzgor regulirane modro.

Figure 10. Differential expression of MKKKs (A), MKKs (B), MAPKs (C) and MKP (D) in potato cv. (cultivar) Rywal and NahG-Rywal in three time points, 1, 3 and 6 dpi (Baebler in sod., 2014)

Each probe has assigned gene description and Fito ID (Ramšak in sod., 2014). Log₂ fold changes of PVY inoculated vs. mock-inoculated plants are indicated for each time point. Statistically significant differences (FDR corrected p < 0.05) are in bold. Up-regulated values are in blue and down-regulated values are in yellow.

4.1.2 Potrditev rezultatov mikromrež za gene *StMKK6*, *StWIPK* in *StMKP1* s qPCR

Za nadaljnjo funkcionalno analizo smo izbrali tri gene: *StMKK6*, *StWIPK* in *StMKP1*. Izražanje vseh treh genov smo potrdili s qPCR (Preglednica 4).

Preglednica 4: Potrditev rezultatov mikromrež s qPCR za gene *StMKK6*, *StWIPK* in *StMKP1*

Da bi potrdili rezultate mikromrež, smo analizirali iste vzorce RNA, kot so bili uporabljeni za eksperiment z mikromrežami. V tabeli so logaritmirane vrednosti razmerja izražanja gena med okuženimi in slepo inokuliranimi rastlinami sorte Rywal in transgene NahG-Rywal 1, 3 in 6 dpi. Statistično značilne razlike (p < 0.05) so odebeljene.

	Rywal						NahG-Rywal					
	1 dpi		3 dpi		6 dpi		1 dpi		3 dpi		6 dpi	
	μmreža	qPCR	μmreža	qPCR	μmreža	qPCR	μmreža	qPCR	μmreža	qPCR	μmreža	qPCR
<i>StMKK6</i>	1.40	0.37	1.74	1.29	-0.17	0.14	0.90	0.21	0.77	1.18	0.65	2.54
<i>StWIPK</i>	-1.08	-1.75	0.36	-0.15	0.43	0.06	0.10	-0.79	1.15	0.40	2.18	2.43
<i>StMKP1</i>	-2.55	-2.70	-0.64	-0.13	1.31	-0.01	-0.06	-0.78	2.66	1.62	4.24	2.95

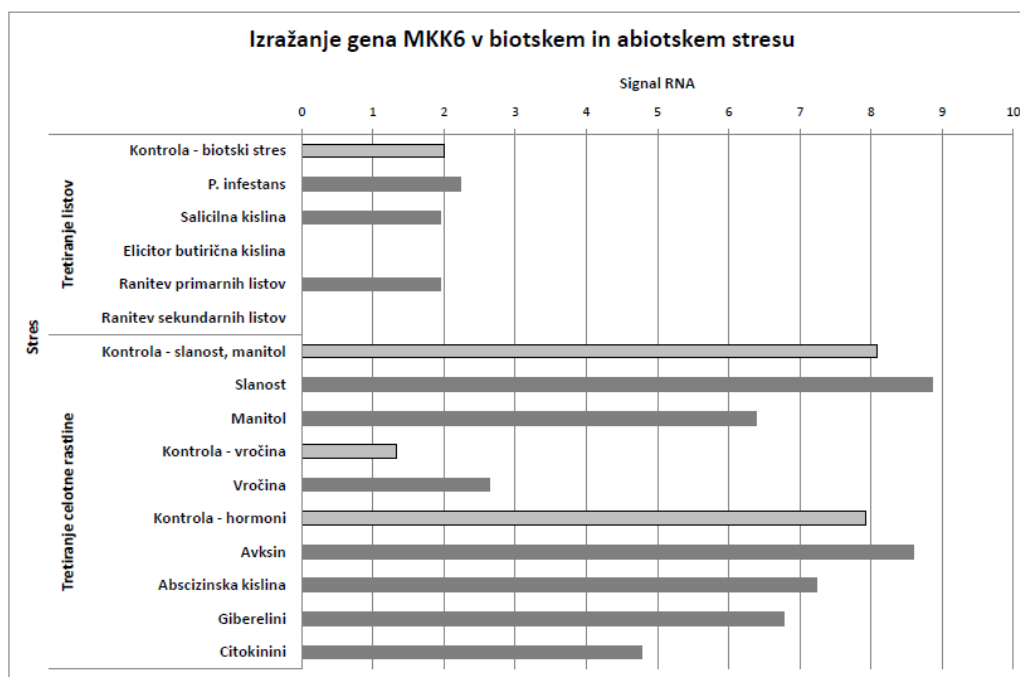
4.1.3 Izražanje krompirjeve družine MKK ter genov *StWIPK* in *StMKP1* v različnih tkivih in v odzivu na stres

V bazi The Bio-Analytic Resource for Plant Biology smo z orodjem The eFP Browser za celotno družino krompirjevih MKK (natančneje za gen *StMKK6*) ter za gena *StWIPK* in *StMKP1* raziskali, kako se ti izražajo v tkivih ter po tretiranju rastlin z različnimi abiotskimi in biotskimi stresi.

Izražanje genov v tkivih pri družini MKK se je razlikovalo med dvema podvrstama krompirjev: *S. tuberosum* Phureja, klon DM, ter *S. tuberosum* Tuberosum, klon RH. V splošnem je analiza izražanja za gena *StMKK1/2* in *StMKK4/5* pokazala uniformno izražanje v vseh tkivih z največjim izražanjem v gomoljih in živicah. Gen *StMKK3* je bil najmočneje izražen v venčnih listih in pestiču, medtem ko je bil gen *StMKK7/9* izražen v gomoljih in cvetovih ter zgolj v klonu DM tudi v koreninah. Gen *StMKK6* je

bil najmočneje izražen v gomoljih in kalusu ter najšibkeje (pod mejo detekcije) v cvetovih pri klonu DM, medtem ko je bil pri klonu RH močno izražen tudi v poganjkih.

V biotskih in abiotskih stresnih pogojih je bila po ranitvi listov, v primerjavi z netretirano kontrolo, pri vseh *MKK* najmanj dvakratna razlika v izražanju, razen pri *StMKK4/5*. Izražanje gena *StMKK6* pa je, v primerjavi s kontrolo, nižje tudi po tretiranju z elicitorjem butirično kislino (Slika 11). V bazi Genevestigator je ortolog *MKK6* v vrsti *A. thaliana* induciran v razvojnih procesih (tvorba kalusa in kalitev) ter po tretiranju z inhibitorjem translacije cikloheksamidom ter s hormonom avksinom. Izražanje *AtMKK6* je induciran tudi po tretiranju z bakterijskim elicitorjem flagelinom 22 ter po tretiranju z biotskim stresom (mraz, slanost, kisel pH ter anoksični pogoji). Izražanje gena *AtMKK6* pa je v primerjavi s kontrolo nižje po tretiranju z abscizinsko kislino ter kombinacijo abscizinske kisline z JA ali SA.



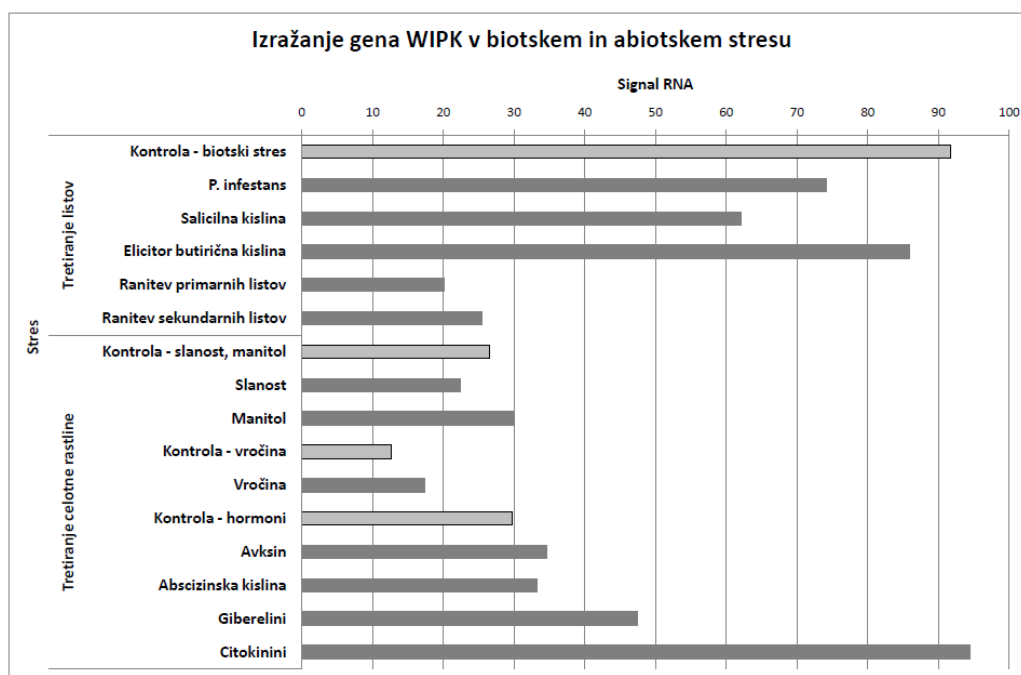
Slika 11: Izražanje gena *StMKK6* v biotskem in abiotskem stresu

Gen ima v primerjavi s kontrolami dvakrat nižje izražanje po tretiranju z glivnim elicitorjem butirično kislino ter po ranitvi sekundarnih listov.

Figure 11: Expression of *StMKK6* in biotic and abiotic stress

Comparing to the controls, *StMKK6* is down-regulated after treatment with the fungal elicitor butyric acid and after wounding of the secondary leaves.

Gen *StWIPK* je najmočneje izražen v živicah, ostala tkiva imajo primerljivo količino RNA. V stresnih pogojih je izražanje gena *StWIPK* v primerjavi z netretirano kontrolo dvakrat nižje po ranitvi primarnih in sekundarnih listov, močno pa naraste po tretiranju rastlin s hormoni citokinini (Slika 12).



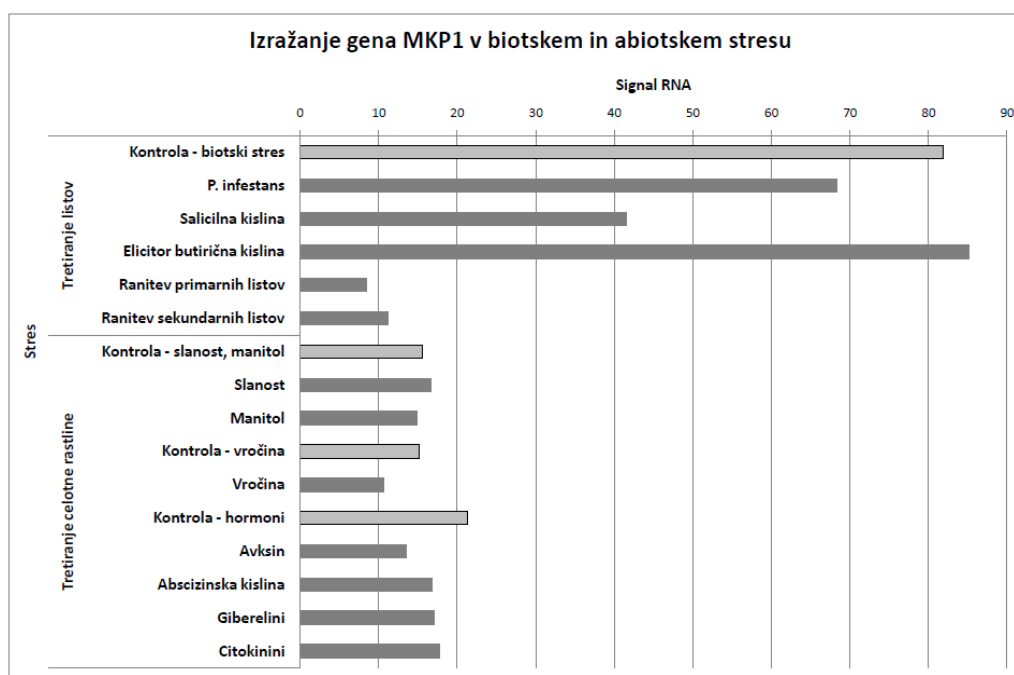
Slika 12: Izražanje gena *StWIPK* v biotskem in abiotičnem stresu

Gen ima v primerjavi s kontrolami dvakrat nižje izražanje po ranitvi primarnih in sekundarnih listov.

Figure 12: Expression of *StWIPK* in biotic and abiotic stress

Comparing to the controls, *StWIPK* is down-regulated after wounding of the secondary leaves.

Gen *StMKPI* je najmočneje izražen v cvetu, živicah in gomoljih. Prav tako kot ostala dva analizirana gena je tudi *StMKPI* reguliran zgolj v biotskem stresu in sicer najmočneje po ranitvi primarnih in sekundarnih listov, kjer je izražanje *StMKPI* v primerjavi s kontrolo za približno osemkrat nižje, ter po tretiranju s SA, kjer je izražanje dvakrat nižje (Slika 13).



Slika 13: Izražanje gena *StMKP1* v biotskem in abiotskem stresu

Gen ima v primerjavi z netretirano kontrolo osemkrat nižje izražanje po ranitvi primarnih in sekundarnih listov ter dvakrat nižje izražanje po tretiranju s SA.

Figure 13: Expression of *StMKP1* in biotic and abiotic stress

Comparing to the control, *StMKP1* is strongly down-regulated after wounding of primary and secondary leaves and less severely down-regulated after the SA-treatment.

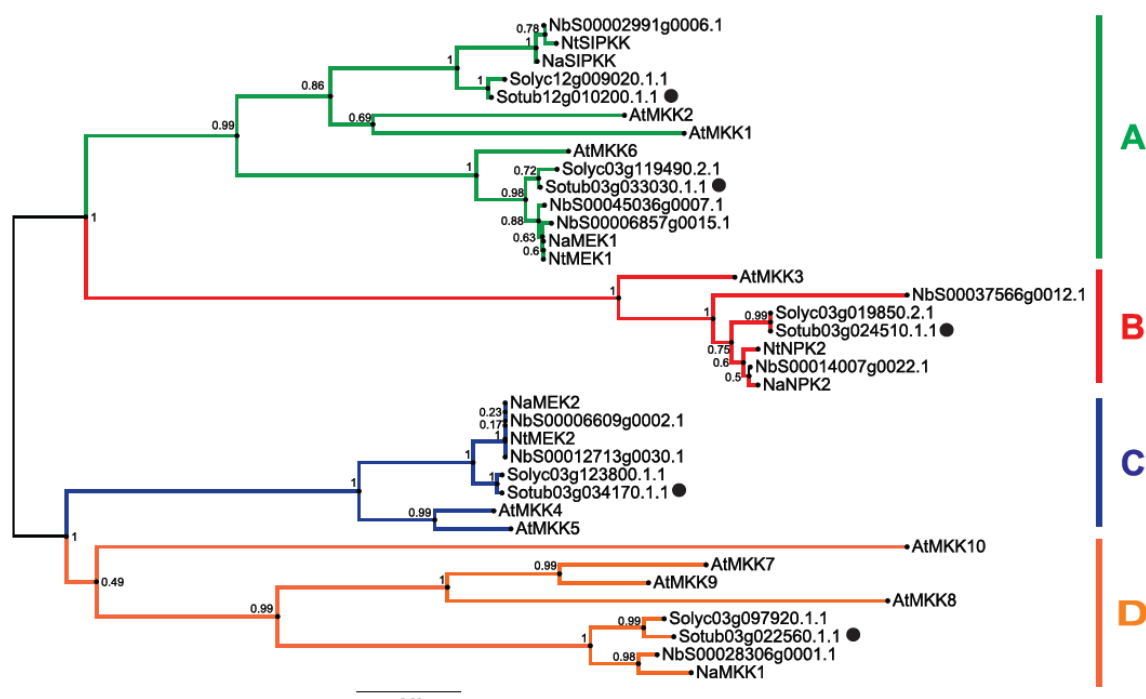
4.2 SEKVENČNA ANALIZA DRUŽIN MKK, MAPK IN MKP V KROMPIRJU

4.2.1 Analiza družine MKK v krompirju

Analizirali smo družino MKK v genomih petih vrst iz družine razhudnikovk (krompir, paradižnik, tobak ter vrsti *N. benthamiana* in *Nicotiana attenuata*) ter v rastlini *A. thaliana*. V krompirju, paradižniku in vrsti *N. attenuata* smo identificirali pet genov iz družine MKK, v tobaku štiri ter v vrsti *N. benthamiana* osem. V vrsti *A. thaliana* je identificiranih deset MKK (Ichimura in sod., 2002). Na osnovi aminokislinske poravnave sekvenc in filogenetskega drevesa (Slika 14) smo gene uvrstili v štiri skupine in jim pripisali ortologe rastline *A. thaliana*. V skupino A se uvrščajo po trije geni rastlin *A. thaliana* in *N. benthamiana*, ostale vrste imajo po dva gena; v skupini B ima zgolj rastlina *N. benthamiana* dva gena, ostale vrste imajo po enega, v skupini C sta po dva gena rastlin *A. thaliana* in *N. benthamiana* medtem ko imajo krompir, paradižnik in rastlini *N. attenuata* in *N. tabacum* po en gen. V skupini D so štirje geni rastline *A. thaliana*, ostale vrste pa imajo po enega, razen tobaka, ki tukaj nima predstavnika. Izmed petih analiziranih vrst iz družine razhudnikovk je *N. benthamiana* edina vrsta, ki ima domnevne paraloge v družini MKK. Ti so *MKK3* (NbS00014007g0022.1,

NbS00037566g0012.1), *MKK4/5* (NbS00012713g0030.1, NbS00006609g0002.1) in *MKK6* (NbS00006857g0015.1, NbS00045036g0007.1).

Pri vrstah s petimi predstavniki družine je le dvema genoma mogoče pripisati po en ortolog iz rastline *A. thaliana*, medtem ko so ostali trije v filogenetskem drevesu uvrščeni tako, da jim lahko pripišemo po dva možna ortologa. Za dva gena vrste *A. thaliana* *AtMKK8* in *AtMKK10* nismo našli krompirjevih ortologov.



Slika 14: Filogenetsko drevo genov iz družine *MKK* v razhudnikovkah in rastlini *A. thaliana*

Geni *MKK* iz rastline *A. thaliana* (*At*), krompirja (*Sotub*), paradižnika (*Solyc*) in rastlin *N. benthamiana*, *N. attenuata* (*Na*) in *N. tabacum* (*Nt*) so razvrščeni v štiri skupine: A (zeleno), B (rdeča), C (modra) in D (oranžna). Krompirjevi geni so označeni s črnimi pikami. Številke na razcepih vej spredstavljajo stopnjo zaupanja po metodi »bootstrap«. Merilo predstavlja dolžino veje, ki je sorazmerna z 0.06 zamenjave aminokislina na mesto.

Figure 14: Phylogenetic tree of *MKK* family in five *Solanaceae* species and *A. thaliana*

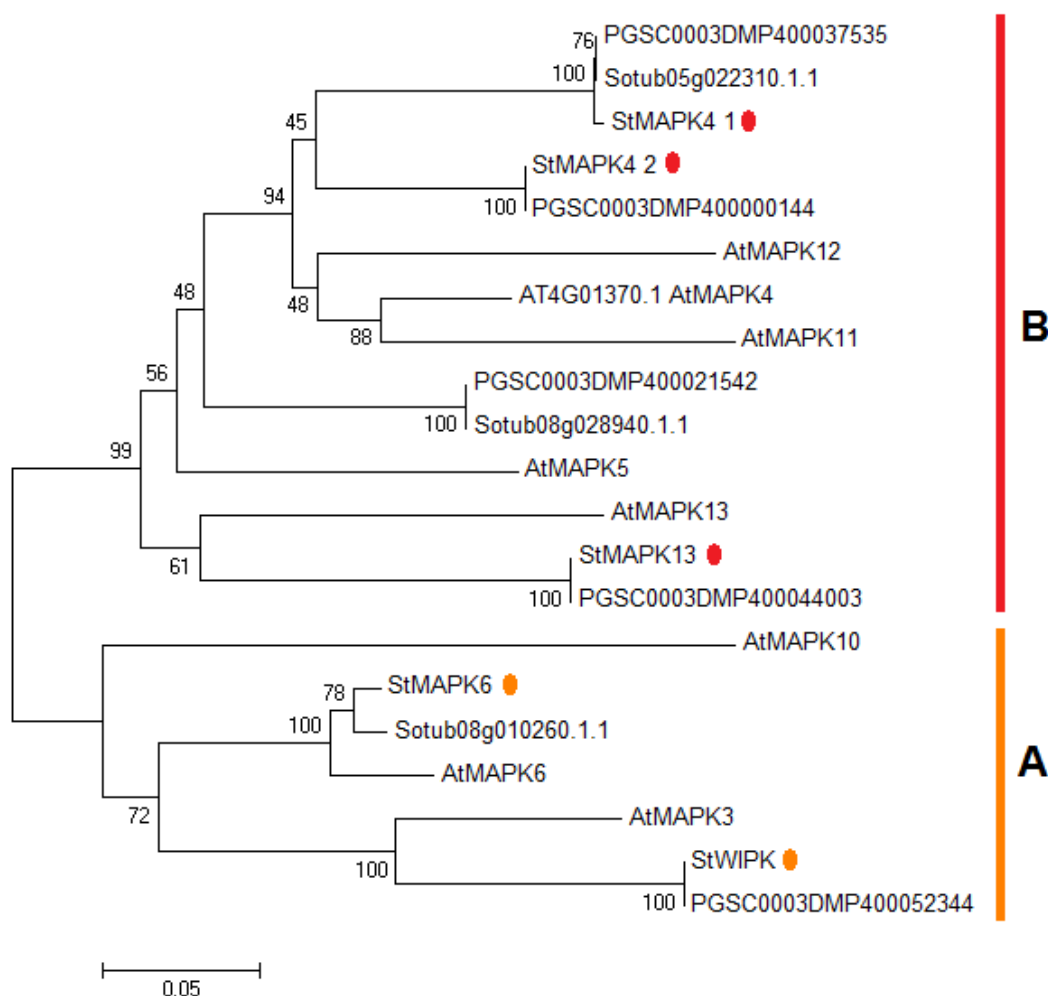
The species are *A. thaliana* (*At*), potato (*Sotub*), tomato (*Solyc*), *N. benthamiana* (*Nb*), *N. attenuata* (*Na*) and *Nicotiana tabacum* (*Nt*). Genes are grouped into 4 groups: A (green), B (red), C (blue) and D (orange) (Ichimura in sod., 2002). Potato genes are marked with dots. The numbers on the nodes are percentages from a bootstrap analysis of 1000 replicates. The scale bar indicates the branch length that corresponds to 0.06 substitutions per site.

4.2.2 Analiza družine MAPK v krompirju

Iz družine krompirjevih MAPK smo izbrali pet genov za natančnejšo analizo. Vseh pet se na osnovi filogenetskega drevesa (Slika 15) uvršča v dve izmed štirih podskupin

MAPK – podskupini A in B rastlinskih MAPK. Predstavniki skupine A v vrsti *A. thaliana* so *AtMAPK3*, -6 in -10. V krompirju so to geni *StMAPK6* in *StWIPK* s pripadajočimi ortologi iz podvrste Phureja, klona DM (sekvence PGSC in Sotub). Predstavniki skupine B v vrsti *A. thaliana* so *AtMAPK4*, -5, -11, -12 in -13 in v krompirju *StMAPK4_1*, -4_2, -6 in -13 s pripadajočimi ortologi podvrste Phureja, klona DM (PGSC in Sotub).

Gen *StMAPK4_1* iz sorte Rywal se od ortologa PGSC0003DMP400037535 razlikuje v 1 amino kislini (polarnost amino kisline se ne spremeni), medtem ko sta *StMAPK4_2* in *StMAPK13* identična ortologom iz podvrste Phureja. Gen *StMAPK6* iz Rywala se od ortologa v podvrsti Phureja razlikuje v 16 amino kislinah.



Slika 15: Filogenetsko drevo MAPK iz skupine A in B v krompirju in rastlini *A. thaliana*
MAPK iz krompirja (Sotub, PGSC in St) in rastline *A. thaliana* (At), uvrščene v skupino A in B na osnovi klasifikacije celotne družine MAPK (Ichimura in sod., 2002). V filogenetsko drevo so vključeni geni, ki smo jih izolirali in sekvencirali iz sorte Rywal (označeni s pikami), njihovi ortologi iz krompirjeve podvrste Phureja, klon DM (PGSC in Sotub) in vsi geni iz rastline *A. thaliana*, ki so uvrščeni v skupino A

(oranžna črta) in B (rdeča črta). Številke na razcepkih vej predstavljajo stopnjo zaupanja po metodi »bootstrap«. Merilo predstavlja dolžino veje, ki je sorazmerna z 0.05 zamenjave aminokislina na mesto.

Figure 15: Phylogenetic tree of potato and *A. thaliana* MAPKs from group A and group B

Potato (Sotub, PGSC and St) and *A. thaliana* (At) MAPKs from group A and group B as was already proposed by Ichimura et al. 2002. Besides the potato sequences from the *S. tuberosum* Phureja, clone DM (Sotub and PGSC) the tree also includes four MAPKs from cv. Rywal (marked with dots). Group A MAPKs is marked with orange line and group B MAPKs with the red line. Numbers on the branches indicate the support, calculated by the bootstrap method. The scale bar indicates the branch length that corresponds to 0.06 substitutions per site.

4.2.3 Analiza družine dvojno specifičnih fosfataz v krompirju

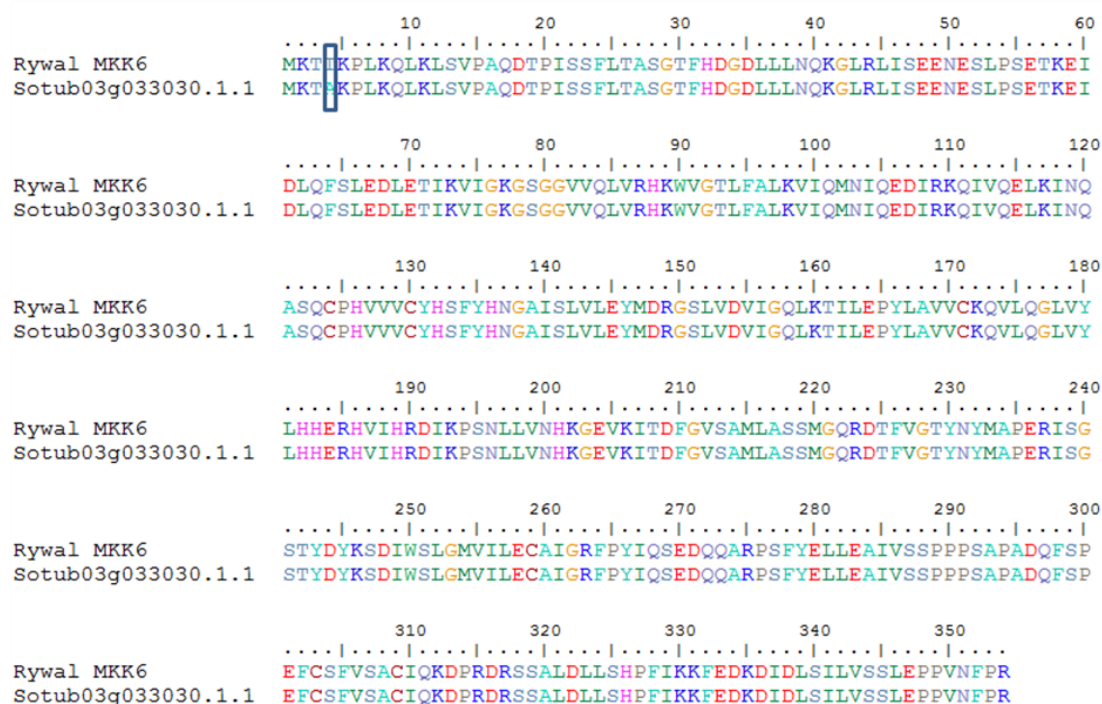
V vrsti *A. thaliana* je identificiranih pet dvojno specifičnih fosfataz, ki regulirajo aktivnost in trajanje MAP kinazne kaskade: *MKP1* (AT3G55270), *DsPTP1* (AT3G23610), *MKP2* (AT3G06110), *IBR5* (AT2G04550) in *PHS1* (AT5G23720) (Bartels in sod., 2010). Dvojno specifičnim fosfatazam iz modelne rastline *A. thaliana* smo poiskali ortologe v krompirju (Ramšak in sod., 2014) in našli ortologe trem fosfatazam: *StMKP1* (Sotub05g027740 in Sotub05g014680), *StIBR5* (Sotub07g018590 in Sotub12g011740) ter *StPHS1* (Sotub03g031790). Za gena *DsPTP1* in *MKP2* v krompirju nismo našli ortologov.

4.3 SEKVENČNA ANALIZA IZOLIRANIH GENOV *StMKK6*, *StWIPK* IN *StMKP1*

Gene *StMKK6*, *StWIPK* in *StMKP1* smo izolirali iz sorte Rywal, gen *StWIPK* pa tudi iz sorte Désirée. Naše sekvence smo primerjali z že objavljenimi celotnimi sekvencami v genski banki (angl. »GenBank«) ali z objavljenim genomom v bazi Potato Genomics Resource (Potato genome sequencing consortium, 2011).

4.3.1 Analiza gena *StMKK6*

Izolirane in sekvencirane gene smo primerjali z razpoložljivimi celotnimi sekvencami iz podatkovnih baz ter preverili, kako ohranjene so med različnimi sortami krompirja. Gen *StMKK6* smo pridobili s pomočjo oligonukleotidnih začetnikov, konstruiranih na osnovi POCI sonde MICRO.17148.C1 in iz razpoložljivih baz pridobili še en dodaten gen: Sotub03g033030.1. Sekvenci se razlikujeta v treh nukleotidih ter v eni amino kislini (Slika 16). Razlike niso del protein kinaznega aktivnega mesta, ki se nahaja med 69. in 329. amino kislino.



Slika 16: Aminokislinska poravnava dveh sekvenc proteina StMKK6 iz krompirja sorte Rywal ter krompirja podvrste Phureja, klon DM

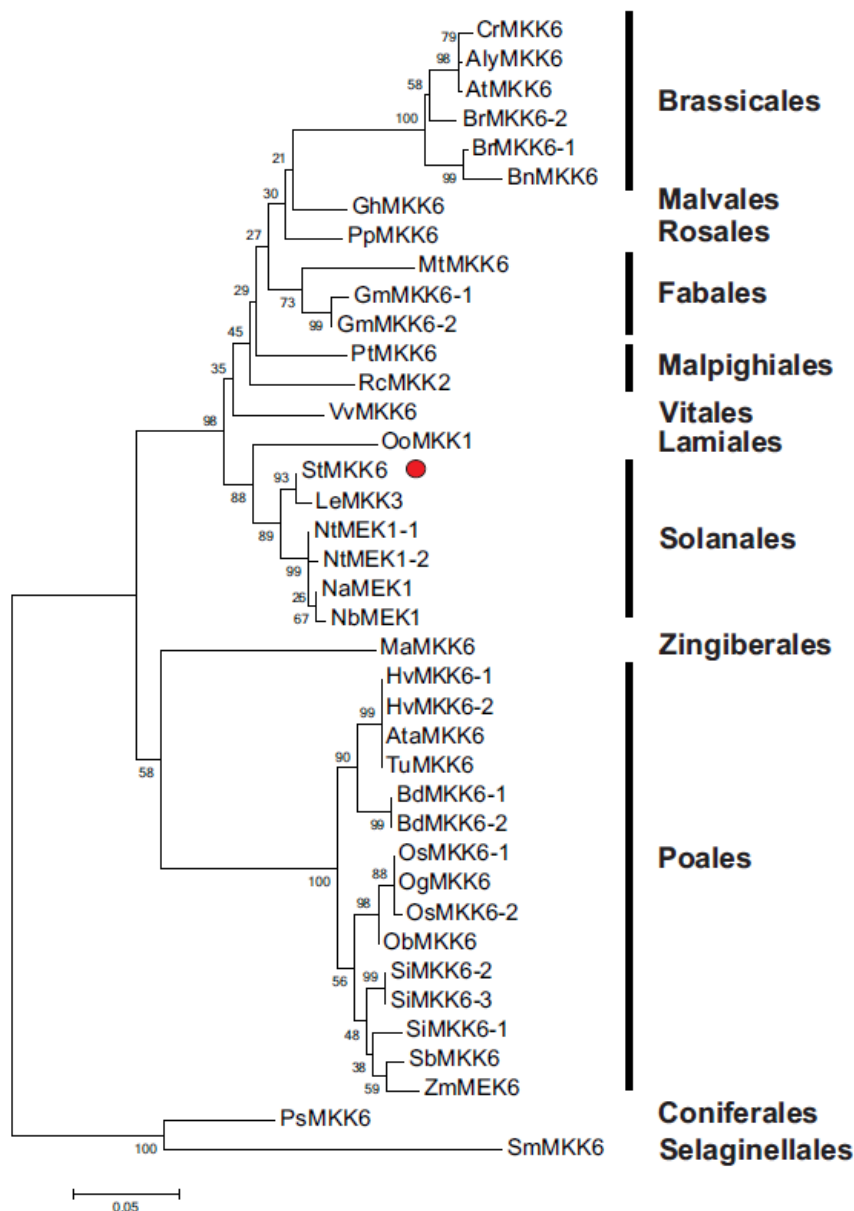
Sekvenci StMKK6 iz sorte Rywal in *S. tuberosum* Phureja, klon DM. se razlikujeta v četrti aminokislini (izoleucin ali alanin), vendar sta obe aminokislini nepolarni.

Figure 16: Alignment of two amino acid sequences of the protein StMKK6 from potato cv. Rywal and potato *S. tuberosum* Phureja, clone DM

Sequences are different in fourth amino acid (isoleucine and alanine), which are both non-polar.

4.3.1.1 Ortologi gena *StMKK6* v rastlinskem kraljestvu

Ugotovili smo, da je v krompirju samo ena kopija gena *MKK6*, nato pa smo želeli še preveriti, kako je ta gen predstavljen v drugih rastlinskih vrstah. Krompirjev gen *MKK6* smo z algoritmom tblastx primerjali s sekvencami v bazi Uniprot. Kot ortologe smo identificirali devetintrideset genov (Slika 17). Večina ortologov izvira iz kritosemenk, eden iz golosemenk ter eden iz družine mahov. Gen *MKK6* večinoma nima paralogov v rastlinskih genomih, saj vseh devetintrideset genov pripada enaintridesetim vrstam.



Slika 17: Filogenetsko drevo krompirjevega gena *MKK6* in ortologov v rastlinskih vrstah

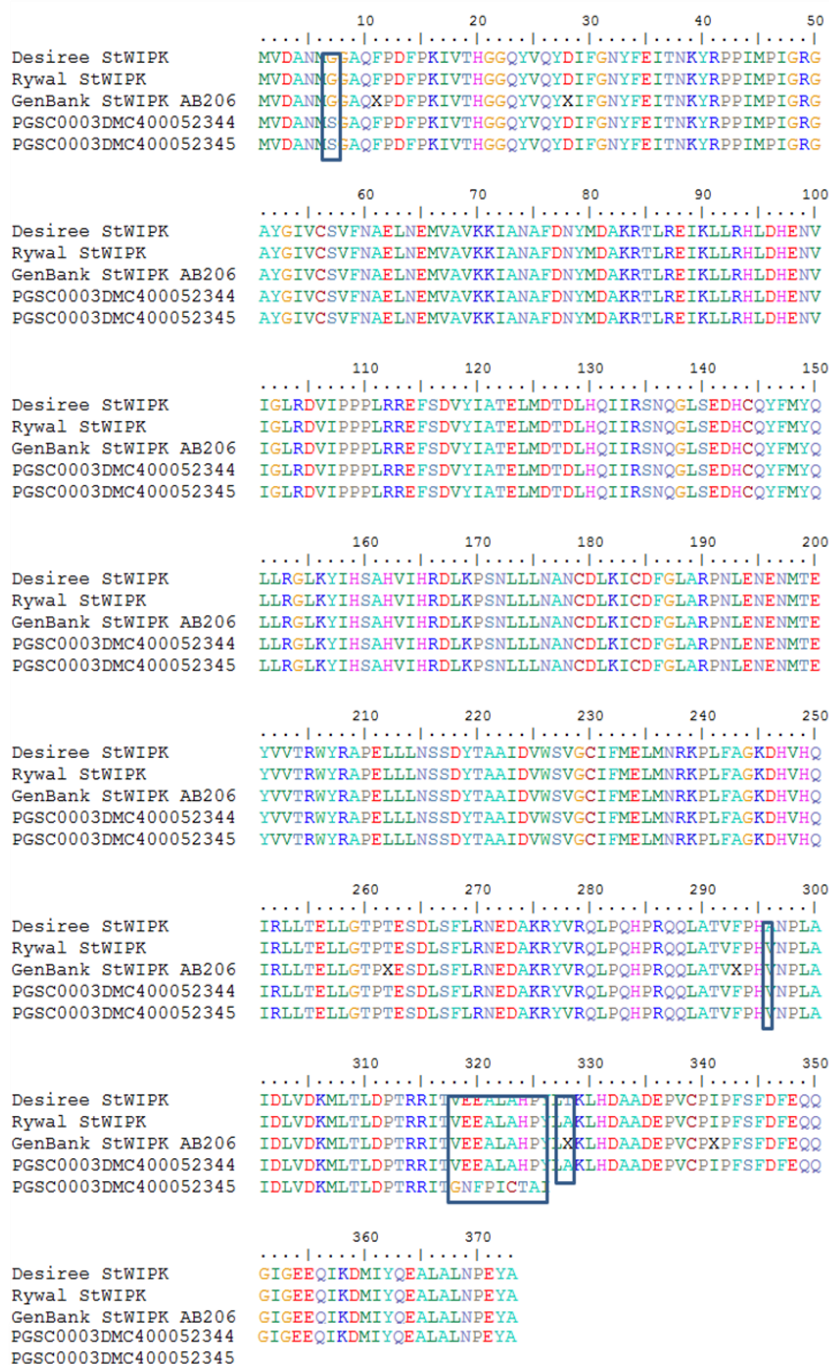
Vrsta, iz katere je bil gen določen, je označena z akronimom na začetku imena: Cr, *Capsella rubella*; Aly, *Arabidopsis lyrata*; At, *Arabidopsis thaliana*; Br, *Brassica rapa*; Bn, *Brassica napus*; Gh, *Gossypium hirsutum*; Pp, *Prunus persica*; Mt, *Medicago trunculata*; Gm, *Glycine max*; Pt, *Populus trichocarpa*; Rc, *Ricinus communis*; Vv, *Vitis vinifera*; Oo, *Origanum onites*; St, *Solanum tuberosum*; Le, *Lycopersicon esculentum/Solanum lycopersicum*; Nt, *Nicotiana tabacum*; Na, *Nicotiana attenuata*; Nb, *Nicotiana benthamiana*; Ma, *Musa acuminata*; Hv, *Hordeum vulgare*, Ata, *Aegilops tauschii*; Tu, *Triticum urartu*; Bd, *Brachypodium distachyon*; Os, *Oryza sativa*, Og, *Oryza glaberrima*; Ob, *Oryza brachyantha*; Si, *Setaria italica*; Sb, *Sorghum bicolor*; Zm, *Zea mays*, Ps, *Picea sitchensis*; Sm, *Selaginella moellendorffii*. *MKK6* iz krompirja je označen z rdečo piko. Na desni strani so imena redov, kamor so posamezne rastlinske vrste uvrščene. Številke na razcepkih vej predstavlja stopnja zaupanja po metodi »bootstrap«. Merilo predstavlja dolžino veje, ki je sorazmerna z 0.05 zamenjave aminokislina na mesto.

Figure 17: Phylogenetic tree of potato *MKK6* and its orthologues in different plant species, divided into classes

The species of origin for each *MKK* is marked by species acronym before the protein name: Cr, *Capsella rubella*; Aly, *Arabidopsis lyrata*; At, *Arabidopsis thaliana*; Br, *Brassica rapa*; Bn, *Brassica napus*; Gh, *Gossypium hirsutum*; Pp, *Prunus persica*; Mt, *Medicago trunculata*; Gm, *Glycine max*; Pt, *Populus trichocarpa*; Rc, *Ricinus communis*; Vv, *Vitis vinifera*; Oo, *Origanum onites*; St, *Solanum tuberosum*; Le, *Solanum lycopersicum* (*Lycopersicon esculentum*); Nt, *Nicotiana tabacum*; Na, *Nicotiana attenuata*; Nb, *Nicotiana benthamiana*; Ma, *Musa acuminata*; Hv, *Hordeum vulgare*; Ata, *Aegilops tauschii*; Tu, *Triticum urartu*; Bd, *Brachypodium distachyon*; Os, *Oryza sativa*; Og, *Oryza glaberrima*; Ob, *Oryza brachyantha*; Si, *Setaria italica*; Sb, *Sorghum bicolor*; Zm, *Zea mays*; Ps, *Picea sitchensis*; Sm, *Selaginella moellendorffii*. Potato *MKK6* is marked with red dot. The numbers on the nodes are percentages from a bootstrap analysis of 1000 replicates. The scale bar indicates the branch length that corresponds to 0.06 substitutions per site.

4.3.2 Analiza gena *StWIPK*

Na osnovi POCI sonde MICRO.344.C4 smo konstruirali oligonukleotidne začetnike in izolirali gen *StWIPK* iz dveh sort krompirja: Rywal in Désirée. Iz razpoložljivih baz smo pridobili še tri sekvence: *StWIPK* (AB206552.1) iz baze GenBank ter sekvenci PGSC0003DMC400052344 in PGSC0003DMC400052345 iz baze »Potato Genomics Resource (Potato genome sequencing consortium, 2011)«. Slednji sta kodirajoči sekvenci gena PGSC0003DMG400030058, vendar kodirata različno dolga proteina (sekvenca PGSC0003DMC400052345 je krajša za 47 amino kislin). Po poravnavi vseh petih sekvenc in primerjavi zaporedij smo ugotovili, da se nukleotidne sekvence razlikujejo na 9 mestih, aminokislinske poravnave pa na treh mestih, razen v primerjavi s krajšo sekvenco, ki ima zadnjih 10 aminokislin drugačnih od ostalih štirih sekvenc (Slika 18). Protein kinazna domena se nahaja med 43. in 327. amino kislino in večina razlik v aminokislinskem zaporedju je del te domene. Menjava 296. amino kisline (alanina -A z valinom -V) ohrani nepolarnost aminokisline, medtem ko zamenjava alanina -A s treoninom -T na 327. mestu, povzroči spremembo polarnosti na zadnji amino kislini protein kinazne domene. Pri sekvenci PGSC0003DMC400052345 je protein kinazna domena za 10 amino kislin krajša v primerjavi z ostalimi sekvencami.



Slika 18: Aminokislinska poravnava petih sekvenc proteina WIPK iz krompirja sort Désirée in Rywal, sekvence krompirja iz genske banke (Genbank: AB206552.1) in krompirja podvrste Phureja, klon DM

Sekvence Désirée StWIPK, Rywal StWIPK, StWIPK AB206552.1, PGSC0003DMC400052344 in PGSC0003DMC400052344 se razlikujejo v treh aminokislinah, dodatno pa se sekvenca PGSC0003DMC400052345 od ostalih razlikuje še v zadnjih 9 aminokislinah.

Figure 18: Alignment of five amino acid sequences of the protein WIPK from potato cultivars Désirée and Rywal, GenBank WIPK (Genbank: AB206552.1) and *S. tuberosum* Phureja, clone DM

Sequences Désirée StWIPK, Rywal StWIPK, StWIPK AB206552.1, PGSC0003DMC4000052344 and PGSC0003DMC4000052344 are different in three amino acids, while additionally the sequence PGSC0003DMC4000052345 is different in additionally 9 amino acids.

4.3.3. Analiza gena *StMKP1*

Gen *StMKP1* smo pridobili s pomočjo oligonukleotidnih začetnikov, konstruiranih na osnovi POCI sonde BF_LBCHXXXX_0041H12_T3M.SCF. Dodatno smo našli še dva gena - *StMKP1* (GenBank: BAE44440.1) in sekvenci PGSC0003DMC400020786 ter PGSC0003DMC400020787, ki pripadata genu PGSC0003DMG400011726. Aminokislinska zaporedja se razlikujejo na 42 mestih (Slika 19), sekvenca PGSC0003DMC400020787 je krajša za približno 60 bp. Aminokislinska zaporedja se razlikujejo v 17 amino kislinah, vendar ne na aktivacijskih mestih, ki sta v MKP1 dve: katalitska domena dvojno specifične fosfataze (123. - 254. amino kislina) ter gelsolinska domena (292. - 355. amino kislina).

```
10 20 30 40 50 60 70
Rywal MKP1 MLEVDEKDRVPAAGNRKTYARISISWSDRSPTKSSAKPQWNSKARACLPPQLPLSITRPTAEWFPRAGSD
GenBank MKP1 BAE4444 MLEVDEKDRVPAAGNRKTYARISISWSDRSPTKSSAKPQWNSKARACLPPQLPLSITRPTAEWFPRAGSD
PGSC0003DMC400020786 MLEVDEKDRVPAAGNRKTYARISISWSDRSPTKSSAKPQWNSKARACLPPQLPLSITRPTAEWFPRAGSD
PGSC0003DMC400020787 MLEVDEKDRVPAAGNRKTYARISISWSDRSPTKSSAKPQWNSKARACLPPQLPLSITRPTAEWFPRAGSD

80 90 100 110 120 130 140
Rywal MKP1 LGVWPNPSTPGVRLGSFSTHEGSATKQAPREFEFKDKLAFFNKECSKIVDHIYLGSDTIVAKNRDILREN
GenBank MKP1 BAE4444 LGVWPNPSTPGVRLGSFSTHEGSATKQAPREFEFKDKLAFFNKECSKIVDHIYLGSDTIVAKNRDILREN
PGSC0003DMC400020786 LGVWPNPSTPGVRLGSFSTHEGSATKQAPREFEFKDKLAFFNKECSKIVDHIYLGSDTIVAKNRDILREN
PGSC0003DMC400020787 LGVWPNPSTPGVRLGSFSTHEGSATKQAPREFEFKDKLAFFNKECSKIVDHIYLGSDTIVAKNRDILREN

150 160 170 180 190 200 210
Rywal MKP1 GITHVLMNCVGFSCPEYFKDDLVIYKTLWLQDSPTEDITSILYDVFDFEDVREQGGRVFVHCQGVSRAS
GenBank MKP1 BAE4444 GITHVLMNCVGFSCPEYFKDDLVIYKTLWLQDSPTEDITSILYDVFDFEDVREQGGRVFVHCQGVSRAS
PGSC0003DMC400020786 GITHVLMNCVGFSCPEYFKDDLVIYKTLWLQDSPTEDITSILYDVFDFEDVREQGGRVFVHCQGVSRAS
PGSC0003DMC400020787 GITHVLMNCVGFSCPEYFKDDLVIYKTLWLQDSPTEDITSILYDVFDFEDVREQGGRVFVHCQGVSRAS

220 230 240 250 260 270 280
Rywal MKP1 LVIAAYLMWKEGMSFEDAFQHVKAARGVTFNPMGFACQLLCCQKRVHAQPVSPSPTSVLRMYRMAPHSPYDPL
GenBank MKP1 BAE4444 LVIAAYLMWKEGMSFEDAFQHVKAARGVTFNPMGFACQLLCCQKRVHAQPVSPSPTSVLRMYRMAPHSPYDPL
PGSC0003DMC400020786 LVIAAYLMWKEGMSFEDAFQHVKAARGVTFNPMGFACQLLCCQKRVHAQPVSPSPTSVLRMYRMAPHSPYDPL
PGSC0003DMC400020787 LVIAAYLMWKEGMSFEDAFQHVKAARGVTFNPMGFACQLLCCQKRVHAQPVSPSPTSVLRMYRMAPHSPYDPL

290 300 310 320 330 340 350
Rywal MKP1 HLVPKMLSEPGAEGLDSEGAFLVLIIPSVIYVWIGKHCTSVMSDNARAAAFQVIRYEKAQGPVLIINEGKE
GenBank MKP1 BAE4444 HLVPKMLSEPGAEGLDSEGAFLVLIIPSVIYVWIGKHCTSVMSDNARAAAFQVIRYEKAQGPVLIINEGKE
PGSC0003DMC400020786 HLVPKMLSEPGAEGLDSEGAFLVLIIPSVIYVWIGKHCTSVMSDNARAAAFQVIRYEKAQGPVLIINEGKE
PGSC0003DMC400020787 HLVPKMLSEPGAEGLDSEGAFLVLIIPSVIYVWIGKHCTSVMSDNARAAAFQVIRYEKAQGPVLIINEGKE

360 370 380 390 400 410 420
Rywal MKP1 PSDFSWLSQESFFSGGCGKERTKVDHLLAENDLITDDISQICIGKNEYDLDFEIFCKALAGGVVPPFP
GenBank MKP1 BAE4444 PSDFSWLSQESFFSGGCGKERTKVDHLLAENDLITDDISQICIGKNEYDLDFEIFCKALAGGVVPPFP
PGSC0003DMC400020786 PSDFSWLSQESFFSGGCGKERTKVDHLLAENDLITDDISQICIGKNEYDLDFEIFCKALAGGVVPPFP
PGSC0003DMC400020787 PSDFSWLSQESFFSGGCGKERTKVDHLLAENDLITDDISQICIGKNEYDLDFEIFCKALAGGVVPPFP

430 440 450 460 470 480 490
Rywal MKP1 LSGTSEETCLPARQNGWSRLRRKFSSGIMKEFITASKLYSHTGITSPLVDKMDTIKELSPALPSSPSSPQ
GenBank MKP1 BAE4444 LSGTSEETCLPARQNGWSRLRRKFSSGIMKEFITASKLYSHTGITSPLVDKMDTIKELSPALPSSPSSPQ
PGSC0003DMC400020786 LSGTSEETCLPARQNGWSRLRRKFSSGIMKEFITASKLYSHTGITSPLVDKMDTIKELSPALPSSPSSPQ
PGSC0003DMC400020787 LSGTSEETCLPARQNGWSRLRRKFSSGIMKEFITASKLYSHTGITSPLVDKMDTIKELSPALPSSPSSPQ

500 510 520 530 540 550 560
Rywal MKP1 CGSPDSSFSSYATRSPSWTKDPCRDVENPGLTEHLSLSPSPSSSLDLSLSCFLVSKPKSNTTSPSLSPSTS
GenBank MKP1 BAE4444 CGSPDSSFSSYATRSPSWTKDPCRDVENPGLTEHLSLSPSPSSSLDLSLSCFLVSKPKSNTTSPSLSPSTS
PGSC0003DMC400020786 CGSPDSSFSSYATRSPSWTKDPCRDVENPGLTEHLSLSPSPSSSLDLSLSCFLVSKPKSNTTSPSLSPSTS
PGSC0003DMC400020787 CGSPDSSFSSYATRSPSWTKDPCRDVENPGLTEHLSLSPSPSSSLDLSLSCFLVSKPKSNTTSPSLSPSTS

570 580 590 600 610 620 630
Rywal MKP1 DYSSSFTFSPSSSNWSDLAYLSAQSPSTRFEHEDPNHAKNDFKVSSSLCKGSPFAEEAFPTSHALR
GenBank MKP1 BAE4444 DYSSSFTFSPSSSNWSDLAYLSAQSPSTRFEHEDPNHAKNDFKVSSSLCKGSPFAEEAFPTSHALR
PGSC0003DMC400020786 DYSSSFTFSPSSSNWSDLAYLSAQSPSTRFEHEDPNHAKNDFKVSSSLCKGSPFAEEAFPTSHALR
PGSC0003DMC400020787 DYSSSFTFSPSSSNWSDLAYLSAQSPSTRFEHEDPNHAKNDFKVSSSLCKGSPFAEEAFPTSHALR

640 650 660 670 680 690 700
Rywal MKP1 RANSCLYKETSPSLAERRGSHPPPMMLRSNDDSAQISVKLVRTSSFSLPNFEDDTMKCVCDNLNDGD
GenBank MKP1 BAE4444 RANSCLYKETSPSLAERRGSHPPPMMLRSNDDSAQISVKLVRTSSFSLPNFEDDTMKCVCDNLNDGD
PGSC0003DMC400020786 RANSCLYKETSPSLAERRGSHPPPMMLRSNDDSAQISVKLVRTSSFSLPNFEDDTMKCVCDNLNDGD
PGSC0003DMC400020787 RANSCLYKETSPSLAERRGSHPPPMMLRSNDDSAQISVKLVRTSSFSLPNFEDDTMKCVCDNLNDGD

710 720 730 740 750 760 770
Rywal MKP1 FVDSKKEEMLLDIENSITDNQLQNGVQPVDDVSGSFNDHPGIGIPIQVAETTDIGLYQWPSMHKLGSSVV
GenBank MKP1 BAE4444 FVDSKKEEMLLDIENSITDNQLQNGVQPVDDVSGSFNDHPGIGIPIQVAETTDIGLYQWPSMHKLGSSVV
PGSC0003DMC400020786 FVDSKKEEMLLDIENSITDNQLQNGVQPVDDVSGSFNDHPGIGIPIQVAETTDIGLYQWPSMHKLGSSVV
PGSC0003DMC400020787 FVDSKKEEMLLDIENSITDNQLQNGVQPVDDVSGSFNDHPGIGIPIQVAETTDIGLYQWPSMHKLGSSVV

780 790 800 810 820 830 840
Rywal MKP1 FDSRSVYIIVIPDLSLDENSSSSLYIWIWRDQWKESSDQVINNDSMCDENHWHWEKVGLGFLIQKGLAT
GenBank MKP1 BAE4444 FDSRSVYIIVIPDLSLDENSSSSLYIWIWRDQWKESSDQVINNDSMCDENHWHWEKVGLGFLIQKGLAT
PGSC0003DMC400020786 FDSRSVYIIVIPDLSLDENSSSSLYIWIWRDQWKESSDQVINNDSMCDENHWHWEKVGLGFLIQKGLAT
PGSC0003DMC400020787 FDSRSVYIIVIPDLSLDENSSSSLYIWIWRDQWKESSDQVINNDSMCDENHWHWEKVGLGFLIQKGLAT

850 860 870
Rywal MKP1 SSVLVIVKEGEEFEQLLKHLPFCFSFDKALDVGVK
GenBank MKP1 BAE4444 SSVLVIVKEGEEFEQLLKHLPFCFSFDKALDVGVK
PGSC0003DMC400020786 SSVLVIVKEGEEFEQLLKHLPFCFSFDKALDVGVK
PGSC0003DMC400020787 SSVLVIVKEGEEFEQLLKHLPFCFSFDKALDVGVK
```

Slika 19: Aminokislinska poravnava štirih sekvenc proteina StMKP1 iz krompirja sorte Rywal, sekvenc krompirja iz genske banke (GenBank: BAE4444) ter krompirja podvrste Phureja, klon DM

Sekvence se razlikujejo v 17 amino kislinah, vendar nobena sprememba ni del aktivacijskega mesta proteina.

Figure 19: Alignment of four amino acid sequences of the protein StMKP1 from potato cv. Rywal, GenBank MKP1 (GenBank: BAE4444) and *S. tuberosum* Phureja, clone DM

Sequences are different in 17 amino acids but none is not a part of the protein activation site.

4.4 SEKVENČNA ANALIZA PROMOTORJEV GENOV *StMKK6*, *StWIPK* IN *StMKP1*

Geni *StMKK6*, *StWIPK* in *StMKP1* so glede na vzorec izražanja krompirja sorte Rywal, okuženega s PVY, vključeni v preobčutljivostni odziv na okužbo s PVY. Poleg študije izražanja genov pa lahko mehanizme njihove regulacije in procese v katere so vključeni, preučujemo tudi preko promotorjev teh genov.

Izolirali in sekvencirali smo promotorje genov *StWIPK*, *StMKK6* in *StMKP1* ter njihove sekvence analizirali, da bi identificirali njihove domene. Analizirali smo sekvence, ki smo jih pridobili iz dveh sort, odpornih na PVY: Santé in Rywal, ter iz objavljenega genoma krompirja (Potato Genome Sequencing Consortium, 2011)

Na osnovi domen, ki jih na promotorju najdemo, lahko sklepamo o razvojnih procesih in odzivih na okoljske spremembe, v katere je lahko gen vključen.

4.4.1 Promotor gena *StMKK6*

Analizirali smo promotorje gena *tMKK6* iz sort Santé (256 bp), Rywal (899 bp) in podvrste Phureja (902 bp). Sekvenci promotorjev iz Rywala in Phureje sta identični, promotor iz Santéja pa se od ostalih dveh razlikuje v 34 bp-dolgi regiji. S pomočjo analize sekvenc promotorja iz Rywala (Slika 20) smo našli domene, povezane z odzivom na svetlobo (Box 1, GA, GT1, Sp1, Gap-box, L-box), vročinski stres (HSE) in ranitev (WUN), vključenost v razvoj endosperma (Skn-1, GCN4), cirkadiani ritem ter signalizacijo z giberelini (P-box) in salicilno kislino (TCA).

```

+ TGTCTTCGAA TGGCTCCAAC CAAATGCATT TCAAGTTTAC AATGAAAGAT CAGCTGGGAG AATAGTCATG
- ACAGAAGCTT ACCGAGGTTG GTTTACGTAA AGTTCAAATG TTACTTTCTA GTCGACCCTC TTATCAGTAC -823

+ CTGTTTAGGC TAGCACTGTT GTTTGGCTTT TCCTTTGTG TTGTTTCGTAA AGATATTGCT AGCACTGTTG
- GACAAATCCG ATCGTGACAA CAAACCGAAA AGGAAAACAC AACAAGCATT TCTATAACGA TCGTGACAAC -753

+ TTTGGCTTTT CAACCAATTG CTTTATATTT GTAAAGATTT GGTAGCTGGA AATTGATTTC AAGCCATCTC
- AAACCGAAAA GTTGGTTAAC GAAATATAAA CATTTCATAA CCATCGACCT TTAACTAAAG TTCGGTAGAG -683

+ TACTTGAAAC TCAACACGCT TTGGTTTAAA TCCAACTATT TGGGCTGGTC GGATAGAATA TCATGGGTGA
- ATGAACTTTG AGTTGTGCGA AACCAAATTT AGGTTGATAA ACCCGACCAG CCTATCTTAT AGTACCCACT -613

+ ACGGGTTATA GTATTTTCGT GCAATTCCAAC TATTTCATTA GTATTTGCTA CATGCATCAA TATAACATG
- TGCCCAATAT CATAAAAGCA CGTTAAGTTG ATAAAGTAAT CATAAACGAT GTACGTAGTT ATATTTGTAC -543

+ GAATAACTCT TCCTTCGAAA AACTAGACAT CCAATGAAA AGAAATCACC TCATTTTTAT CGGAAAATTT
- CTTATTGAGA AGGAAGCTTT TTGATCTGTA GGTTTACTTT TCTTTAGTGG AGTAAAAATA GCCTTTTAAA -473

+ CACTATATTA GGAGTAACAA TTAGGTAACA TATGTATGTT CAAGCATTTA GGTGACATAT ATTTATCCCG
- GTGATATAAT CCTCATTGTT AATCCATTGT ATACATACAA GTTCGTAAAT CCACTGTATA TAAATAGGGC -403

+ TTGAGAAGAA AACACAATAT ATATAAGAAA TTTTATATAG GCAATCTTT TTACAAAGGT AGAATCCATC
- AACTCTTCTT TTGTGTATA TATATTTTTT AAAATATC CGTTTAGAAA AATGTTTCCA TCTTAGGTAG -333

+ TCAACGTTAT TCTTTTTTTT TTTTTAAAA AAAAAAGAGA GGATAAAATA GGGGTATAAT TGTTAATTT
- AGTTGCAATA AGAAAAAAA AAAAATTTTT TTTTTTCTCT CCTATTTTAT CCCCATATTA ACCAATTAAA -263

+ TAATAGTTGA AAGATATTTT TAACTTTTCG TTTAAATAAT AAAAAAGATA AAGGATCACT GATTGCTTTG
- ATTATCAACT TTCTATAAAA ATTGAAAAGC AAATTTATTA TTTTCTTAT TTCCTAGTGA CTAACGAAAC -193

+ TTTTTATTCA ATTTTCAAAA TAAAATATAA AATGTGTAGG CTAAACATTC AAACCTGTCA GTAATAGAAA
- AAAAATAAGT TAAAAGTTTT ATTTTATTTT TTACACATCC GATTTGTAGG TTTGGACAGT CATTATCTTT -123
      ↑
+ TAGAATATAA TTTTGTGGT ATTTGTCTGA GTTTGAAAAT CAGTGGGTAT TTTGGGCGGT TCGTTTCACT
- ATCTTATATT AAAACACCA TAAACAGACT CAAACTTTTA GTCACCCATA AAACCGCCA AGCAAAGTGA -53

+ TTTCAAAATC TAAAATCTCC ACTTCCCCTT TCAAACCCTA GTGGATCAAA ATTATC
- AAAGTTTTAG ATTTTAGAGG TGAAGGGGAA AGTTTGGGAT CACCTAGTTT TAATAC
    
```

Slika 20: Predvidene regulatorne domene promotorja gena *StMKK6* iz sorte Rywal

Domene, ki regulirajo odziv na stres ter vključenost v razvojne procese, so domene CCAAT (rumena), GCN4 in Skn-1 (razvoj endosperma, roza in vijolična), HSE (odziv na vročino, rjava), P-box (signalizacija giberelinov, modra), TCA (signalizacija salicilne kisline, zelena), WUN (ranitev, rdeča), cirkadiana ura (siva). Puščica kaže začetek 5'UTR regije, rdeče pobarvano zaporedje ATG pa prvi nukleotid kodirajoče regije gena *StMKK6*.

Figure 20: Predicted regulatory domains of *StMKK6* native promoter from cv. Rywal

The domains that regulate stress responses and development are CCAAT-box (MYBHv1 binding site; yellow), GCN4 motif (endosperm expression; pink), HSE (heat stress; brown), P-box (gibberellins; blue), Skn-1 motif (endosperm expression; purple), TCA element (salicylic acid; green), WUN motif (wounding; red) and circadian motif (control of circadian clock; grey). The arrow indicates the predicted beginning of the 5' UTR region and the red shaded ATG indicates the start of *StMKK6* coding region.

4.4.2 Promotor gena *StWIPK*

Analizirali smo promotorja gena *StWIPK* iz sorte Rywal (888 bp) ter iz podvrste Phureja, klon DM (1025 bp). Sekvenci obeh promotorjev se razlikujeta v 30 nukleotidih. Analiza domen promotorja gena *StWIPK* iz sorte Rywal je pokazala na domene, ki so povezane z odzivom na svetlobo (3-AF1, GA, GAG, GATA, I-box,

MRE), na toplotni stres (HSE), izražanje v endospermu (GCN4, Skn-1) in meristemu in na odziv na glivne elicitorje (Box-W1). Poleg naštetih domen v promotorju sorte Rywal ima promotor iz podvrste Phureja še dve dodatni: domeno, povezano z odzivnostjo na gibereline ter domeno za vezavo transkripcijskega faktorja MYB.

4.4.3 Promotor gena *StMKP1*

Analizirali smo promotorje gena *StMKP1* iz sort Santé (379 nt), Rywal (743 bp) ter iz podvrste Phureja, klon DM (810 bp). Sekvenci iz Rywala in Phureje se razlikujeta v 14 nukleotidih, medtem ko se promotor iz Santeja od ostalih dveh razlikuje v največ petih nukleotidih. Analiza domen promotorja gena *StMKP1* iz sorte Rywal je pokazala na domene, ki so povezane z odzivom na svetlobo (ACA, ACE, Box 4, CAG, G-box, I-box, chs-CMA2B), na toplotni stres (HSE), izražanje v endospermu (Skn-1), odziv na glivne elicitorje (Box-W1), odziv na stres (ponovitve TC), signalizacijo z giberelini (motiv TATC) in vključenost v regulacijo cirkadianega ritma.

4.5 SUBCELIČNA LOKALIZACIJA PROTEINOV *StMKK6*, *StWIPK* IN *StMKP1*

Gene *StWIPK*, *StMKK6* in *StMKP1* smo klonirali v plazmida s fuzijo s fluorescenčnima proteinoma CFP in YFP ter preverili ali virus PVY^{NTN} vpliva na njihovo lokalizacijo. Proteine smo opazovali v celicah spodnje povrhnjice listov rastline *N. benthamiana*, 11 dni po okužbi s PVY^{NTN} oziroma tri dni po prehodni transformaciji rastlin s fluorescenčno označenimi geni. Poleg listov, okuženih z virusom PVY^{NTN} smo v eksperiment vključili tudi rastline s slepo okuženimi listi ter rastline, ki smo jih zgolj agroinfiltrirali brez predhodne inokulacije. Prikazane so slike lokalizacije proteinov v slepo inokuliranih celicah ter v celicah okuženih s PVY^{NTN}.

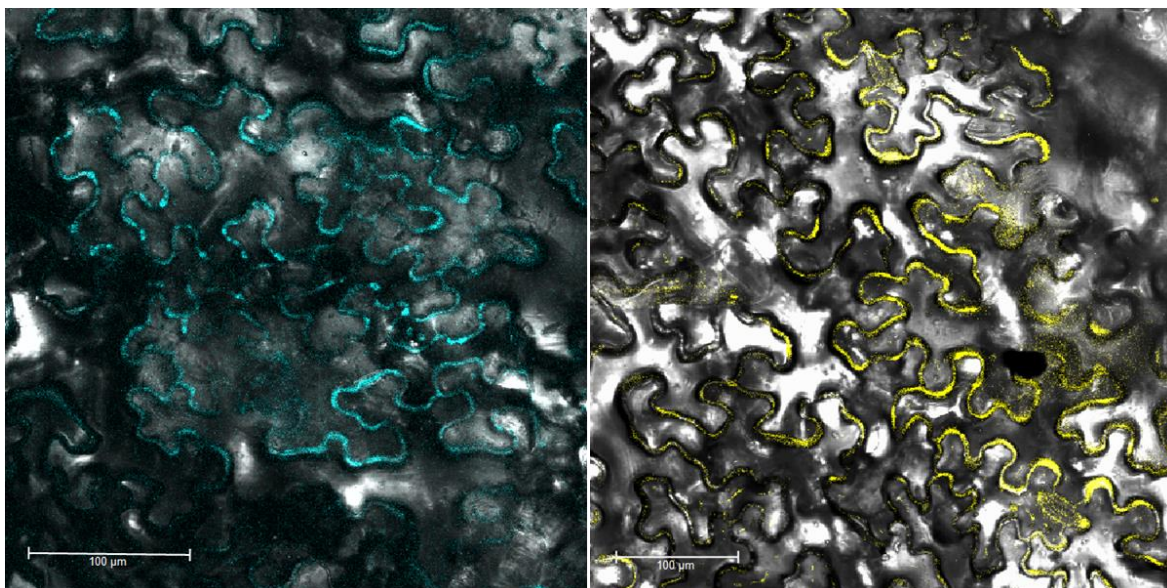
Izražanje vseh treh proteinov je bilo regulirano z močnim promotorjem CaMV 35S (angl. »Cauliflower mosaic virus«), lokalizacijo proteina *StMKK6* pa smo spremljali tudi pod kontrolo nativnega promotorja iz sorte Santé.

Uspešnost agroinfiltracije smo preverili s prehodno transformacijo eksperimentalnih rastlin s plazmidi s fluorescenčnim markerjem CFP ali YFP (Slika 21) brez vnesenih preučevanih genov.

Lokalizacijo proteina *StMKK6* smo spremljali pod kontrolo dveh različnih promotorjev: promotorja CaMV 35S in nativnega, 265 bp-dolgega promotorja.

V listih, kjer je bilo izražanje gena pod kontrolo promotorja CaMV 35S, se je protein nahajal v istih subceličnih razdelkih pri vseh treh opazovanih eksperimentih: listih brez

inokulacije, slepo inokuliranih in okuženih s PVY (Slika 22, 23). Razlik med proteini s fuzijo s CFP (Slika 22) ali YFP (Slika 23) ni bilo.

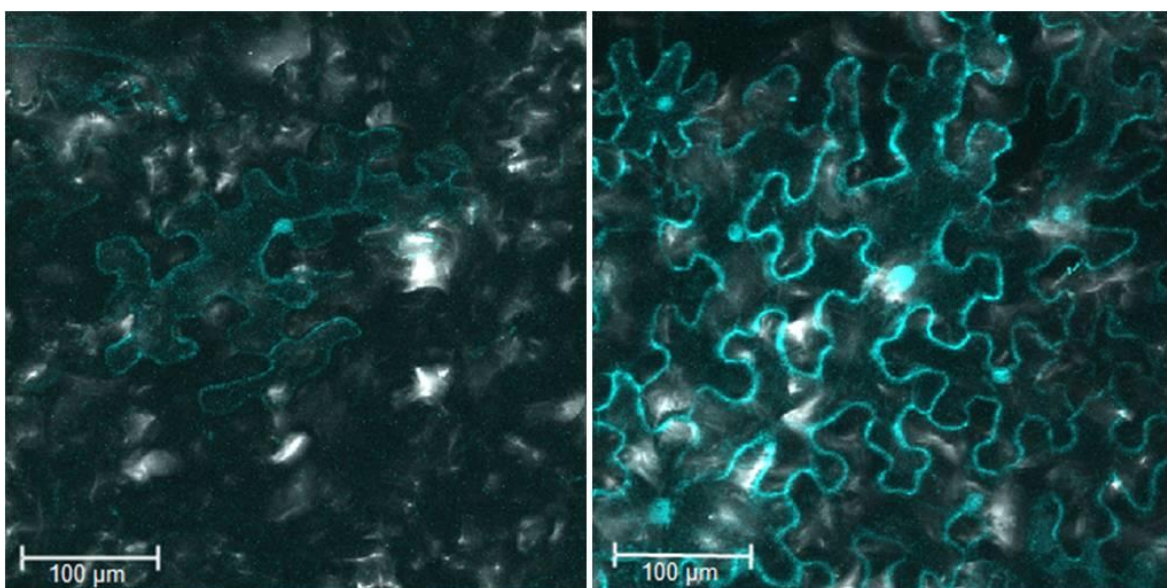


Slika 21: Lokalizacija fluorescenčnih markerjev CFP in YFP pod močnim virusnim promotorjem (CaMV 35S) brez fuzije s preučevanimi geni

Oba fluorescenčna proteina, CFP (levo) in YFP (desno), se nahajata v citoplazmi prehodno transformiranih epidermalnih celic vrste *N. benthamiana*.

Figure 21: Localisation of fluorescent markers CFP and YFP under strong viral promoter (CaMV35S) without fusion of studied genes

Both fluorescent proteins, CFP (left) and YFP (right) are localised in cytoplasm of the transiently transformed epidermal cells of *N. benthamiana*.

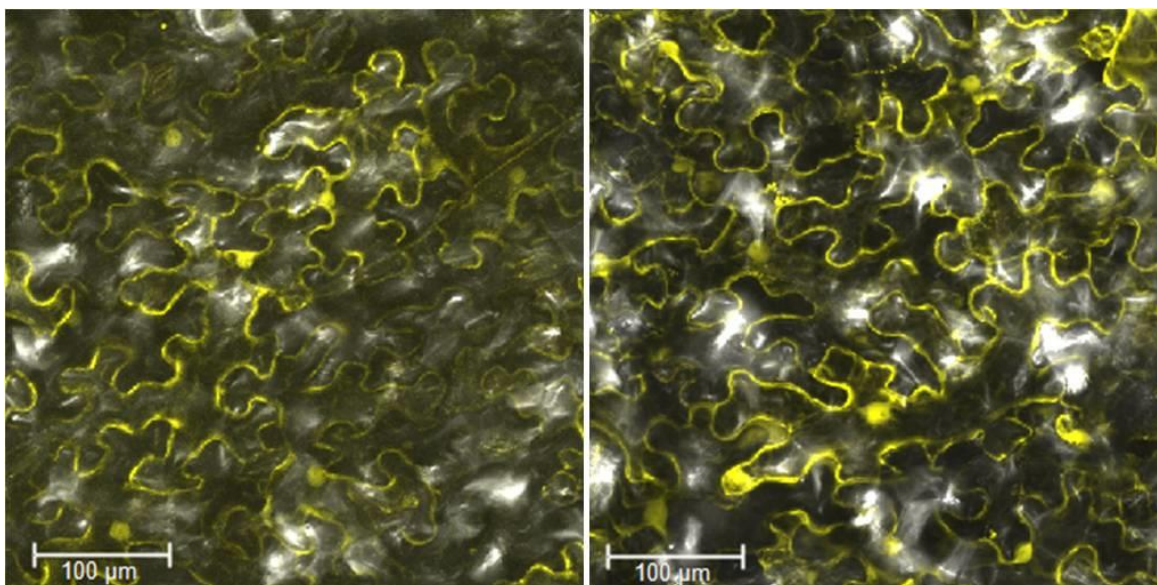


Slika 22: Lokalizacija proteina StMKK6 pod močnim virusnim promotorjem (CaMV 35S) s fuzijo s CFP

Protein se nahaja v citoplazmi in v jedru tako v slepo inokuliranih listih (levo) kot v listih, okuženih s PVY (desno).

Figure 22: Localisation of protein StMKK6 under strong viral promoter (CaMV35S) fused with CFP

Protein is localised in cytoplasm and nucleus in mock-inoculated leaves (left) as well as in PVY-infected leaves (right).



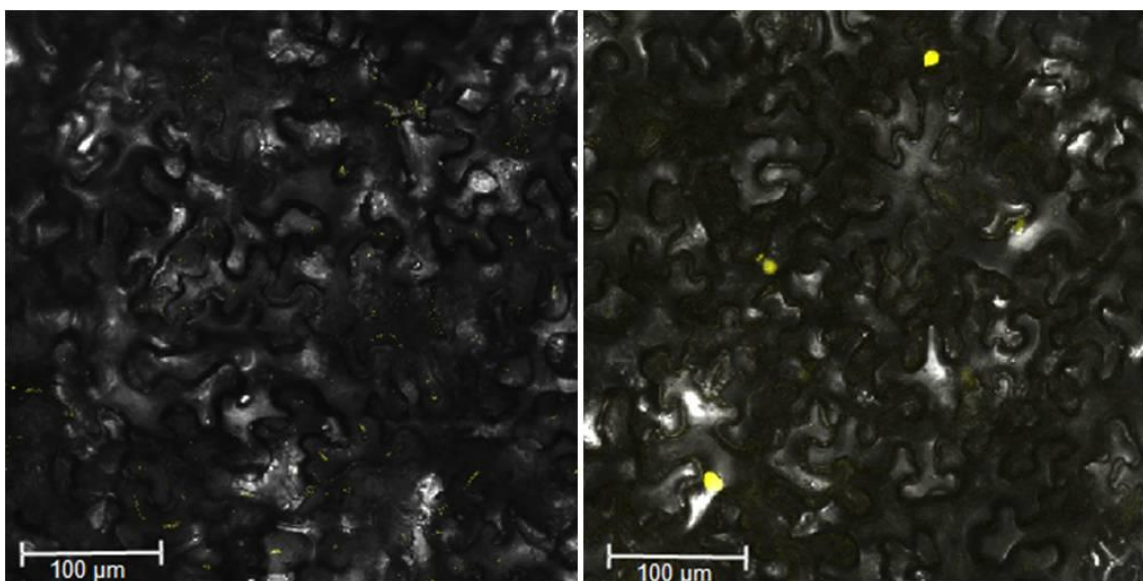
Slika 23: Lokalizacija proteina StMKK6 pod močnim virusnim promotorjem (CaMV 35S) s fuzijo z YFP

Protein se nahaja v citoplazmi in v jedru tako v slepo inokuliranih listih (levo) kot v listih, okuženih s PVY (desno).

Figure 23: Localisation of protein StMKK6 under strong viral promoter (CaMV35S) fused with YFP

Protein is localised in cytoplasm and nucleus in mock-inoculated leaves (left) as well as in PVY-infected leaves (right).

Analiza lokalizacije proteina StMKK6 s programom PredictProtein je predvidela lokalizacijo v jedru in citoplazmi, prav tako za ortolog iz rastline *A. thaliana*, AtMKK6. Ko smo protein opazovali pod nativnim promotorjem v slepo inokuliranih listih, fluorescence ni bilo (Slika 24) oziroma je bila šibkejša od ozadja. V listih, okuženih s PVY^{NTN}, pa se je protein StMKK6 nahajal v citoplazmi in jedru, vendar je bila fluorescenca jedra bistveno močnejša od šibke fluorescence citoplazme (Slika 24).



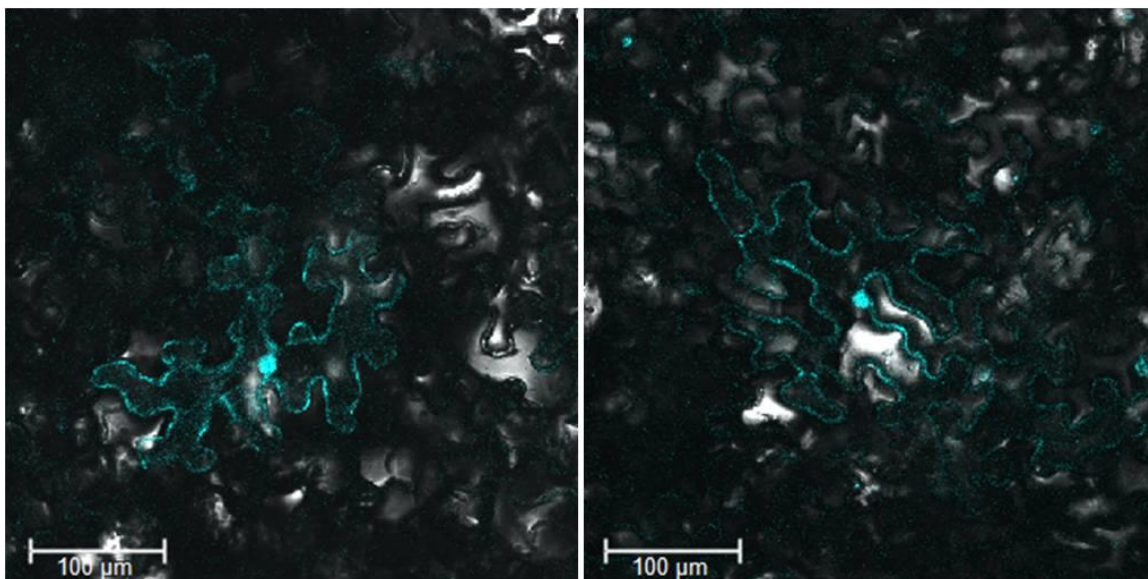
Slika 24: Lokalizacija proteina StMKK6 pod nativnim promotorjem s fuzijo z YFP

V slepo inokuliranih listih fluorescence YFP nismo opazili (levo), v listih, inokuliranih s PVY, pa vidimo močno fluorescenco v jedru ter zelo šibko v citoplazmi (desno).

Figure 24: Localisation of protein StMKK6 fused with YFP under control of native promoter

In mock-inoculated leaves no YFP fluorescence was observed (left), while in PVY-infected leaves weak fluorescence is observed in cytoplasm and strong in nucleus (right).

Protein StWIPK se je v listih, ki so bili samo agroinfiltrirani brez predhodne inokulacije, nahajal v citoplazmi in v jedru. V istih subceličnih razdelkih se je nahajal tudi v slepo inokuliranih celicah in v celicah, okuženih s PVY^{NTN} (Sliki 25 in 26). Lokalizacija proteina je bila enaka tako s fuzijo s CFP (Slika 25) kot s fuzijo z YFP (Slika 26).

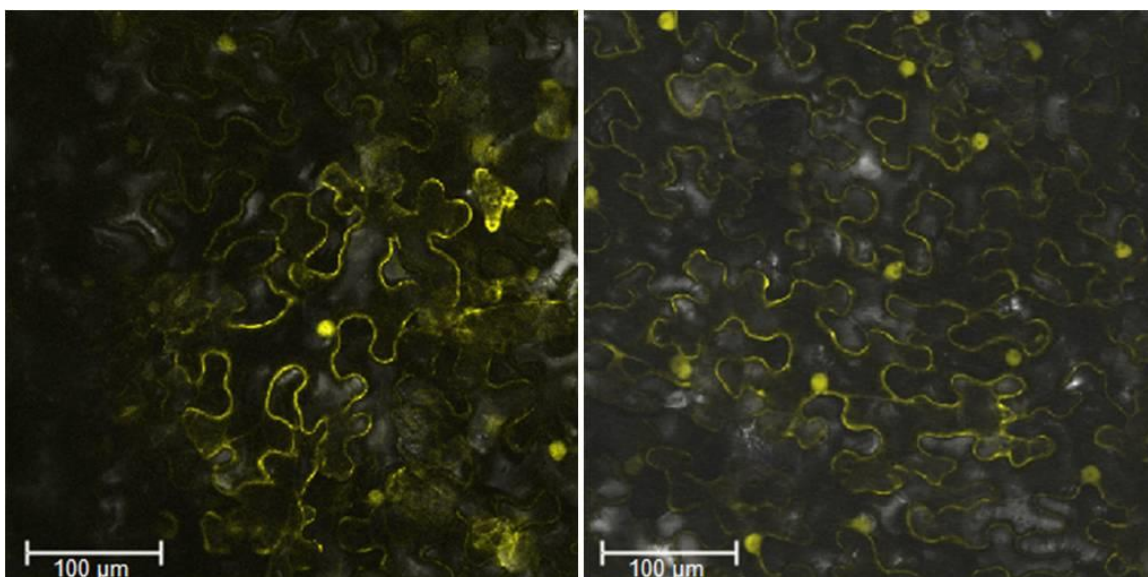


Slika 25: Lokalizacija proteina StWIPK pod močnim virusnim promotorjem (CaMV 35S) s fuzijo s CFP

Protein se nahaja v citoplazmi in v jedru tako v slepo inokuliranih listih (levo) kot v listih, okuženih s PVY (desno).

Figure 25: Localisation of protein StWIPK under strong viral promoter (CaMV35S) fused with CFP

Protein is localised in cytoplasm and nucleus in mock-inoculated leaves (left) as well as in PVY-infected leaves (right).



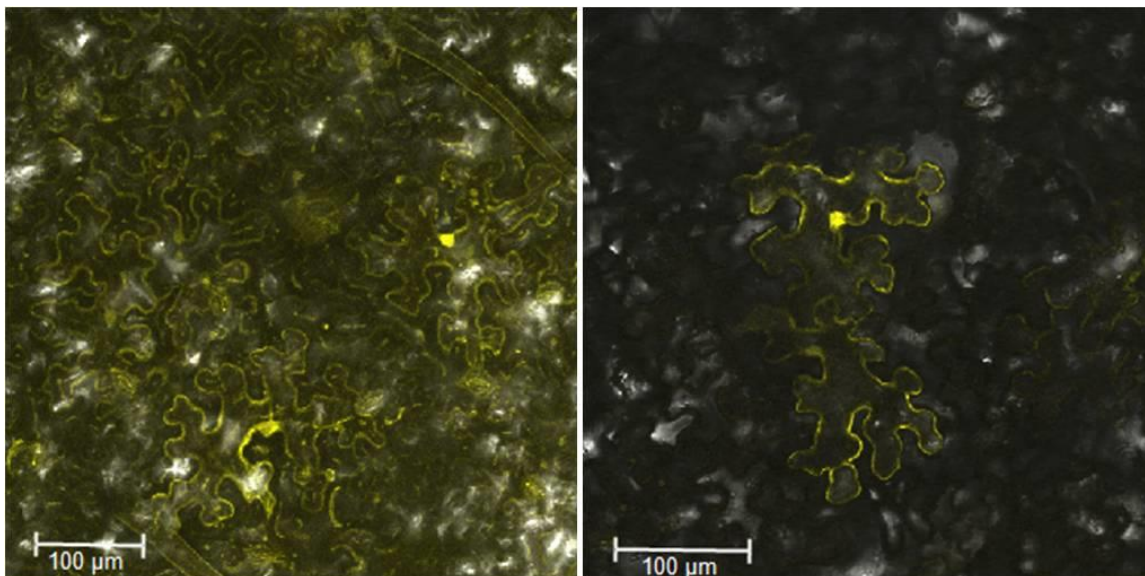
Slika 26: Lokalizacija proteina StWIPK pod močnim virusnim promotorjem (CaMV 35S) s fuzijo z YFP

Protein se nahaja v citoplazmi in v jedru tako v slepo inokuliranih listih (levo) kot v listih, okuženih s PVY (desno).

Figure 26: Localisation of protein StWIPK, under strong viral promoter (CaMV35S), fused with YFP

Protein is localised in cytoplasm and nucleus in mock-inoculated leaves (left) as well as in PVY-infected leaves (right).

Protein StMKP1 smo opazovali pod kontrolo promotorja CaMV 35S. V primeru fuzije z YFP se je nahajal v citoplazmi in v jedru v slepo inokuliranih in s PVY^{NTN} okuženih rastlinah (Slika 27). V primeru fuzije s CFP je bila fluorescenca zelo šibka tako v slepo inokuliranih kot v okuženih listih, zato je sploh nismo zaznali.



Slika 27: Lokalizacija proteina StMKP1 pod močnim virusnim promotorjem (CaMV 35S) s fuzijo z YFP

Protein se nahaja v citoplazmi in v jedru tako v slepo inokuliranih listih (levo) kot v listih, okuženih s PVY (desno).

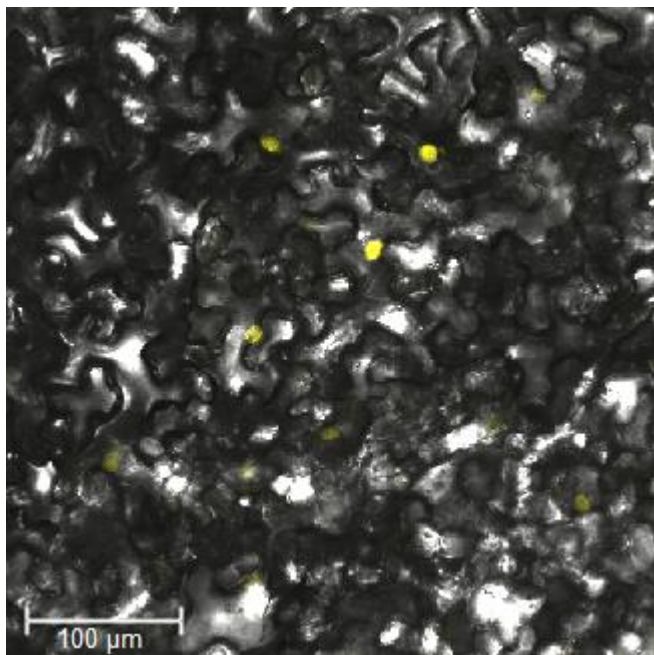
Figure 27: Localisation of protein StMKP1 under strong viral promoter (CaMV35S) fused with YFP

Protein is localised in cytoplasm and nucleus in mock-inoculated leaves (left) as well as in PVY-infected leaves (right).

4.6 INTERAKCIJE MKK6 IN MAPK

Na osnovi objavljenih rezultatov proteinskih interakcij rastline *A. thaliana* (Arabidopsis Interactome Mapping Consortium, 2011) smo preverili, ali tudi v krompirju pride do interakcij med enakimi proteini. Rezultati eksperimenta Yeast two-hybrid so pokazali, da so substrati AtMKK6 najverjetneje AtMAPK4 (AT4G01370), AtMAPK6 (AT2G43790), AtMAPK11 (AT1G01560), AtMAPK12 (AT2G46070), AtMAPK13 (AT1G07880) in TCH3 (AT2G41100) (Arabidopsis Interactome Mapping Consortium, 2011). Ortologe AtMAPK4, AtMAPK6, AtMAPK12 in AtMAPK13 smo izolirali iz krompirja sorte Rywal in klonirali v plazmide za testiranje interakcij z metodo BiFC (angl. »Bimolecular fluorescence complementation«). Poimenovali smo jih

StMAPK4_1, StMAPK4_2, StMAPK6 in StMAPK13. Za vsakega od njih smo izvedli eksperiment, s katerim smo preverjali, če gre za substrat proteina StMKK6. Fluorescenco smo opazovali v rastlinah *N. benthamiana*, v slepo inokuliranih listih in listih, okuženimi s PVY (Slike 28-31). Pozitivna kontrola eksperimenta je bila interakcija med proteinoma bZIP, ki se v jedru sestavita v dimer, kar vidimo kot rumeno fluorescirajoče jedro (Slika 28).



Slika 28: Pozitivna kontrola eksperimenta BiFC

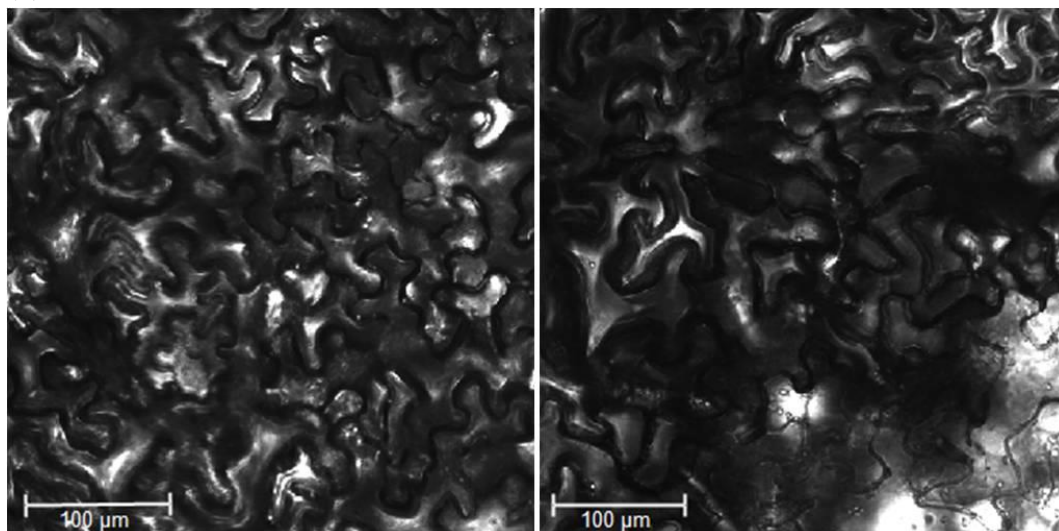
Rumena fluorescenca jedra je rezultat interakcije dve proteinov bZIP, ki se v jedru sestavita v dimer.

Figure 28: Positive control of the BiFC experiment

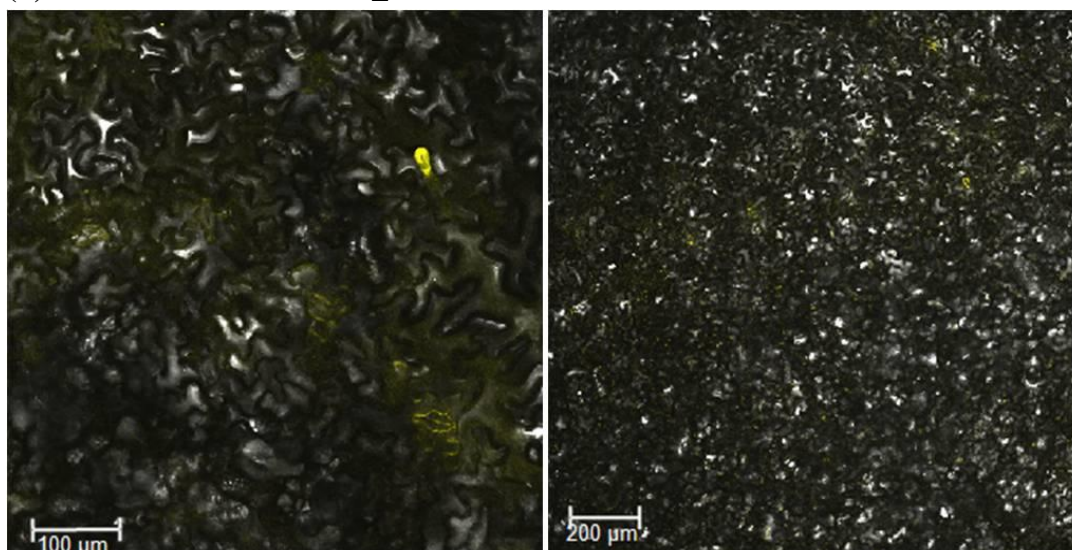
In the nucleus the bZIP proteins interact in a way that they form dimers.

Za nobenega izmed parov proteinov nismo uspeli potrditi interakcije, vsa opazovana fluorescenca je bila autofluorescenca rastlinskega tkiva (Slika 29). Opazili smo avtofluorescenca trihomov in celične stene (Slika 29b levo), fluorescenca listnih rež (Slika 26c in d levo) in fluorescenca neznanih vključkov, ki bi lahko bili kristali apnenca na spodnji povrhnjici lista (Slika 26d).

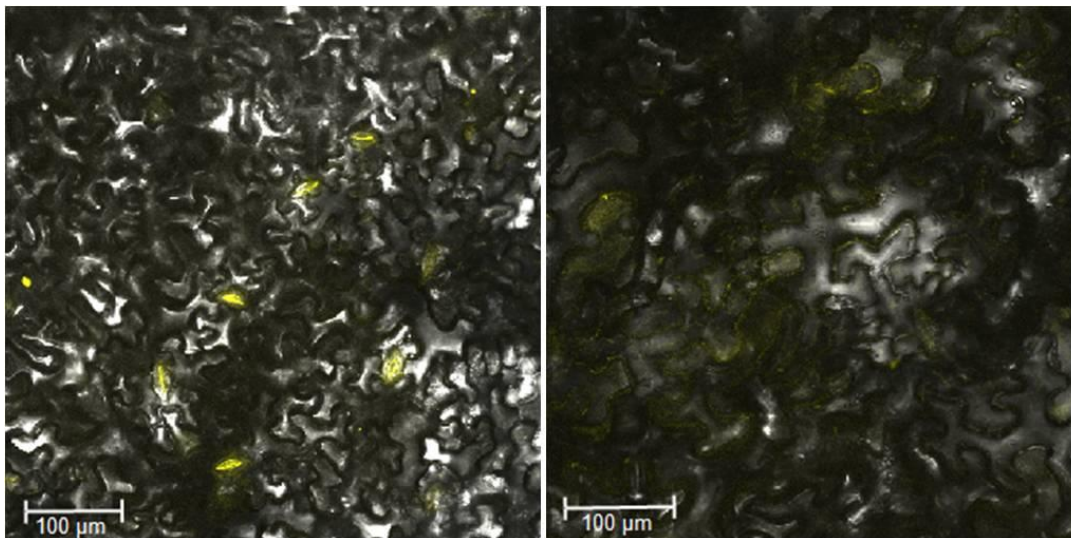
(a) StMKK6 in StMAPK4_1



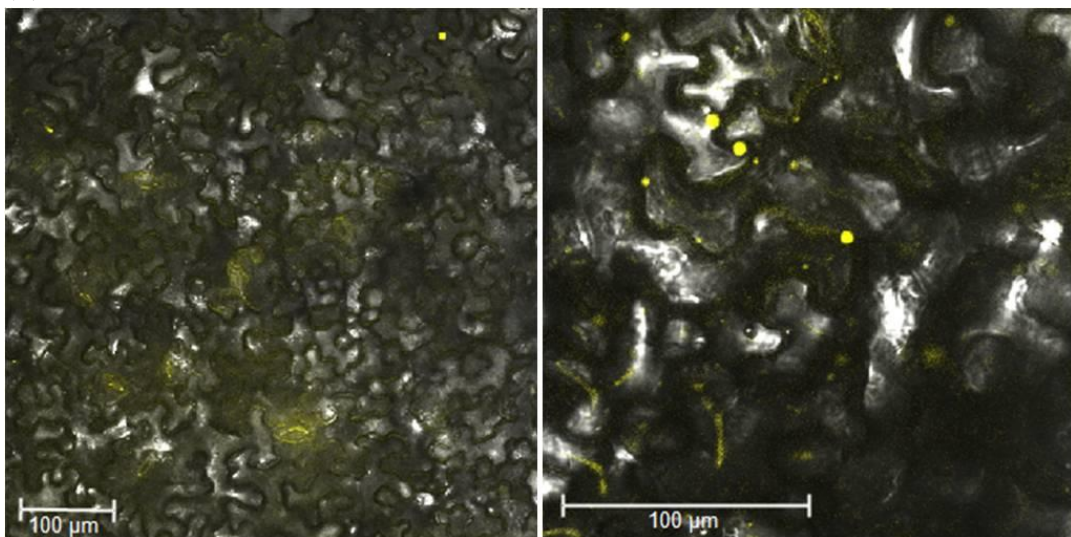
(b) StMKK6 in StMAPK4_2



(c) StMKK6 in StMAPK6



(d) StMKK6 in StMAPK13



Slika 29: Nepotrjena interakcija med proteinoma StMKK6 in StMAPK4_1 (a), StMAPK4_2 (b), StMAPK6 (c) and StMAPK13 (d).

Celice brez opažene fluorescence YFP kot rezultat interakcije med proteinom StMKK6 in testiranimi MAPK: StMAPK4_1 (a), StMAPK4_2 (b), StMAPK6 (c) in StMAPK13 (d) v listih rastline *N. benthamiana*, ki so bili slepo inokulirani (levo) in okuženi s PVY (desno).

Figure 29: Unconfirmed interaction between StMKK6 and StMAPK4_1 (a), StMAPK4_2 (b), StMAPK6 (c) and StMAPK13 (d).

Cells without observed YFP as a result of an interaction between StMKK6 and tested MAPKs: StMAPK4_1 (a), StMAPK4_2 (b), StMAPK6 (c) and StMAPK13 (d) in leaves of *N. benthamiana*, mock-inoculated (left) and PVY-infected (right).

Ker se je metoda BiFC izkazala za nezanesljivo metodo preverjanja interakcij med proteini, smo interakcije preverili z metodo Yeast two-hybrid, eksperimente je opravila

dr. Anna Coll (Lazar in sod., 2014). Potrdili smo tri izmed štirih interakcij in ugotovili, da so substrati krompirjevega proteina StMKK6: StMAPK4_2, StMAPK6 in StMAPK13 (Preglednica 5). Dodatno smo preverili tudi, ali je protein StWIPK substrat proteina StMKK6 (Preglednica 5). Do interakcije ni prišlo.

Preglednica 5: Rezultati testiranih interakcij proteina StMKK6 s proteini StWIPK, StMAPK4_1, StMAPK4_2, StMAPK6 in StMAPK13.

Rezultati so prikazani za metodi BiFC in Yeast two-hybrid. Pozitivne interakcije so označene s »+«.

	BiFC	Yeast two-hybrid
MKK6-WIPK	-	-
MKK6-MAPK4_1	-	-
MKK6-MAPK4_2	-	+
MKK6-MAPK6	-	+
MKK6-MAPK13	-	+

Glede na rezultate mikromrež s PVY okuženega krompirja sorte Rywal in transgenega krompirja NahG-Rywal se vzorci izražanja genov *StMAPK4_2*, *StMAPK6* in *StMAPK13* razlikujejo od vzorca izražanja gena *StMKK6* (Slika 10B in Slika 30). Gen *StMAPK4_2* ima v primerjavi s slepo inokulirano kontrolo višje izražanje v transgenem krompirju NahG-Rywal, prav tako gen *StMAPK13*, vendar v manjši meri (Slika 30). Tretji potrjen substrat, *StMAPK6*, ni diferencialno izražen.

Sonda	Gen	Fito ID	Ortolog vrste <i>A. thaliana</i>	Rywal			NahG-Rywal		
				1 dpi	3 dpi	6 dpi	1 dpi	3 dpi	6 dpi
MICRO.5536.C1	StMAPK4_2	PGSC0003DMG401000057	AtMAPK4	-0.58	0.67	0.52	-0.02	1.57	1.66
MICRO.3797.C3	StMAPK6	Sotub08g010260*	AtMAPK6	0.04	0.11	0.16	0.18	0.26	0.55
MICRO.2352.C1	StMAPK13	PGSC0003DMG400025366	AtMAPK13	0.36	0.71	0.76	-0.07	0.66	1.00

Slika 30: Izražanje potrjenih substratov proteina StMKK6 v krompirju sorte Rywal in NahG-Rywal, 1, 3 in 6 dpi (Baebler in sod., 2014)

Vsaki sondi je pripisano ime gena, ortolog iz krompirja *S. tuberosum* Phureja, klon DM-Fito ID (Ramšak in sod., 2014) in ortologi iz vrste *A. thaliana*. Prikazane so log₂ vrednosti razlik med izražanjem v slepo inokuliranih in s PVY inokuliranih rastlinah. Zvezdica (*) pri Fito ID imenu gena za *StMKK6* nakazuje, da ta gen nima svojega PGSC modela. Statistično značilne razlike (p<0,05) so odebeljene. Navzdol regulirane vrednosti so obarvane rumeno in navzgor regulirane modro.

Figure 30. Gene expression pattern of confirmed interactions of StMKK6 in cv. Rywal and NahG-Rywal, 1, 3 and 6 dpi (Baebler et al., 2014)

To each probe name of the gene, orthologue from potato *S. tuberosum* Phureja, clone DM-Fito ID (Ramšak in sod., 2014) and *A. thaliana* orthologues are assigned. Log₂ of gene expression differences between PVY-infected and mock-inoculated plants are indicated for each time point. Statistically significant differences (p<0.05) are given in bold. The star (*) for StMAPK6 PGSC gene ID indicates that the gene was not predicted in PGSC gene model. Up-regulated values are in blue and down-regulated values are in yellow.

Preverili smo tudi logaritmirane vrednosti izražanja potrjenih substratov *StMKK6* in vrednosti izražanja gena *StMKK6* v slepo inokuliranih rastlinah (Slika 31). Vsi trije geni

imajo višje vrednosti v primerjavi z genom *MKK6*, kar nakazuje na zadostne količine razpoložljivega substrata za interakcijo s proteinom StMKK6.

Name	Microarray probe ID	Rywal				NahG-Rywal			
		R1_1	R1_2	R1_3	R1_4	nah1_1	nah1_2	nah1_3	nah1_4
StMKK6	MICRO.17148.C1	6.76	6.46	6.51	6.49	6.75	6.80	6.73	6.69
StMAPK4_2	MICRO.5536.C1	11.68	11.81	11.80	11.42	10.91	11.08	10.91	10.82
StMAPK6	MICRO.3797.C3	12.26	12.09	12.06	12.31	11.81	11.97	12.17	11.96
StMAPK13	MICRO.2352.C1	6.78	7.73	7.55	7.75	7.33	7.47	7.48	7.35

Slika 31: Jakost izražanja genov *StMKK6*, *StMAPK4_2*, *StMAPK6* in *StMAPK13* 1dpi v slepo inokuliranih listih krompirja

Vključene so štiri rastline netransgenega Rywala (R) in štiri rastline transgenega NahG-Rywala (nah). V obeh skupinah rastlin je izražanje gena *StMKK6* najnižje.

Figure 31. Expression values of *StMKK6*, *StMAPK4_2*, *StMAPK6* and *StMAPK13* genes in mock-inoculated plants, 1dpi

The expression is shown for four mock treated Rywal (R) and NahG-Rywal (nah) plants. In both sets of plants the expression of the *StMKK6* interacting MAPKs is higher than of *StMKK6*. Calculated are differences in the expression between Rywal and NahG-Rywal plants.

4.7 Z VIRUSOM INDUCIRANO UTIŠANJE GENA *StWIPK* (VIGS)

Ker je gen *StWIPK* diferencialno izražen v sorti Rywal po okužbi s PVY, sklepamo, da je vključen v odziv krompirja na okužbo. Z eksperimentom utišanja gena *StWIPK* s sistemom VIGS smo želeli preveriti, ali utišanje gena vpliva na učinkovitost širjenja virusa. Rastline vrste *S. venturii* smo agroinfilirali s konstrukti za utišanje gena *StWIPK* in po treh tednih iste liste še inokulirali z virusom PVY^N, označenim z zelenim fluorescenčnim proteinom (GFP); PVY^N-GFP (Rupar in sod., 2014). V treh časovnih točkah smo preverjali intenzivnost širjenja virusa v zgornje, neinokulirane liste rastline.

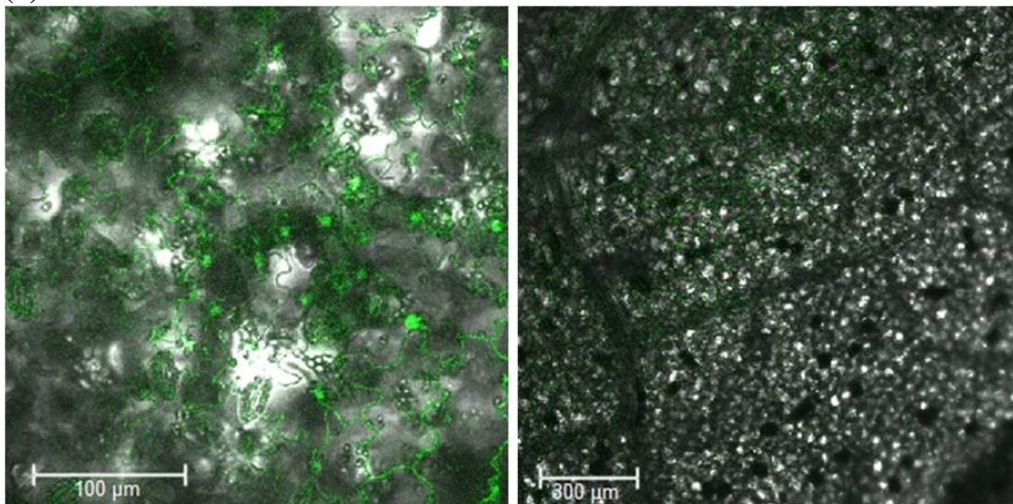
V vsaki časovni točki smo preverili po tri liste za posamezno kombinacijo agroinfilracij in inokulacije (samo PVY^N-GFP, agroinfilracija s praznim plazmidom in PVY^N-GFP, agroinfilracija s konstruktom za utišanje in PVY^N-GFP, agroinfilracija s praznim plazmidom in slepa inokulacija, agroinfilracija s konstruktom za utišanje in slepa inokulacija). Fluorescenco virusa PVY^N-GFP smo v zgornjih, neinokuliranih listih opazili že v najzgodnejši časovni točki, 18 dpi (Sliki 32 a in b), in sicer v vseh okuženih listih, ne glede na tip predhodne agroinfilracije (z ali brez utišane *StWIPK*). Šibko fluorescenco virusa smo videli tudi v listih, kjer je bil predhodno utišan gen *StWIPK* (Slika 32 b). V slepo inokuliranih listih je fluorescenco povzročala avtofluorescenca celičnih sten ali rež spodnje povrhnjice (Slika 32 c, levo).

Virus se je še dodatno namnožil in razširil tudi v kasnejših časovnih točkah, tako v utišanih kot v neutišanih rastlinah: v 21 dpi (Slika 32c desno, brez utišanja gena *StWIPK* in Slika 32d, z utišanim genom *StWIPK*) ter v 27 dpi (Slika 32e desno, brez

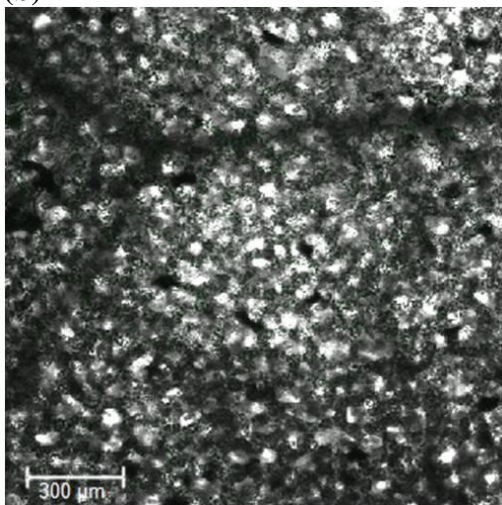
utišanja gena *StWIPK* in Slika 32f desno, z utišanim genom *StWIPK*). V slepo inokuliranih rastlinah smo zaznali le avtofluorescenco (Slike 32c levo, 32f levo).

V vseh treh časovnih točkah sta bili jakost in razširjenost fluorescence virusa PVY^N-GFP primerljiva med listi z utišanim genom *StWIPK* in listi brez utišanja.

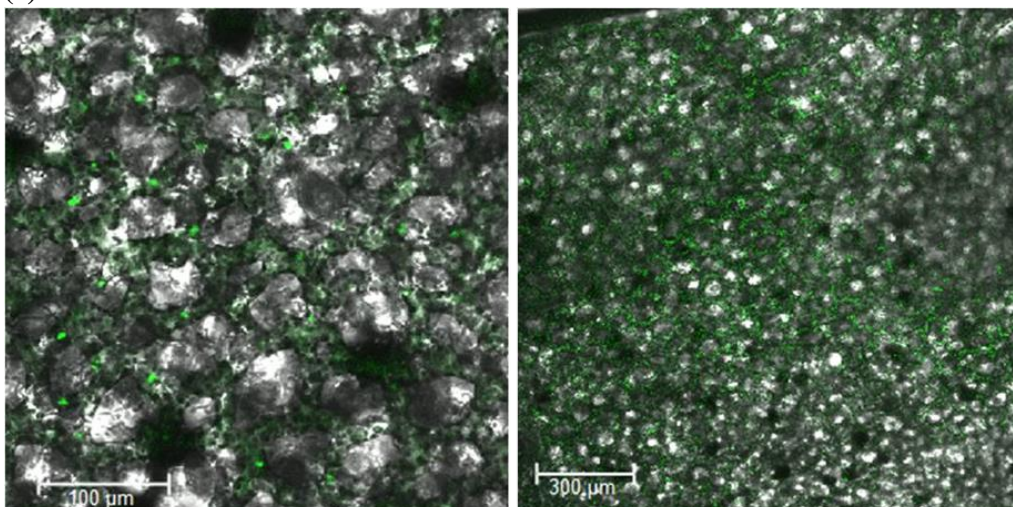
(a)



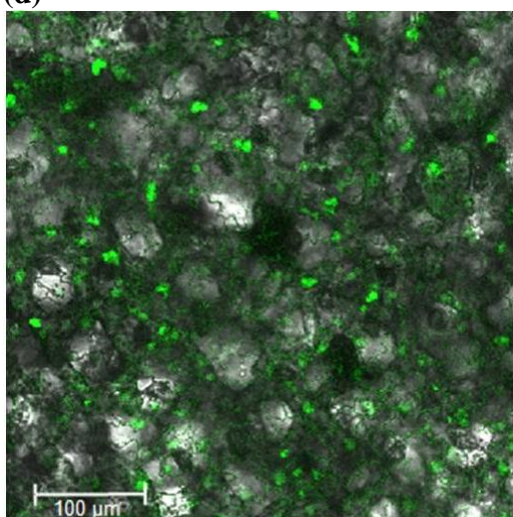
(b)



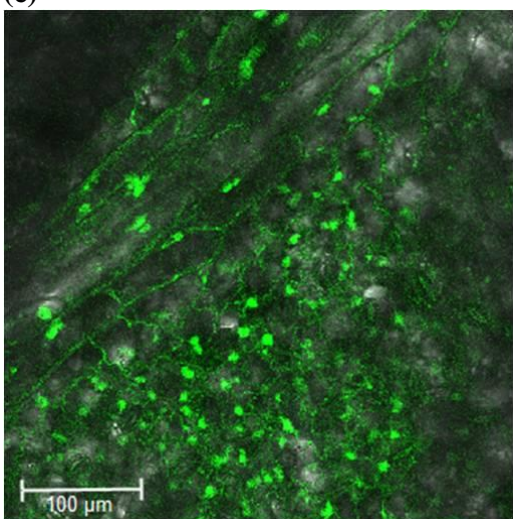
(c)



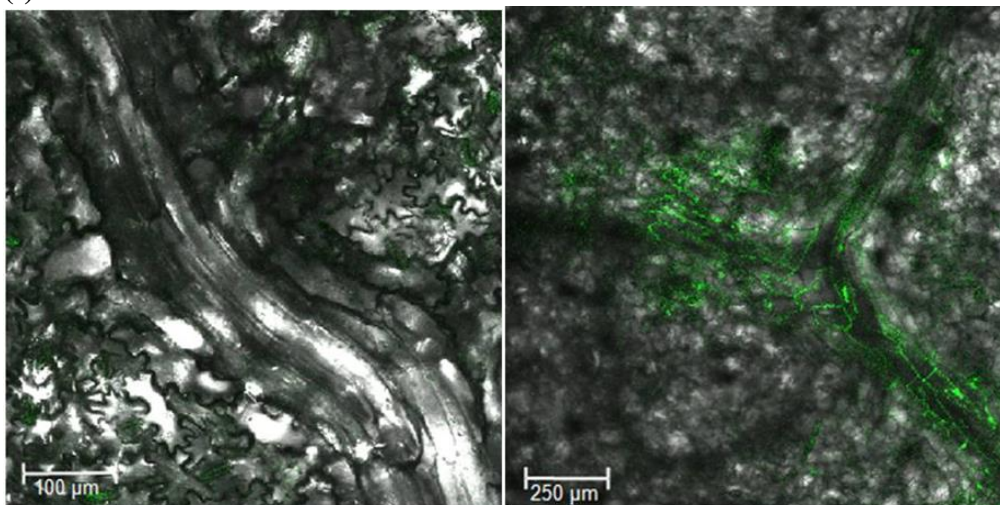
(d)



(e)



(f)



Slika 32: Širjenje virusa PVY^N-GFP v zgornjih, neinokuliranih listih rastline *S. venturii* po utišanju ali brez utišanja gena *StWIPK*, v treh časovnih točkah: 18, 21 in 27 dpi

Primerjali smo širjenje virusa PVY^N-GFP po zgornjih listih med rastlinami vrste *S. venturii* brez utišanege gena *StWIPK* in rastlinami z utišanim genom *StWIPK*. (a) Listi rastline *S. venturii*, brez utišanja gena *StWIPK* in okužene s PVY, 18 dpi. Virus PVY se je razširil v zgornje, neinokulirane liste rastline. (b) Listi rastline *S. venturii*, z utišanim genom *StWIPK*, in okužene s PVY, 18 dpi, kjer je opazna šibka fluorescenca virusa. (c) Listi brez utišanja gena *StWIPK* v slepo inokuliranih rastlinah in z virusom PVY okuženih rastlinah vrste *S. venturii*, 21 dpi. V slepo inokuliranih rastlinah (levo) vidimo avtofluorescenco gobastega tkiva, v okuženih rastlinah (desno) pa vidimo virus, razširjen po celi površini lista. (d) Listi rastline *S. venturii*, z utišanim genom *StWIPK*, in okužene s PVY, 21 dpi. Virus je razširjen po celi površini lista. (e) List rastline *S. venturii* brez utišanja gena *StWIPK* in okužene s PVY, 27 dpi. V zgornjem, neinokuliranem listu se virus širi po celem listu iz žile naprej proti robovom lista. (f) List rastline *S. venturii* z utišanim genom *StWIPK* v slepo inokuliranih rastlinah in z virusom PVY okuženih rastlinah vrste *S. venturii*, 27 dpi. V slepo inokuliranih rastlinah (levo) ni fluorescence, v okuženih rastlinah (desno) pa je virus razširjen po celi površini lista.

Figure 32: Spread of the virus PVY^N-GFP in the upper, non-inoculated leaves of *S. venturii* with or without the silencing of *StWIPK* in three time points: 18, 21 and 27 dpi

We compared viral spread of the PVY^N-GFP in the upper leaves of *S. venturii* between the non-silenced and silenced plants. (a) Leaves of *S. venturii* infected with PVY without the silencing of *StWIPK*, 18 dpi. The PVY has spread in the upper, non-inoculated leaves. (b) Leaves of *S. venturii*, infected and with the silencing of *StWIPK*, 18 dpi where the weak fluorescence of the virus can be observed. (c) Leaves without the silencing of *StWIPK* in mock-inoculated plants and plants, infected with PVY, 21 dpi. In mock-inoculated plants (left) the autofluorescence of the sponge tissue can be observed, while in the infected plants (right) the virus has spread through the whole leaf. (d) Leaves of *S. venturii* with the silencing of *StWIPK* and infected with PVY, 21 dpi. Virus has spread through the whole leaf. (e) Leaves of *S. venturii* without the silencing of *StWIPK* and infected with PVY, 27 dpi. In the upper leaf the PVY has spread through the whole leaf from the veins to the edges. (f) Leaves of *S. venturii* with the silencing of *StWIPK* in mock-inoculated plants and in plants, infected with PVY, 27 dpi. In mock-inoculated plants (left) no fluorescence was observed, while in infected plants (right) the virus has spread through the whole leaf.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

V doktorskem delu smo raziskali vključenost MAPK v obrambni odziv krompirja na okužbo s PVY. Osredotočili smo se na krompir sorte Rywal, ki se na PVY odzove s preobčutljivostnim odgovorom. Pridobili smo nabor enaintridesetih skupin diferencialno izraženih potencialnih paralogov, ki so vsi komponente kaskade MAPK. Z nadaljnjo analizo smo razčlenjevali, kako so ti geni vpleteni v imunski odgovor krompirja na PVY in se osredotočili na tri gene: *StMKK6*, *StWIPK* in *StMKP1*. V krompirju smo analizirali družino MAPK, MKK in MKP. Sledila je analiza izražanja izbranih genov v krompirjevih tkivih in v odzivu na tretiranje rastlin z različnimi biotskimi in abiotskimi stresii. Preverili smo tudi, kje se nahajajo fluorescentno označeni preučevani proteini pred in po okužbi s PVY, za protein *StMKK6* tudi pod kontrolo nativnega promotorja. Poleg tega smo preučili še vpliv utišanja gena *StWIPK* na širjenje virusa PVY.

5.1.1 Krompir ima v primerjavi z modelno rastlino *A. thaliana* manj predstavnikov MAPK

Na osnovi primerjave sekvenc krompirjevih genov iz krompirja sorte Rywal ter krompirja podvrste Phureja s sekvencami modelne rastline *A. thaliana*, smo ugotovili, da ima krompir manj predstavnikov MAPK, MKK in dvojno specifičnih fosfataz.

Vrsta *A. thaliana* ima v družini MAPK dvajset genov, ki so razvrščeni v štiri skupine, od A do D (Ichimura in sod., 2002). Naša analiza je obsegala zgolj predstavnike skupin A in B, saj so tja uvrščeni geni, ki smo jih, po analizi izražanja MAPK v krompirju po okužbi s PVY (Slika 10C) in analizi potencialnih substratov proteina *StMKK6*, izolirali iz sorte Rywal. Izmed petih izoliranih genov (*StWIPK*, *StMAPK4_1*, *StMAPK4_2*, *StMAPK6*, *StMAPK13*), so se geni *StWIPK*, *StMAPK4_1*, in *StMAPK4_2* diferencialno izražali v odgovoru na okužbo. V vrsti *A. thaliana* je v skupino A in B uvrščenih osem genov, v krompirju pa zgolj šest (Slika 15). Analiza genov *StWIPK*, *StMAPK4_1*, *StMAPK4_2*, *StMAPK6* in *StMAPK13* je razkrila, da obstajata v krompirju zgolj dva ortologa genov *AtMAPK4*, *-11* in *-13*, in sicer *StMAPK4_1* in *-4_2*, gen *AtMAPK10* pa ortologa v krompirju nima.

Tudi v drugih rastlinskih vrstah je število genov celotne družine MAPK (skupine A, B, C in D) zelo različno: v murvi je identificiranih deset MAPK (Wei in sod., 2014), v rižu šestnajst, v trti dvanajst, v soji enaintrideset, v topolu enaindvajset, v papaji deset (povzeto po Janitza in sod., 2012), v jablani šestindvajset (Zhang in sod., 2013), v tobaku sedemnajst (Zhang in sod., 2013) in v paradižniku šestnajst (Kong in sod.,

2012). Sklepamo lahko, da ima tudi krompir vseh MAPK okrog šestnajst, tako kot njegova bližnja sorodnika tobak in paradižnik.

Še večja odstopanja smo opazili pri skupini fosfataz MAPK, kjer krompir v primerjavi z modelno rastlino *A. thaliana* nima predstavnika za gena *MKP2* in *DsPTP1*. Fosfataza *MKP2* se je domnevno razvila iz fosfataze *DsPTP1*, specifična je za križnice, poleg tega pa je tudi pozitiven regulator tolerance na oksidativni stres z desfosforilacijo MAPK3/6 (Lee in Ellis, 2007), vključena pa je tudi v negativno regulacijo preobčutljivostnega odziva rastline ob napadu glivnih patogenov preko defosforilacije MAPK6 (Lumbreras in sod., 2010; Vilela in sod., 2010). Funkcija fosfataze *DsPTP1* pa je zaenkrat še neznana (Bartels in sod., 2010).

Geni družine *MKK* so bili doslej določeni v naslednjih rastlinskih vrstah: v rastlini *A. thaliana* je določenih deset *MKK* (Ichimura in sod., 2002), v vrsti *N. attenuata* pet (Heinrich in sod., 2011), v rižu osem (Singh in Jwa, 2013), v rodu *Brachypodium* sp. dvanajst (Chen in sod., 2012), v topolu deset (Nicole in sod., 2006), v jablani devet (Zhang in sod., 2013) in v oljni ogrščici sedem (Liang in sod., 2013).

Pri krompirju smo analizirali celotno družino *MKK* (Slika 14), vključno z geni iz družine *MKK* vrste *A. thaliana*, treh vrst rodu *Nicotiana* (*N. benthamiana*, *N. tabacum* in *N. attenuata*) in iz paradižnika. S sekvenčno analizo smo ugotovili, da je družina *MKK* v razhudnikovkah manj obsežna kot v modelni rastlini *A. thaliana*; v krompirju in paradižniku smo identificirali pet predstavnikov družine *MKK* in v vrsti *N. benthamiana* osem. Pet genov *MKK* je bilo identificiranih tudi v vrsti *N. attenuata*, v tobaku pa eden manj, saj nima ortologa genov *MAPK7/8/9/10* (Slika 14). Iz filogenetskega drevesa družine *MKK* v razhudnikovkah in rastlini *A. thaliana* je razvidno, da ima zgolj tobak *N. benthamiana* tri možne paraloge MAPK kinaz, krompir in paradižnik pa nimata nobenega. Od analiziranih vrst ima *A. thaliana* največ pripadnikov družine *MKK*, kar je lahko posledica podvojitve genov v predniku *A. thaliana* po cepitvi razhudnikovk in križnic v dve ločeni družini. Posledično trem od petih krompirjevih *MKK* ni bilo mogoče pripisati posameznega ortologa vrste *A. thaliana*. Čeprav ima *A. thaliana* načeloma deset genov v družini *MKK*, je možno, da vsi geni niso funkcionalni; to velja predvsem za *AtMKK8* in *AtMKK10*. *AtMKK8* sicer vsebuje MAPK aminokislinski motiv, vendar za ta gen ni ekspresijskih rezultatov, medtem ko *AtMKK10* nima primerne prepoznavnega mesta v aktivacijski domeni (Hamel in sod., 2006). Možno je tudi, da imajo krompirjeve *MKK* več raznolikih funkcij, kar nadomešča manjše število genov v primerjavi z vrsto *A. thaliana*.

Problematika iskanja ortologov kaskade MAPK med vrstami je bila izpostavljena že v članku o evoluciji signalizacije MAPK (Dóczy in sod., 2012); glavni razlog za ta

odstopanja naj bi bila hitra ekspanzija in diferenciacija MAPK ter posledično tudi hitra evolucija signalizacije MAPK.

Glede na vključenost genov *WIPK* in *MKPI* v širok spekter razvojnih procesov in odzivov na stres lahko sklepamo, da imata omenjena gena v signalizaciji MAPK izjemno pomembno funkcijo in sta najverjetneje tudi evolucijsko dobro ohranjena vzdolž celotnega rastlinskega kraljestva. Za gen *StMKK6* smo opravili podrobnejšo analizo zastopanosti v rastlinskem kraljestvu in našli devetintrideset ortologov gena *MKK6* (Slika 17). Po sekvenčni podobnosti je najbližje krompirjevi *MKK6* paradižnikova *LeMKK3*, saj se sekvenci razlikujeta v zgolj eni amino kislini. Paradižnikovemu ortologu sledijo po podobnosti geni iz ostalih vrst družine razhudnikovk, ki se od *StMKK6* razlikujejo za največ osem amino kislin. Ortologe *MKK6* smo našli tudi pri golosemenkah in mahovih, pri algah pa ne, čeprav je znano, da imajo alge vsaj dva predstavnika družine MKK (Dóczi in sod., 2012). Razširjenost gena *MKK6* vzdolž rastlinskega kraljestva nakazuje na njegovo pomembno vlogo pri regulaciji celičnih procesov.

5.1.2 Geni *StMKK6*, *StWIPK* in *StMKPI* so vključeni v odziv na ranitev

Na osnovi izražanja vseh petih krompirjevih *MKK* po tretiranju rastlin krompirja z različnimi biotskimi stresi (Massa et al., 2011) vidimo, da so geni *StMKK1/2*, *StMKK3*, *StMKK6* in *StMKK7/9* navzdol regulirani po ranitvi listov, *StMKK6* pa je v biotskem stresu še dodatno navzdol reguliran po tretiranju z glivnim elicitorjem butirično kislino (Slika 11). V splošnem pa je bazalno izražanje gena *StMKK6* in posledično količina mRNA zelo nizka. Zaenkrat ni dodatnih eksperimentalnih dokazov, ki bi podpirali te rezultate, obstajajo zgolj posredni; promotor gena *StMKK6* iz sorte Rywal ima domeno, ki regulira odziv na ranitev: domeno WUN (Slika 20).

Tako kot večina *MKK* sta tudi gena *StWIPK* in *StMKPI* po ranitvi listov navzdol regulirana (Sliki 12 in 13), vendar bistveno močnejše kot *StMKK6*, saj je tudi nivo njunega bazalnega izražanja precej višji. Količina mRNA gena *StMKPI* je kar osemkrat nižja v primerjavi s kontrolo, medtem ko je pri genu *StWIPK* ta razlika štirikratna. Mnogo eksperimentalnih rezultatov podpira vključenost genov *MKPI* in *WIPK* v regulacijo odziva rastline na ranitev, kjer se gen *WIPK* sproži že zelo zgodaj po ranitvi, *MKPI* pa je negativni regulator te sprožene kaskade. V nasprotju z rezultati krompirjeve *WIPK* pa rezultati pri drugih rastlinskih vrstah kažejo nasprotno – porast mRNA in aktivnosti proteina že zelo zgodaj po ranitvi. Gen *WIPK* so poimenovali po njegovi prvi poznani funkciji (*WIPK* angl. »wound-induced protein kinase«), saj se njegovo izražanje in/ali aktivacija poveča ob ranitvi rastline oziroma objedanju herbivora (Heinrich in sod., 2011; Klessig in sod., 2004; Meldau in sod., 2012). Pri tobaku *N. tabacum* sproži ranitev porast mRNA gena *NtWIPK* in tudi aktivne oblike proteina

NtWIPK že v prvih 10 – 30-ih minutah po ranitvi, gen pa je reguliran post-translacijsko (Seo in sod., 1999; Yamakawa in sod., 2004; Yap in sod., 2005). Konstitutivno izražen gen NtWIPK vodi v rastlini v povečano izražanje proteinaznega inhibitorja II in močno akumulacijo jasmonske kisline, glavnega signalnega hormona med odzivom na herbivorijo (Seo in sod., 1999). V signalizacijo ob ranitvi oziroma herbivoriji je vključen tudi gen *MKPI*, in sicer kot negativni regulator signalizacije MAPK z defosforilacijo tobakovih proteinov SIPK/WIPK oziroma riževih MAPK3/6 (Katou in sod., 2007; Yamakawa in sod., 2004). Povečano izražanje gena *MKPI* v tobaku v kombinaciji z ranitvijo vodi v zmanjšano akumulacijo jasmonske kisline (Seo in sod., 2007) in inhibicijo genov *WIPK* in *SIPK*, utišanje gena *MKPI* v tobaku pa ima posledično prav nasprotni učinek; v rastlini se dodatno akumulira tudi hormon etilen (Oka in sod., 2013). Naši rezultati (Sliki 12 in 13) kažejo manjšo količino mRNA v primerjavi s kontrolo za gena *StWIPK* in *StMKPI*, vzorce listov pa smo v primerjavi z rezultati iz literature pobrali v kasnejših časovnih točkah: po 24-ih, 36-ih in 72-ih urah. Glede na objavljeno literaturo je odziv genov *WIPK* in *MKPI* na ranitev zelo hiter, vendar se zdi, da tudi kratkotrajen, saj je glede na naše rezultate (Sliki 12 in 13) količina mRNA bistveno nižja v primerjavi z netretirano kontrolo že en dan po ranitvi.

Analiza izražanja gena *StWIPK* po tretiranju z različnimi hormoni (Slika 12) je tudi pokazala, da se izražanje gena *StWIPK* močno poveča po tretiranju s hormoni citokinini, vendar v literaturi doslej podatkov o tem še ni bilo. V povezavi s signalizacijo rastlin ob ranitvi pa so ugotovili, da ranitev tobaka ob tretiranju s citokinini vpliva na nivo akumulacije JA in SA (Sano in sod., 1996), kar bi lahko posredno vplivalo tudi na gen *WIPK*. Analiza domen promotorja gena *StWIPK* je med drugim razkrila tudi domene, povezane z delitvijo celic, kar nakazuje na aktivnost citokininov: domeni za razvoj endosperma in meristema.

Različne študije navajajo vključenost genov *StWIPK* in *StMKPI* tudi v procese, kjer podatki v bazi eFP (Massa in sod., 2011) niso pokazali sprememb. Gen *AtMAPK3*, ortolog gena *WIPK* v vrsti *A. thaliana*, je vključen v odziv na sušo in signalizacijo z abscizinsko kislino ter razvoj listnih rež (Gudesblat in sod., 2007; Hamel in sod., 2006; Wang in sod., 2007), aktivira se tudi po tretiranju listov z vodikovim peroksidom ali ozonom (Ahlfors in sod., 2004; Kovtun in sod., 2000). V rižu se izražanje gena *OsMPK3* poveča, kadar je rastlina izpostavljena zmerno nizkim temperaturam (12 °C) (Xie in sod., 2012). V rastlini *A. thaliana* in pšenici je tudi gen *MKPI* negativni regulator odpornosti na sušo (Ulm in sod., 2002; Zaïdi in sod., 2010), kar pomeni, da je fosfataza *MKPI* negativni regulator ortologov gena *WIPK* v različnih stresnih pogojih in ne zgolj ob ranitvi.

Gen *MKPI* je na osnovi znanih rezultatov vključen tudi v prilagoditev rastline na povečano UV sevanje, saj se protein kopiči ob tretiranju rastlin z UV svetlobo (González Besteiro in Ulm, 2013; Ulm in sod., 2001).

5.1.3 Med okužbo s PVY se v krompirju sproži več kaskad MAPK

Rezultati izražanja MAPK in fosfataz po okužbi z virusom PVY so razkrili zelo dinamično MAPK signalizacijo (Slika 10). Opažamo, da imajo diferencialno izražene MKKK in MKK in MAPK tri različne vzorce izražanja. Največ genov (10 MKKK in 9 MAPK) je navzdol reguliranih v prvem in tretjem dnevu po okužbi v netransgenem krompirju sorte Rywal, v transgenem NahG-Rywalu z okvarjeno sintezo SA, pa so ti geni navzdol regulirani v prvem dnevu ter navzgor v šestem dnevu po okužbi (Baebler in sod., 2014). Rezultat celotne dinamike v Rywalu je preobčutljivostni odgovor.

Signalizacija MAPK kaskad je zelo kompleksna in tvori prepleteno omrežje. Vsako kinazo v kaskadi lahko fosforilira več različnih nadrednih kinaz, hkrati pa se tudi signal vzdolž kaskade lahko razširi na več potencialnih substratov (Lee in sod., 2008). Doslej so definirali zgolj manjše število MAPK modulov v rastlinskem imunskem odzivu, kompleksnost te signalizacije pa je razvidna tudi iz rezultatov mikromrež, ki nakazujejo, da se poleg glavnega imunskega odziva – preobčutljivostnega odgovora – v krompirju odvijajo še drugi spremljajoči procesi z drugačno časovno dinamiko in z izražanjem drugih MAPK.

5.1.3.1 Gena *StWIPK* in *StMKPI* v odzivu na PVY

Gen *StWIPK* je en dan po okužbi z virusom PVY navzdol reguliran v sorti Rywal, njegovo izražanje pa najbolj naraste v transgenem NahG-Rywalu, v zadnji časovni točki, 6 dpi. Vzorec izražanja gena *StMKPI* je podoben, vendar bistveno bolj izrazit. V Rywalu je reguliran močno navzdol, medtem ko velja za NahG-Rywal ravno nasprotno.

Tudi v procesih obrambe pred patogeni je gen *MKPI* negativni regulator kaskade MAPK (Bartels in sod., 2010; Ulm in sod., 2001; Vilela in sod., 2010; Zaïdi in sod., 2010). Utišanje gena *MKPI* vodi v povečano odpornost na patogene kot so *Bortyris cinerea* in *P. syringe* (Bartels in sod., 2009; Oka in sod., 2013), ob kombinaciji z ranitvijo pa vodi v povečano sintezo JA in etilena (Oka in sod., 2013). Vlogo gena *WIPK* v odzivu na napad patogenov so preučevali v tobaku, rastlini *A. thaliana*, paradižniku in rižu. V tobaku se prepisovanje gena *WIPK* poveča že v prvih treh urah po okužbi z mozaičnim virusom tobaka (TMV, angl. »Tobacco mosaic virus«) (Yamakawa in sod., 2004; Yap in sod., 2005), vrh doseže med šesto in deveto uro po indukciji HR-ja ter pade na bazalni nivo po dvanajstih urah (Yamakawa et al., 2004). Gen *WIPK* je tudi

vključen tudi v odpornost preko proteina N (Jin in sod., 2003; Zhang in Klessig, 1998a; b). Pri tretiranju z elicitorjem oomicete vrste *P. syringe* se aktivnost proteina WIPK močno poveča (Samuel in sod., 2005) ob okužbi tobaka z oomiceto vrste *P. cichorii*, ob utišanju gena *WIPK* se odpornost rastline močno zmanjša (Sharma in sod., 2003). Tretiranje vrste *N. benthamiana* z oomiceto vrste *P. infestans* vodi v povečano aktivnost proteina WIPK in interakcijo s transkripcijskim faktorjem WRKY8 (Ishihama in sod., 2011). V vrsti *A. thaliana*, ob okužbi z bakterijo *P. syringe*, protein HopA1 neposredno defosforilira AtMAPK3 (ortolog gena *WIPK*) (Zhang in sod., 2007), tretiranje rastline z elicitorjem te bakterije pa vodi v aktivacijo kaskade MAPK MEKK1-MKK4/5-MPK3/6-WRKY22/29 (Asai in sod., 2002). Okužba vrste *A. thaliana* z glivo *Botrytis cinerea* aktivira prepisovanje *AtMPK3* in sintezo kamaleksina (Xu in sod., 2008). V paradizniku se začne prepisovanje ortologa gena *WIPK* že trideset minut po tretiranju z elicitorjem Avr9 plesni *Cladosporium fulvum* (Romeis in sod., 1999), v rižu pa hitinski elicitor vodi v povečanje izražanja gena *OsMPK3* (Kishi-Kaboshi in sod., 2010).

V vse zgoraj našete obrambne odzive so vključeni tudi hormoni. Gen *WIPK* je vključen v sintezo SA in JA, vendar za sintezo slednjega sama aktivnost proteina WIPK ni zadostna (Heinrich in sod., 2011; Meldau in sod., 2012; Seo in sod., 1999; Seo in sod., 2007), JA pa nasprotno, prepisovanja gena *WIPK* ne poveča (Kumar in Klessig, 2000). Gen *WIPK* je tudi del signalizacije hormona etilena kot del kaskade AtMKK9-AtMAPK3/6. Aktivacija AtMKK9 vodi v aktivacijo AtMAPK3/6 in v regulacijo genov v sintezni poti etilena in kamaleksina. Etilen prav tako deaktivira gen *CTR1* iz skupine Raf MAPKKK, kar vodi v aktivacijo kaskade MKK9-MAPK3/6 (Xu in sod., 2008; Yoo in sod., 2008).

Kljub izjemni pomembnosti gena *WIPK* v rastlinskem imunskem sistemu, pa naše utišanje tega gena v divjem sorodniku *S. venturii* ni imelo vpliva na hitrost širjenja virusa PVY (Slika 32). V tobaku se je ob utišanju gena *NtWIPK* in ob okužbi s fluorescenčno označenim virusom TMV odpornost na virus zmanjšala, vendar pa so tudi ugotovili, da je v kaskadi NtMEK2-WIPK/SIPK gen *SIPK* tisti, ki inducira obrambni odgovor na TMV, *WIPK* pa le v manjši meri (Jin et al., 2003b). Iz literature je tako razvidno, da utišanje gena *WIPK* pospeši širjenje virusa, vendar naši rezultati mikromrež preobčutljivostnega odgovora na PVY nakazujejo na vlogo *WIPK*-a kot negativnega regulatorja HR-ja. Tako bi za naše eksperimente utišanja gena *StWIPK* v krompirju vrste *S. venturii* pričakovali, da se bo virus širil počasneje. Možne razloge za odstopanja dobljenih rezultatov od pričakovanih lahko iščemo v eksperimentalni rastlinski vrsti *S. venturii*. Slednja je divji sorodnik krompirja s popolnoma nepoznanim obrambnim mehanizmom, poleg tega pa bi druge časovne točke, v katerih smo preverjali fluorescenco širjenja virusa, morda pokazale drugačne rezultate. Seveda pa ne smemo izključiti možnosti, da utišanje gena *StWIPK* v vrsti *S. venturii* ni zadostna motnja imunskega sistema, da bi vplivala na širjenje virusa PVY oziroma je tako kot v

tobaku tudi v krompirju gen *StMAPK6* (ortolog gena *NtSIPK*) dominantnejši regulator odziva.

5.1.3.2 Gen *StMKK6* v odzivu na PVY

Rezultati izražanja MAPK v krompirju Rywalu po okužbi s PVY kažejo, da so v krompirjevo obrambo pred PVY vključene tri MAPK kinaze. Te MKK so *StMKK3*, *StMKK6* in *StMKK7/9* (Slika 10B). Najmočneje se na okužbo odzove *StMKK6*, te rezultate smo potrdili tudi s qPCR (Preglednica 4). *StMKK6* je imela v primerjavi s kontrolo močnejše izražanje (3 dpi), nasprotno pa je imela kinaza *StMKK3* v isti časovni točki nižje izražanje (Slika 10B).

Doslej je vključenost v preobčutljivostni odziv na patogena znana le za eno krompirjevo MKK; *StMKK1*, ortolog gena *AtMKK4/5*, ki konstitutivno aktiven pri okužbi z oomiceto *P. infestans* privede do odpornosti z akumulacijo aktivnih kisikovih radikalov in preobčutljivostnim odgovorom (Katou in sod., 2003, 2005b; Yamamizo in sod., 2006). V naših rezultatih je gen *StMKK4/5* (ali *StMEK1* v drugih študijah) zgolj rahlo navzgor reguliran v vseh časovnih točkah, vendar razlika nikjer ni niti dvakratna.

V splošnem je najbolj aktivna MKK v imunskem sistemu rastlin *MKK4/5* (Asai in sod., 2002), v manjši meri pa tudi *MKK9*. Gen *AtMKK9* je vključen v signalizacijo JA, SA in abscizinske kisline, v odziv na patogeno bakterijo *B. cinerea*, vključen je tudi v biosintezo etilena in kamaleksina (Yoo in sod., 2008; Zhou in sod., 2009). Funkcije krompirjevih MKK se od MKK vrste *A. thaliana* razlikujejo, predvsem so v vrsti *A. thaliana* bolje preučene. Razlik v funkciji posameznih genov družine MKK ne poznamo, poznamo le izražanje; znane razlike pa lahko pripišemo manjši količini razpoložljivih eksperimentalnih rezultatov krompirja v primerjavi z *A. thaliana* ali večji diverziteti krompirjevega genoma. Izključiti ne moremo niti tega, da imajo lahko ortologi v različnih vrstah različne funkcije.

Ugotovili smo, da je najmočneje regulirana MKK v preobčutljivostnem odzivu na PVY *StMKK6* (Slika 10B). Analiza ekspresijskih rezultatov gena *StMKK6* v tkivih krompirja po tretiranju s stresnimi dejavniki ter eksperimenti lokalizacije proteina *StMKK6* v listih kažejo, da je gen šibko izražen v netretiranih listih, medtem ko okužba s PVY povzroči povečanje izražanja *StMKK6* in koncentracijo proteina v jedru.

Kljub temu, da o ekspresiji krompirjeve *MKK6* ni veliko znanega, pa vemo vsaj nekaj o funkcijah njegovih ortologov pri drugih rastlinskih vrstah. Pri koruzi in pri vrsti *A. thaliana* je *MKK6* vključena v proces citokineze (Hardin in Wolniak, 1998, 2001; Takahashi in sod., 2010) ter v tvorbo stranskih korenin (Zeng in sod., 2011). Izražanje gena *MKK6* v koruzi (tudi *ZmMEK1*) inducirajo polietilen glikol, abscizinska kislina in

SA, v slanem okolju pa je gen negativno reguliran (Liu in sod., 2012). Riževa OsMEK1 (ali OsMKK6) je vključena v signalizacijo rastline pri nizkih temperaturah (Wen in sod., 2002; Xie in sod., 2012). V tobaku vrste *N. tabacum* je poleg gena *StMEK1*, ortologa *StMKK6*, tudi gen *NtMEK2* (ortolog genov *StMKK4/5*) potreben za odpornost na virus TMV preko rezistenčnega proteina N (Jin in sod., 2003; Liu in sod., 2007; Liu in sod., 2004). Z vidika odpornosti na patogene lahko sklepamo, da v vrsti *A. thaliana* ter koruzi in rižu gen *MKK6* ni tako pomemben kot v razhudnikovkah. Naši rezultati izražanja krompirjeve *MKK6* v različnih tkivih krompirja *S. tuberosum* Phureja kažejo, da je gen močno izražen v tkivih z intenzivno delitvijo celic, podobno kot je znano za ortologe iz vrste *A. thaliana*, tobaka in koruze (Hardin in Wolniak, 1998, 2001; Soyano in sod., 2003; Takahashi in sod., 2010).

Zaradi močne indukcije izražanja v okuženi netransgeni sorti Rywal in šibkega izražanja v transgenem NahG-Rywalu sklepamo, da je *StMKK6* pod vplivom signalizacije s SA. To trditev podpira tudi analiza domen promotorja *StMKK6* iz Rywala, kjer smo našli domene, povezane s SA (Slika 20). Doslej še nobena *MKK6* ni bila povezana s signalizacijo SA; v oljni ogrščici so bile pod vplivom SA inducirane *MKK1*, *MKK2*, *MKK4* in *MKK9*, le izražanje gena *MKK3* se zaradi SA ni spremenilo (Liang in sod., 2013). Za gen *AtMKK3* je znano, da v regulaciji JA aktivira kinazo *AtMAPK6* (Takahashi in sod., 2007a) in je vključena v obrambo pred patogeni (Dóczi in sod., 2007). Povečano izražanje gena *AtMKK3* vodi v povečano odpornost na slanost in na abscizinsko kislino (Hwa in Yang, 2008).

V objavljeni mreži interakcij rastline *A. thaliana* (Arabidopsis Interactome Mapping Consortium, 2011) ima *MKK6* štiri možne substrate MAPK: *MAPK4*, *MAPK6*, *MAPK12* in *MAPK13*. Te interakcije smo skušali potrditi tudi v krompirju z metodo BiFC, vendar smo bili neuspešni (Slika 29 in Preglednica 5). Sklepamo, da je bil razlog za neuspeh v sami metodi, saj je bila alternativna metoda testiranja interakcij »yeast two-hybrid« uspešna (Lazar in sod., 2014). Vzroki za neuspešnost metode BiFC so lahko sledeči: v celici je bila koncentracija testiranih parov proteinov prenizka in zato ni prišlo do interakcij; proteini se lahko zaradi fuzije s fluorescenčnim markerjem napačno zvijejo; protein *MKK6* je lahko neaktiven in posledično ne interagira z MAPK; do interakcij je prišlo, vendar sta se polovici fluorescenčnega proteina napačno zvili ali se nista sestavili; do interakcije je prišlo, vendar je bila zelo kratkotrajna oziroma se je zgodila v času izven našega opazovanja; do interakcije je prišlo, vendar je bila zelo šibka (majhna količina proteinov v celici, ki interagirajo) in je jakost avtofluorescence opazovane celice preseгла jakost fluorescence interakcije.

Z alternativno metodo »yeast two-hybrid« smo potrdili tri substrate *MKK6* tudi v krompirju (Preglednica 5): *StMAPK4_1* (ortolog genov *AtMAPK4*, *-11* in *-12*), *StMAPK6* (ortolog gena *AtMAPK6* in *SIPK* iz tobaka) in *StMAPK13* (ortolog gena

AtMAPK13 in *NTF6/NRK1* iz tobaka). Te interakcije so v rastlini *A. thaliana* odkrili že večkrat (Arabidopsis Interactome Mapping Consortium, 2011; Lin in sod., 2010; Melikant in sod., 2004). V rižu so substrati ortologa MKK6 (poimenovan OsMEK1 ali OsMKK6) OsMAPK1, -3, -5 in -6 (ortologi genov *AtMAPK6*, -3 in *11/4*) (Singh in Jwa, 2013; Xie in sod., 2012). Pri razhudnikovkah je znan le en substrat proteina MKK6, in sicer v tobaku, protein NTF/NRK1 (ortolog gena *AtMAPK13*) (Soyano in sod., 2003). Glede na že objavljene interakcije proteina MKK6 s substrati MAPK lahko trdimo, da je MAPK modul, v katerem je aktivna MKK6, evolucijsko stabilen in da se njegove komponente ne spreminjajo. Kljub temu pa obstajajo izjeme, tudi v krompirju: tukaj je substrat proteina MKK6 samo eden od dveh preverjenih proteinov MAPK4_1 in MAPK4_2 (Lazar in sod., 2014) (skupaj sta ortologa skupine genov *AtMAPK4/11/12*), medtem ko ima v rastlini *A. thaliana* *AtMKK6* tri substrate, riž pa dva.

Izmed treh proteinov, domnevnih substratov StMKK6, na osnovi rezultatov mikromrež (Slika 10B) nobeden ni diferencialno izražen v preobčutljivostnem odzivu na PVY. V transgenem krompirju NahG-Rywalu pa je gen *StMAPK4_2* navzgor reguliran v 3 in 6 dpi (Slika 30), podobno kot *MKK6* (Slika 10B). Možno je, da takšen vzorec izražanja genov v rastlinah NahG-Rywal sprožijo zakasneni obrambni mehanizmi v rastlinah z okvarjeno sintezno potjo SA.

V splošnem je količina prepisane RNA vseh treh substratov StMKK6 (*StMAPK4_2*, *StMAPK6* in *StMAPK13*) višja (Slika 30) kot količina RNA gena *StMKK6*. Ti rezultati nakazujejo na to, da poteka regulacija genov *StMAPK4_2*, *StMAPK6* in *StMAPK13* na nivoju proteinov, s fosforilacijo ali translokacijo.

5.1.4 Geni *StMKK6*, *StWIPK* in *StMKP1* so vključeni v preobčutljivostni odgovor na različne patogene

Celoten nabor preučevanih MAPK in fosfataz izvira iz rezultatov mikromrež odziva krompirja sorte Rywal in transgenega NahG-Rywala na okužbo z virusom PVY (Baebler in sod., 2014). Rywal se na okužbo odzove s preobčutljivostnim odgovorom (HR), kar vodi v programirano celično smrt, ki je na listih vidna v obliki nekrotičnih lezij, ter omejitev virusa v leziji. Transgeni NahG-Rywal pa tega odziva nima, saj ima okvarjeno sintezno pot SA, ključnega hormona za vzpostavitev HR-ja. Glede na mehanizem odgovora sorte Rywal lahko sklepamo, da so vse MAPK, diferencialno regulirane v Rywalu po okužbi s PVY (Slika 10C), del tega odziva, glede na pestrost vzorcev izražanja v krompirju pa dobimo občutek o kompleksnosti tega odziva.

Pojav preobčutljivostnega odziva v rastlinah so že obsežno preučevali, tako v odgovoru na bakterije, glive, oomicete kot v odgovoru na viruse. Gena *WIPK* in *MKP* veljata za

pomembna faktorja pri eksperimentih utišanja in povečanja izražanja ter izražanja nadaljnje pojava HR, programirane celične smrti in pri regulaciji SA. V tobaku *N. tabacum* se ob okužbi s TMV sproži HR, kar vodi do indukcije mRNA gena *WIPK* že po treh urah, vrh doseže po šestih do devetih urah, nato pa se po dvanajstih urah spusti nazaj na bazalni nivo. Podobno dinamiko izražanja tekom HR-ja ima tudi gen *NtMKP1*, vendar je plato izražanja tega gena daljši, traja šestintrideset ur, celo dlje kot gen *PR1-a*, katerega višek izražanja je bil opažen dvanajst ur po indukciji HR-ja (Yamakawa in sod., 2004). Sintetizirata se tudi sekundarni metabolit fitoaleksin in hormon SA (Jin in sod., 2003; Mase in sod., 2012; Yang in sod., 2001). V vrsti *N. benthamiana* gen *WIPK* v kombinaciji z genom *SIPK*, pospeši HR po okužbi rastline s kombinacijo virusov PVX in PVY (García-Marcos in sod., 2009). Pri paradižniku je znana že celotna HR kaskada v odzivu na okužbo z bakterijama rodu *Pseudomonas* in *Xanthomonas*: SIMAPKKK ϵ /SIMAPKKK α -MEK2 (ortolog MKK4/5)-SIPK/WIPK, vendar transkripcijo gena *WIPK* inducira gen *SIPK*, oba pa nato skupaj prispevata k celični smrti (Liu in sod., 2007; Melech-Bonfil in Sessa, 2010).

Oba gena, *WIPK* in *MKP1* sta tudi regulatorja SA. *MKP1* je preko defosforilacije proteina *WIPK* negativni regulator sinteze SA in kamaleksina (Bartels in sod., 2009), povečano izražanje gena *WIPK* pa vodi v sintezo SA in njene neaktivne oblike SAG (Seo in sod., 1995). SA ne vpliva na *WIPK* preko povratne zanke; dokazano je, da tretiranje rastlin s SA ne aktivira gena *WIPK* (Kumar in Klessig, 2000), poleg tega pa je tudi obramba pred TMV in aktivacija *WIPK* neodvisna od SA (Zhang in Klessig, 1998a; b). Iz tega lahko sklepamo, da je kinazna kaskada, ki vključuje *WIPK*, ena prvih, ki se aktivirajo že v nekaj urah po okužbi in hkrati tista, ki sproži sintezo SA. Trajanje in jakost te kaskade regulira *MKP1* in posledično tudi nivo akumulirane SA.

Vendar pa naši eksperimentalni rezultati mikromrež preobčutljivostnega odziva krompirja na okužbo s PVY kažejo drugačno regulacijo genov *StWIPK* in *StMKP1*. Oba gena sta močno navzdol regulirana že 1 dpi; *WIPK* v Rywalu samo v tej časovni točki, *MKP1* pa preide iz močne negativne regulacije (1 dpi) v pozitivno (6 dpi) (Slika 10C in D). Iz teh vzorcev izražanja lahko sklepamo, da sta lahko *StWIPK* in *StMKP1* negativna regulatorja HR-ja; fosfataza pa v zadnji časovni točki (6 dpi) pri krompirju Rywal kot negativni regulator HR kaskade skuša umiriti sistemski HR. Zaradi redundantnosti signalnih poti morda v krompirju gen *WIPK* nima tako izrazite funkcije v imunskem odzivu in ga včasih lahko nadomešča katera izmed drugih MAPK, kot je recimo *StMAPK4_1*, ki pa ima v HR-ju v primerjavi s kontrolo višje izražanje. V tobaku je močan pozitivni regulator HR-ja tudi *NtSIPK*, ortolog gena *StMAPK6*, ki pa v krompirjevem HR-ju sploh nima diferencialnega izražanja. V NahG-Rywalu brez SA, sta v zadnjih dveh časovnih točkah *WIPK* in *MKP1* navzgor regulirana, izražanje gena *MKP1* je do desetkrat višje od slepo inokulirane kontrole. NahG-Rywal se preko SA ne more braniti pred okužbo, vendar obstajajo drugi, a kasnejši mehanizmi obrambe, kot je

signalizacija z JA ali etilenom. Oba hormona v drugih rastlinskih vrstah ne aktivirata gena *WIPK* (Kumar in Klessig, 2000), vendar je lahko vključenost gena *WIPK* v ta kasnejši imunski odgovor posredna.

Izmed genov družine MKK je bil v preobčutljivostnem odzivu najmočneje reguliran gen *StMKK6*, šibkeje pa tudi preostale MKK (Slika 10B). Družino MKK so analizirali pri paradizniku v odzivu na odpornost proti patogenu vrste *P. syringe*; utišanje genov *MEK1* (ortolog gena *MKK6*) ali *MEK2* (ortolog gena *MKK4/5*) zavre učinkovito obrambo pred bakterijo, povečano izražanje *LeMKK2* (ortolog *AtMKK4/5*) in *LeMKK4* (ortolog *AtMKK7/8/9*) pa vodi v programirano celično smrt (Ekengren in sod., 2003; Pedley in Martin, 2004). Povečano izražanje genov *LeMKK1* (ortolog *AtMKK1/2*) in *LeMKK3* (ortolog *MKK6*) programirane celične smrti ni povzročilo (Pedley in Martin, 2004). Za rastlino *A. thaliana* so dokazali, da sta v preobčutljivostni odgovor na okužbo vključena dva MAPK modula: *MKK4/5* in *MKK1/2* (Gao in sod., 2008; Meng in sod., 2013). V vrsti *N. benthamiana* je potencialni sprožilec preobčutljivostnega odziva na okužbo z oomiceto *P. infestans*, gen *MKK1* (ortolog gena *AtMKK7/8/9*) (Asai in sod., 2008; Takahashi in sod., 2007b; Takahashi in sod., 2007c), isti geni se v tovrstni okužbi sprožijo tudi pri vrsti *A. thaliana* (Popescu in sod., 2009). Poleg tega je pri *A. thaliana* v signalizacijo HR vključen tudi gen *AtMKK5* (Liu in sod., 2008). Tudi *StMKK4/5* je po okužbi s PVY navzgor reguliran, vendar v manjši meri, pri vrsti *N. tabacum* pa sta tako *NtMEK2* (ortolog *StMKK4/5*) kot *NtMEK1* (ortolog *MKK6*) potrebna za obrambo proti mozaičnemu virusu tobaka (Jin in sod., 2003; Liu in sod., 2007; Liu in sod., 2004).

Medsebojna povezanost kinaz *NbMEK1* (ortolog gena *AtMKK6*) in *NbMEK2* (ortolog *AtMKK4/5*) je raziskala del Pozo s sod. (del Pozo in sod., 2004). Pokazali so, da kombinacija utišanja gena *NbMEK1* in povečanega izražanja gena *NbMEK2* prepreči programirano celično smrt tekom HR-ja. V vrsti *N. attenuata* sta gena *MEK1* (ortolog *AtMKK6*) in *SIPKK* (ortolog *AtMKK1/2*) vključena v regulacijo kopičenja 12-oxo-fitodienoicne kisline in JA (Heinrich in sod., 2011).

Glede na vzorce izražanja in znano literaturo predpostavljamo, da gen *StMKK6* z genoma *StWIPK* in *StMKP1* ni del iste signalne MAPK kaskade, vsi trije pa so aktivni v preobčutljivostnem odgovoru na PVY.

5.1.5 V celicah rastlin, okuženih s PVY, se protein *StMKK6* nakopiči v jedru

Translokacija proteinov med citoplazmo in jedrom rastlinske celice je v procesu obrambe rastline pred patogeni ključnega pomena. V jedro potujejo efektorski proteini mnogih patogenov, poleg tega pa tudi ključni proteini, potrebni za uspešno obrambo – proteini R, MAPK, transkripcijski faktorji in drugi proteini. Tudi učinkovitost tega transporta med drugim določa rezultat obrambe gostitelja pred patogeni (Deslandes in

Rivas, 2011). Eno izmed naših vprašanj tekom raziskovanja vključenosti MAPK v odziv na okužbo s PVY je bilo tudi, ali okužba z virusom vpliva na lokalizacijo proteina. To smo preučili pri vseh treh proteinih ob kontroli transkripcije pod močnim promotorjem 35S: StMKK6, StWIPK, in StMKP1, pri proteinu StMKK6 pa tudi ob kontroli izražanja pod nativnim promotorjem.

Lokalizacijo vseh treh proteinov smo sprva preverili pod kontrolo močnega virusnega promotorja CaMV 35S in s fuzijo z dvema fluorescenčnima proteinoma CFP in YFP. Vsi trije proteini, StMKK6, StWIPK in StMKP1 so se tako v slepo inokuliranih kot v okuženih listih rastline *N. benthamiana* nahajali v citoplazmi in v jedru (Slike 22-23 in Slike 25-27). Edini protein, za katerega smo preverili tudi lokalizacijo pod nativnim promotorjem, StMKK6, pa se je v okuženih listih nakopičil v jedru (Slika 24).

Do današnjega dne obstaja že kar nekaj rezultatov o lokalizaciji proteina WIPK tekom odziva rastline na različne strese, medtem ko so rezultati lokalizacije za MKP1 in MKK6 bistveno bolj skopi. Tobakova WIPK se v epidermalnih celicah čebule nakopiči v jedru, enako velja za transkripcijski faktor NtWIF, substrat proteina WIPK (Yap in sod., 2005). V epidermalnih celicah rastline *N. benthamiana* pa se WIPK nahaja v citoplazmi in v jedru. Tako v primeru epidermalnih celic čebule kot v primeru vrste *N. benthamiana* so protein opazovali v intaktnih celicah, ki niso bile izpostavljene dodatnim stresom. V stresnih pogojih pa se v rastlini *A. thaliana*, po tretiranju rastline z ozonom, AtMPK3 premakne v jedro (Ahlfors in sod., 2004), tudi v prosu se po okužbi z oomiceto vrste *Sclerospora graminicola* nakopiči v jedru (Melvin in sod., 2014), prav tako v peteršilju po okužbi z oomiceto vrste *Phytophthora sojae* (Ligterink in sod., 1997).

Pšenični protein MKP1 se v prehodno transformiranih epidermalnih celicah tobaka nahaja v jedru (Zaïdi in sod., 2010), AtMKP1 vrste *A. thaliana* pa v citoplazmi v prehodno transformiranih protoplastih; AtMKP1 ostane v citoplazmi tudi ob interakciji s substratom AtMAPK6 (Bartels in sod., 2009).

Protein WIPK se ob soočenju rastline s stresom nakopiči v jedru, v intaktnih rastlinah pa je v citoplazmi in v jedru. MKP1, negativni regulator proteina WIPK, pa se, zanimivo, v dveh različnih intaktnih rastlinah obnaša različno. Ob interpretaciji rezultatov študija lokalizacije proteinov je treba upoštevati tudi širše okoliščine eksperimenta. Pomembni dejavniki so tip promotorja, pod katerim se je izražal protein in posledično količina proteina v celici; lokalizacija nefosforilirane, neaktivne MAPK, ki je lahko od fosforilirane drugačna; lokalizacija proteina je pogojena tudi z razpoložljivostjo njegovega substrata, saj lahko celoten kompleks MAPK - substrat v celici zaseda druge predelke kot neaktivna kinaza. Pomembno je tudi, pri kateri vrsti je eksperiment opravljen – pri sami eksperimentalni rastlini, pri celicah čebule ali pri

protoplastih. Najbolj realno sliko lokalizacije proteina pod določenimi pogoji nam dajo eksperimenti lokalizacije pod nativnim promotorjem primerne dolžine ter v dejanski preučevani rastlini oziroma bližnjem sorodniku; v našem primeru bi to bil krompir sorte Rywal, ki smo ga za te eksperimente nadomestili z rastlino *N. benthamiana*, saj je za tovrstne študije bolj enostavna.

Protein StMKK6 se ob izražanju pod nativnim promotorjem po okužbi z virusom PVY nakopiči v jedru (Slika 24). Sklepamo, da je celotna MAPK kaskada, katere del je MKK6, razpeta med citoplazmo in jedrom. V jedru pa MKK6 fosforilira svoj substrat, specifično MAPK. Doslej je objavljen le en eksperimentalni rezultat o lokalizaciji ortologa MKK6 in sicer lokalizacija AtMKK6 med delitvijo epidermalnih celic korenine. Protein se nahaja v ekvatorialni ravnini fragmoplasta in je edini od ostalih preverjenih MKK (MKK1-5) s takšno lokalizacijo (Takahashi in sod., 2010). Za vrsto *N. benthamiana* je znano, da se NbMKK1 (ortolog AtMKK7/8/9), vključena v preobčutljivostni odziv na okužbo z oomiceto *P. infestans*, nakopiči v jedru, vendar stres na lokalizacijo tega proteina ne vpliva (Takahashi in sod., 2007b). V epidermalnih celicah oljne ogrščice se MKK2, -3 in -4 nahajajo v citoplazmi in v jedru (Liang in sod., 2013). Po drugi strani pa rezultati lokalizacije MAPK, ki jih te MKK aktivirajo, kažejo na lokalizacijo teh proteinov v citoplazmi (Liang in sod., 2013; Takahashi in sod., 2007b).

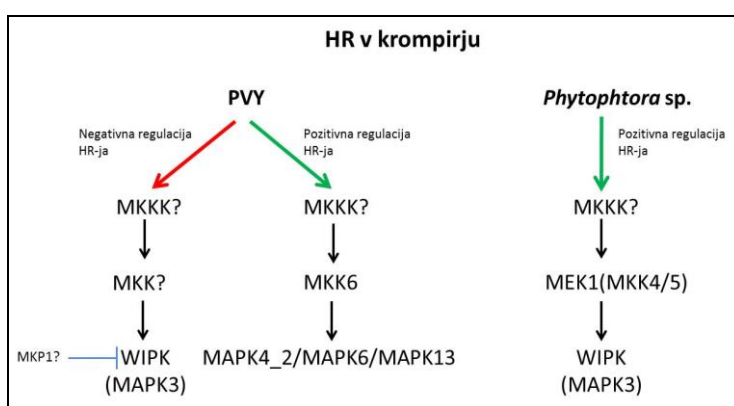
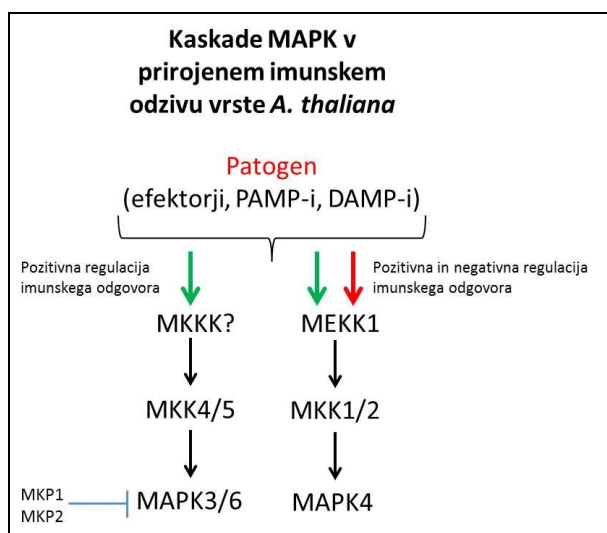
5.2 SKLEPI

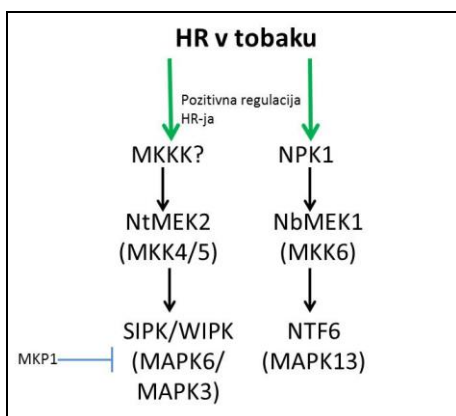
Namen doktorskega dela je bil preučiti vlogo in delovanje izbranih genov, vključenih v signalizacijsko pot proteinskih kinaz (MAPK) krompirja ob okužbi s PVY. S tem namenom smo analizirali izražanje družine MAPK v krompirju sorte Rywal s preobčutljivostnim odgovorom na okužbo s PVY ter v transgenemu NahG-Rywalu. S prehodno transformiranimi rastlinami smo preučevali vpliv virusa na lokalizacijo proteinov StMKK6, StMKP1 in StWIPK ter vpliv utišanja genov na širjenje virusa. Z metodo BiFC smo iskali substrate proteina StMKK6.

- Signalizacija MAPK v preobčutljivostnem odzivu sorte Rywal na PVY je zelo dinamična, kar se kaže v različnih vzorcih izražanja posameznih skupin genov. Največ genov je navzdol reguliranih v prvih dveh časovnih točkah pri sorti Rywal, medtem ko se izražanje istih genov v transgenemu NahG-Rywalu poveča v časovni točki 6 dpi. Na osnovi teh vzorcev lahko vidimo aktivnost MAPK tako v prvih fazah odziva na okužbo kot tudi v kasnejših poskusih obrambe pred virusom, predvsem v NahG transgenemu krompirju brez SA.
- Iz filogenetskih dreves je razvidno, da je v krompirju manj predstavnikov MAPK kot v modelni rastlini *A. thaliana*, kar je lahko posledica podvojitve genov v predniku *A. thaliana* po cepitvi razhudnikovk in križnic v dve ločeni družini. Ker funkcionalnost vseh MAPK vrste *A. thaliana* še ni raziskana, ni nujno, da krompirju določeni geni manjkajo, le tisti prisotni so prevzeli več funkcij.
- Preučevani gen *StMKK6* pripada drugi kaskadi MAPK kot gen *StWIPK*. Na osnovi znane literature je gen *MKP1* negativni regulator kaskade z genom *WIPK*, ki pa je pozitiven regulator SA in posledično tudi pozitiven regulator obrambe pred patogeni. V rezultatih mikromrež krompirjeve obrambe pred okužbo s PVY pa imata oba gena, *StMKP1* in *StWIPK*, v primerjavi z neokuženo kontrolo nižje izražanje, zato domnevamo, da sta gena v krompirju negativna regulatorja preobčutljivostnega odziva na PVY.
- Utišanje gena *StWIPK* pri vrsti *S. venturii* ni vplivalo na hitrost širjenja virusa PVY^N-GFP, kar je lahko posledica prešibkega utišanja, vrste gostitelja ali neprimernih preučevanih časovnih točk. Prav tako je mogoče, da utišanje gena *StWIPK* pri vrsti *S. venturii* ni zadostna motnja imunskega sistema za vidne razlike v hitrosti širjenja virusa.
- Okužba z virusom PVY na lokalizacijo proteinov *StWIPK*, *StMKK6* in *StMKP1* ne vpliva, kadar je prepisovanje genov pod kontrolo močnega virusnega

promotorja CaMV 35S, ki lahko vodi v zasičenost celice s proteinom. Nasprotno pa smo opazili velike spremembe v lokalizaciji proteina StMKK6, kadar je bilo njegovo izražanje pod kontrolo nativnega promotorja. Nanj je virus PVY vplival tako, da se je protein nakopičil v jedru, kjer domnevno fosforilira MAPK substrate.

- Preobčutljivostni odgovor rastlin na okužbo ima z vidika signalizacije MAPK omejen spekter sproženih kaskad, saj se ortologi določenih genov v kaskadah pojavljajo pri večjem številu vrst. Kljub temu tovrsten odziv v okuženi rastlini spremljajo še drugi fiziološki procesi, ki skupaj s signalizacijo MAPK določajo končni izid obrambe.





Slika 33: Shema sproženih kaskad MAPK v prirojenem imunskem odzivu rastlin (zgoraj) ter preobčutljivostnem odgovoru krompirja (v sredini) ter tobaka (spodaj)

V splošnem se med prirojenim imunskim odzivom rastline na patogene sprožita dve MAPK kaskadi: kaskada z MKK4/5 in kaskada z MKK1/2 (zgornja slika). Iz naših rezultatov preobčutljivostnega odgovora krompirja na okužbo s PVY (srednja slika levo) pa je razvidno, da je kaskada, katere del je gen *StWIPK* (*MAPK3*), negativni regulator HR-ja, kaskada z genom *StMKK6* pa pozitivni regulator HR-ja. Po okužbi z oomiceto rodu *Phytophthora* sp. (srednja slika desno) pa je kaskada z genom *StWIPK* (*MAPK3*) in *StMEK1*(*MKK4/5*) pozitivni regulator celične smrti. V nasprotju s krompirjem je v tobaku po okužbi z različnimi patogeni, vključno z virusi, gen *WIPK* (*MAPK3*) pozitivni regulator HR-ja, preko aktivacije s kinazo kinazo *NtMEK2* (*MKK4/5*) (spodnja slika). V vrsti *N. benthamiana* je del HR odziva na bakterije tudi kaskada z genom *NbMEK1*, ortologom krompirjeve kinaze kinaze *StMKK6* (spodnja slika). Kljub temu, da sta krompir in tobak bližnja sorodnika, pa se dinamika kaskad MAPK tekom njenega preobčutljivostnega odgovora na patogene razlikuje.

Figure 33: MAPK cascades in the innate immunity (upper picture) HR of potato (middle picture) and tobacco (lower picture)

In the innate immunity two MAPK cascades are triggered: the MKK4/5 and the MKK1/2 cascades (upper picture). Our results of the potato HR response in defense against PVY (middle picture left) show that the *StWIPK* (*MAPK3*) cascade negatively regulates, while *StMKK6* positively regulates the HR response. But in the HR response against *Phytophthora* sp. the *StWIPK* (*MAPK3*) acts as the positive regulator of the HR response (middle picture right). In contrast to potato, the tobacco *WIPK* (*MAPK3*) acts as the positive regulator of the HR through *NtMEK2* (*MKK4/5*) (lower picture), against different pathogens, including the viruses. In *N. benthamiana* the HR against bacteria is positively regulated also by *NbMEK1*, the orthologue of potato *StMKK6* (lower picture). To conclude, although potato and tobacco are close relatives, their MAPK dynamics during the HR response differs at some points.

6 POVZETEK (SUMMARY)

6.1 POVZETEK

Krompir je ena najpomembnejših poljščin, vendar ga ogroža po celem svetu razširjen krompirjev virus Y (PVY). V občutljivih sortah povzroča PVY na listih kloroze in nekrotične lise ter obročkasto nekrozo gomoljev. Rastline se lahko na okužbo s patogenom odzovejo s šibkejšo bazalno imunostjo ali z učinkovitejšo, t.i. z efektorji sproženo imunostjo. Pomemben del signalizacije v imunskem odzivu rastline je aktivacija MAPK, ki se sproži že v najbolj začetnih korakih vzpostavitve učinkovite obrambe. Aktivacija MAPK poteka preko zaporedne fosforilacije, v obliki kaskade, kjer si zaporedoma sledijo MKKK, MKK in MAPK. MAPK kaskade negativno regulirajo fosfataze MAPK (MKP).

Nekatere sorte krompirja so na okužbo s PVY odporne in lahko razvijejo t.i. preobčutljivostni odgovor (HR). Tovrstni način obrambe se kaže kot lokalna celična smrt z vidnimi nekrozami na mestu vdora mikroorganizma, na molekularnem nivoju pa kot porast aktivnih kisikovih radikalov, sinteza SA in omejitev širjenja virusa.

Ker v krompirju dinamika preobčutljivostnega odgovora z vidika MAPK še ni bila preučena, smo analizirali MAPK po okužbi s PVY v krompirju sorte Rywal, s preobčutljivostnim odgovorom na okužbo in v transgenem NahG-Rywalu, z nepopolno sintezno potjo SA. Našli smo štirinajst diferencialno izraženih MKKK, tri MKK, enajst MAPK in eno MKP. Vzorci izražanja teh genov tekom treh časovnih točk (1, 3 in 6 dpi) kažejo na zelo dinamično regulacijo MAPK signalizacije v krompirju tekom HR-ja ter na vključenost več kinaznih kaskad v odgovor na PVY. V splošnem pa je največ genov, v primerjavi s slepo inokulirano kontrolo, navzdol reguliranih v prvih dveh časovnih točkah pri sorti Rywal, medtem ko se izražanje istih genov v transgenem NahG-Rywalu poveča v časovni točki 6 dpi. Filogenetska analiza dela družine MAPK in družine MKK je nakazala na manjšo zastopanost genov v krompirju v primerjavi z modelno rastlino *A. thaliana*, kar je lahko posledica podvojitve genov v predniku *A. thaliana* po cepitvi razhudnikovk in križnic v dve ločeni družini.

V nadaljnjih študijah vloge MAPK pri HR odzivu krompirja na PVY smo se osredotočili na tri gene: *StMKK6*, *StWIPK* in *StMKP1*. Vsi trije geni so regulirani v odzivu na ranitev, *StMKK6* pa dodatno še na tretiranje z glivnim elicitorjem, *StWIPK* na tretiranje s citokinini ter *StMKP1* na tretiranje s SA. V odzivu na okužbo s PVY ima gen *StWIPK* v primerjavi s kontrolo nižje izražanje v 1dpi v netransgenem Rywalu in transgenem NahG-Rywalu višje izražanje v točki 6dpi. Gen *StMKK6* ima v primerjavi s kontrolo višje izražanje v Rywalu, v 1 in 3 dpi, šibkeje je navzgor reguliran tudi v NahG-Rywalu. Najmočneje je diferencialno izražen gen *StMKP1*, sicer s podobnim

vzorcem izražanja kot gen *StWIPK*, vendar bistveno močnejše. Na osnovi znane literature je gen *MKPI* negativni regulator gena *WIPK* oziroma celotne kaskade s tem genom. Na osnovi literature in dinamike izražanja lahko sklepamo tudi, da gen *StMKK6* ni del kaskade, v kateri je aktiven gen *StWIPK*, na osnovi znane literature ortologov tobaka pa je aktivnost obeh kaskad soodvisna.

Gen *WIPK* je v tobaku del HR kaskade v odzivu na različne patogene in pozitivni regulator sinteze SA, vendar pa se rezultati mikromrež krompirja ne skladajo s tem, saj se gen *StWIPK* v odzivu na PVY kaže kot negativni regulator HR-ja. Na osnovi teh rezultatov bi pričakovali hitrejše širjenje virusa v utišanih rastlinah, vendar v primerjavi s kontrolami razlik nismo opazili. Možni razlogi so v nezadostnem utišanju in nepoznanih obrambnih mehanizmih eksperimentalne vrste *S. venturii*, kjer utišanje gena *StWIPK* morda ni zadostna motnja imunskega sistema za vidne razlike v hitrosti širjenja virusa.

Z eksperimentom vpliva virusa PVY na lokalizacijo preučevanih treh proteinov smo ugotovili, da je treba lokalizacijo proteinov spremljati pod kontrolo izražanja z nativnim promotorjem in ne pod kontrolo promotorja CaMV 35S. Le tako se izognemo zasičenosti celice s proteinom in lažnim rezultatom lokalizacije. Lokalizacijo proteina pod kontrolo nativnega promotorja smo preverili pri proteinu *StMKK6* in ugotovili, da okužba z virusom PVY močno poveča izražanje gena, protein pa se nakopiči v jedru, kjer prenese signal naprej.

Naša študija vključenosti MAPK v preobčutljivostni odgovor krompirja na PVY kaže na močno dinamiko signalizacije, osnovni mehanizmi in kaskade pa so med različnimi rastlinskimi vrstami relativno stabilni.

6.2 SUMMARY

Potato is one of the most important crops world-wide, but is threatened by a pathogen Potato virus Y (PVY). In the susceptible cultivars, the PVY causes necrotic lesions, leaf chlorosis and necrotic ringspots in tubers. Plants can defend themselves with a weaker, basal immune response, or with the more effective, the effector-triggered immune response. The crucial element of the plant pathogen response is also the activation of MAP kinases (MAPK), a group of protein kinases, active already in the earliest steps of plant response. The activation of MAPKs is consecutive through phosphorylation of three kinases, MKKK, MKK and MAPK in a form of a cascade. The negative regulators of the cascade are MAP kinases phosphatases (MKPs).

Some potato cultivars (cv.) respond to the PVY infection with the hypersensitive resistance (HR), which manifests itself by programmed cell death in the point of the viral entry and by synthesis of reactive oxygen species, salicylic acid (SA) and limitation of the viral spread.

The involvement of MAPKs in the dynamics of potato HR to PVY has not been studied so far. Therefore, we analysed the expression of MAPKs in PVY-infected potato cv. Rywal, with HR to PVY, and SA-deficient transgenic NahG-Rywal, susceptible to PVY. We found 14 differentially expressed MKKKs, 3 MKKs, 11 MAPKs and one MKP. The different expression patterns in the three observed time points (1, 3 and 6 dpi) show a dynamic MAPK signalling during the HR and also show that in the potato HR several MAPK cascades are involved. In general, the majority of the genes are down-regulated in 1 and 3 dpi in cv. Rywal, while the same genes are up-regulated in transgenic NahG-Rywal, 6 dpi. Phylogenetic analysis of the MAPK and MKK families in potato revealed weaker representation in potato, comparing to the model plant *A. thaliana*. Higher numbers of MKK family members in *A. thaliana*, compared to potato, might be the result of gene duplications in the MKK ancestors that occurred after the divergence into different families.

Further on, we focused on three genes, regulated in the HR-response to PVY: *StMKK6*, *StWIPK* and *StMKP1*. All three genes are regulated in response to wounding and additionally *StMKK6* also to the treatment with a fungal elicitor, *StWIPK* to the treatment with cytokinins and *StMKP1* to SA. In response to PVY, *StWIPK* is down-regulated in 1 dpi in non-transgenic Rywal and up-regulated in transgenic NahG-Rywal, 6 dpi. *StMKK6* is up-regulated in Rywal, 1 and 3 dpi, and less strongly also in NahG-Rywal. The most differentially regulated gene is *StMKP1*, with similar pattern than *StWIPK*, but substantially stronger. It is known, that *StMKP1* is a negative regulator of the *StWIPK* cascade. Based on the literature and the dynamics of the gene

expression, we can conclude that StMKK6 is not part of the same cascade as StWIPK, but the cascades are still inter-dependent.

Since also in tobacco, WIPK is part of the HR MAPK cascade and a positive regulator of SA, but the microarray results of potato HR response to PVY indicates that in potato StWIPK could be the negative regulator of HR. Based on these results we would expect faster viral spread, compared to the controls in StWIPK-silenced plants, but we did not observe any differences. The probable cause for these results could be the insufficient silencing of the gene or some specific defence mechanisms of the experimental plants, *S. venturii*, where silencing of StWIPK is not a sufficient perturbation of the immune system that would cause changes in viral spread.

Localisation experiments revealed that the localisation is best studied under the control of gene's native promoter, instead of the strong, CaMV 35S. In that way we can avoid the saturation of the protein in the cell and false localisation results. The effect of PVY infection on localisation of a protein, under native promoter, was studied only for StMKK6, which resulted in strong gene expression and accumulation of the protein in the nucleus.

Our research of involvement of MAPKs in HR to PVY implies a strong dynamics of MAPK signalling with relatively stable mechanisms and cascades among different plant species.

7 VIRI

- Ahlfors R., Macioszek V., Rudd J., Brosché M., Schlichting R., Scheel D., Kangasjärvi J. 2004. Stress hormone-independent activation and nuclear translocation of mitogen-activated protein kinases in *Arabidopsis thaliana* during ozone exposure. *The Plant Journal*, 40, 4: 512–522
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E. W., Lipman D. J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215, 3: 403–410
- Andreasson E., Ellis B. 2010. Convergence and specificity in the *Arabidopsis* MAPK nexus. *Trends in Plant Science*, 15, 2: 106–113
- Andreasson E., Jenkins T., Brodersen P., Thorgrimsen S., Petersen N.H.T., Zhu S., Qiu J. L., Micheelsen P., Rocher A., Petersen M., Newman M.A., Bjørn Nielsen H., Hirt H., Somssich I., Mattsson O., Mundy J. 2005. The MAP kinase substrate MKS1 is a regulator of plant defense responses. *The EMBO Journal*, 24, 14: 2579–2589
- Arabidopsis Interactome Mapping Consortium 2011. Evidence for network evolution in an *Arabidopsis* interactome map. *Science*, 333, 6042: 601–607
- Asai S., Ohta K., Yoshioka H. 2008. MAPK signaling regulates nitric oxide and NADPH oxidase-dependent oxidative bursts in *Nicotiana benthamiana*. *The Plant Cell*, 20, 5: 1390–1406
- Asai T., Tena G., Plotnikova J., Willmann M.R., Chiu W.L., Gomez-Gomez L., Boller T., Ausubel F.M., Sheen J. 2002. MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature*, 415, 6875: 977–983
- Baebler Š., Krečič-Stres H., Rotter A., Kogovšek P., Cankar K., Kok E. J., Gruden K., Kovač M., Žel J., Pompe-Novak M., Ravnikar M. 2009. PVY NTN elicits a diverse gene expression response in different potato genotypes in the first 12 h after inoculation. *Molecular Plant Pathology*, 10, 2: 263–275
- Baebler Š., Witek K., Petek M., Stare K., Tušek-Žnidarič M., Pompe-Novak M., Renaut J., Szajko K., Strzelczyk-Zyta D., Marczewski W., Morgiewicz K., Gruden K., Hennig J. 2014. Salicylic acid is an indispensable component of the Ny-1 resistance-gene-mediated response against Potato virus Y infection in potato. *Journal of Experimental Botany*, 65, 4: 1095–1109
- Baena-González E., Sheen J. 2008. Convergent energy and stress signaling. *Trends in Plant Science*, 13, 9: 474–482
- Bardwell L., Shah K. 2006. Analysis of mitogen-activated protein kinase activation and interactions with regulators and substrates. *Methods*, 40, 3: 213–223

- Bartels S., Anderson J.C., González Besteiro M.A., Carreri A., Hirt H., Buchala A., Métraux J.P., Peck S.C., Ulm R. 2009. MAP kinase phosphatase1 and protein tyrosine phosphatase1 are repressors of salicylic acid synthesis and SNC1-mediated responses in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 21, 9: 2884–2897
- Bartels S., González Besteiro M.A., Lang D., Ulm R. 2010. Emerging functions for plant MAP kinase phosphatases. *Trends in Plant Science*, 15, 6: 322–329
- Becker A., Lange M. 2010. VIGS - genomics goes functional. *Trends in Plant Science*, 15, 1: 1–4
- Beckers G.J.M., Jaskiewicz M., Liu Y., Underwood W.R., He S.Y., Zhang S., Conrath U. 2009. Mitogen-activated protein kinases 3 and 6 are required for full priming of stress responses in Arabidopsis thaliana. *The Plant Cell*, 21, 3: 944–953
- Beczner L., Horváth J., Romhányi I., Förster H. 1984. Studies on the etiology of tuber necrotic ringspot disease in potato. *Potato Research*, 27: 339–352
- Bethke G., Pecher P., Eschen-Lippold L., Tsuda K., Katagiri F., Glazebrook J., Scheel D., Lee J. 2012. Activation of the Arabidopsis thaliana mitogen-activated protein kinase MPK11 by the flagellin-derived elicitor peptide, flg22. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25, 4: 471–480
- Camps M., Nichols A., Arkinstall S. 2000. Dual specificity phosphatases: a gene family for control of MAP kinase function. *The FASEB Journal*, 14, 1: 6–16
- Carr J., Lewsey M., Palukaitis P. 2010. Signaling in induced resistance. *Advances in Virus Research*, 76: 57–121
- Carrington J., Kasschau K., Mahajan S., Schaad M. 1996. Cell-to-cell and long-distance transport of viruses in plants. *The Plant Cell*, 8, 10: 1669–1681
- Chen L., Hu W., Tan S., Wang M., Ma Z., Zhou S., Deng X., Zhang Y., Huang C., Yang G., He G. 2012. Genome-wide identification and analysis of MAPK and MAPKK gene families in Brachypodium distachyon. *PLoS One*, 7, 10: e46744
- Cho S.K., Larue C.T., Chevalier D., Wang H., Jinn T.L., Zhang S., Walker J.C. 2008. Regulation of floral organ abscission in Arabidopsis thaliana. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U. S. A.*, 105, 40: 15629–15634
- Chrzanowska M. 1991. New isolates of the necrotic strain of potato virus Y (PVYN) found recently in Poland. *Potato Research*, 34, 2: 179–182
- Colcombet J., Hirt H. 2008. Arabidopsis MAPKs: a complex signalling network involved in multiple biological processes. *Biochemical Journal*, 413, 2: 217–226
- Dean J. V, Mills J.D. 2004. Uptake of salicylic acid 2-O-β-D-glucose into soybean tonoplast vesicles by an ATP-binding cassette transporter-type mechanism. *Physiology Plantarum*, 120, 4: 603–612

- Dean J.V, Mohammed L.A., Fitzpatrick T. 2005. The formation, vacuolar localization, and tonoplast transport of salicylic acid glucose conjugates in tobacco cell suspension cultures. *Planta*, 221, 2: 287–296
- Desender S., Andrivon D., Val F. 2007. Activation of defence reactions in Solanaceae: where is the specificity? *Cellular Microbiology*, 9: 21–30
- Deslandes L., Rivas S. 2011. The plant cell nucleus: A true arena for the fight between plants and pathogens. *Plant Signalling and Behaviour*, 6, 1: 42–48
- Ding X., Richter T., Chen M., Fujii H., Seo Y. S., Xie M., Zheng X., Kanrar S., Stevenson R.A, Dardick C., Li Y., Jiang H., Zhang Y., Yu F., Bartley L.E., Chern M., Bart R., Chen X., Zhu L., Farmerie W.G., Gribskov M., Zhu J.K., Fromm M.E., Ronald P.C., Song W.Y. 2009. A rice kinase-protein interaction map. *Plant Physiology*, 149, 3: 1478–1492
- Dóczi R., Brader G., Pettkó-Szandtner A., Rajh I., Djamei A., Pitzschke A., Teige M., Hirt H. 2007. The Arabidopsis mitogen-activated protein kinase kinase MKK3 is upstream of group C mitogen-activated protein kinases and participates in pathogen signaling. *The Plant Cell*, 19, 10: 3266–3279
- Dóczi R., Okrész L., Romero A.E., Paccanaro A., Bögre L. 2012. Exploring the evolutionary path of plant MAPK networks. *Trends in Plant Science*, 17, 9: 518–525
- Dolja V., Haldeman R., Robertson N., Dougherty W., Carrington J. 1994. Distinct functions of capsid protein in assembly and movement of tobacco etch potyvirus in plants. *The EMBO Journal*, 13, 6: 1482–1491
- Draper M., Pasche J., Gudmestad N. 2002. Factors influencing PVY development and disease expression in three potato cultivars. *American Journal of Potato Research*, 79, 3: 155–165
- Ekengren S.K., Liu Y., Schiff M., Dinesh-Kumar S.P., Martin G.B. 2003. Two MAPK cascades, NPR1, and TGA transcription factors play a role in Pto-mediated disease resistance in tomato. *The Plant Journal*, 36, 6: 905–917
- Eulgem T. 2005. Regulation of the Arabidopsis defense transcriptome. *Trends in Plant Science*, 10, 2: 71–78
- Fu Z.Q., Dong X. 2013. Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense. *Annual Review in Plant Biology*, 64: 839–863
- Gaffney T., Friedrich L., Vernooij B., Negrotto D., Nye G., Uknes S., Ward E., Kessmann H., Ryals J. 1993. Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science*, 261, 5122: 754–756
- Gao M., Liu J., Bi D., Zhang Z., Cheng F., Chen S., Zhang Y. 2008. MEKK1, MKK1/MKK2 and MPK4 function together in a mitogen-activated protein kinase cascade to regulate innate immunity in plants. *Cell Research*, 18, 12: 1190–1198

- García-Marcos A., Pacheco R., Martiáñez J., González-Jara P., Díaz-Ruíz J.R., Tenllado F. 2009. Transcriptional changes and oxidative stress associated with the synergistic interaction between Potato virus X and Potato virus Y and their relationship with symptom expression. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22, 11: 1431–1444
- Garcion C., Lohmann A., Lamodièrre E., Catinot J., Buchala A., Doermann P., Métraux J. P. 2008. Characterization and biological function of the ISOCHORISMATE SYNTHASE2 gene of Arabidopsis. *Plant Physiology*, 147, 3: 1279–1287
- Glazebrook J., Chen W., Estes B., Chang H S., Nawrath C., Métraux J.P., Zhu T., Katagiri F. 2003. Topology of the network integrating salicylate and jasmonate signal transduction derived from global expression phenotyping. *The Plant Journal*, 34: 217–228
- Gómez-Gómez L., Felix G., Boller T. 1999. A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 18, 3: 277–284
- González Besteiro M.A, Ulm R. 2013. Phosphorylation and stabilization of Arabidopsis MAP kinase phosphatase 1 in response to UV-B stress. *Journal of Biological Chemistry*, 288, 1: 480–486
- Gudesblat G.E., Iusem N.D., Morris P. C. 2007. Guard cell-specific inhibition of Arabidopsis MPK3 expression causes abnormal stomatal responses to abscisic acid and hydrogen peroxide. *New Phytologist*, 173, 4: 713–721
- Gupta R., Huang Y., Kieber J., Luan S. 1998. Identification of a dual-specificity protein phosphatase that inactivates a MAP kinase from Arabidopsis. *The Plant Journal*, 16, 5: 581–589
- Halim V.A., Eschen-Lippold L., Altmann S., Birschwilks M., Scheel D., Rosahl S. 2007. Salicylic acid is important for basal defense of *Solanum tuberosum* against *Phytophthora infestans*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20, 11: 1346–1352
- Halim V.A., Vess A., Scheel D., Rosahl S. 2006. The role of salicylic acid and jasmonic acid in pathogen defence. *Plant Biology*, 8, 3: 307–313
- Hamel L.P., Nicole M.C., Sritubtim S., Morency M.J., Ellis M., Ehltng J., Beaudoin N., Barbazuk B., Klessig D., Lee J., Martin G., Mundy J., Ohashi Y., Scheel D., Sheen J., Xing T., Zhang S., Seguin A., Ellis B.E. 2006. Ancient signals: comparative genomics of plant MAPK and MAPKK gene families. *Trends in Plant Science*, 11, 4: 192–198
- Hanks S., Hunter T. 1995. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *The FASEB Journal*, 9: 576–596
- Hanks S.K., Hunter T. 1995. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *The FASEB Journal*, 9: 576–596

- Hardin S.C., Wolniak S.M. 1998. Molecular cloning and characterization of maize ZmMEK1, a protein kinase with a catalytic domain homologous to mitogen- and stress-activated protein kinase kinases. *Planta*, 206, 4: 577–584
- Hardin S.C., Wolniak S.M. 2001. Expression of the mitogen-activated protein kinase kinase ZmMEK1 in the primary root of maize. *Planta*, 213, 6: 916–926
- Heinrich M., Baldwin I.T., Wu J. 2011. Three MAPK kinases, MEK1, SIPKK, and NPK2, are not involved in activation of SIPK after wounding and herbivore feeding but important for accumulation of trypsin proteinase inhibitors. *Plant Molecular Biology Report.*, 30, 3: 731–740
- Holub E.B., Beynon J.L., Crute I.R. 1994. Phenotypic and genotypic characterization of interactions between isolates of *Peronospora parasitica* and accessions of *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 7: 223–239
- Horvath D.M., Huang D.J., Chua N.H. 1998. Four classes of salicylate-induced tobacco genes. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 11, 9: 895–905
- Hruz T., Laule O., Szabo G., Wessendorp F., Bleuler S., Oertle L., Widmayer P., Gruissem W., Zimmermann P. 2008. Genevestigator v3: a reference expression database for the meta-analysis of transcriptomes. *Advances in Bioinformatics*, 2008: 420747
- Hua Z.M., Yang X., Fromm M. E. 2006. Activation of the NaCl- and drought-induced RD29A and RD29B promoters by constitutively active *Arabidopsis* MAPKK or MAPK proteins. *Plant, Cell and Environment*, 29, 9: 1761–1770
- Huang Y., Li H., Hutchison C.E., Laskey J., Kieber J.J. 2003. Biochemical and functional analysis of CTR1, a protein kinase that negatively regulates ethylene signaling in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 33, 2: 221–233
- Hwa C.M., Yang X.C. 2008. The AtMKK3 pathway mediates ABA and salt signaling in *Arabidopsis*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 30, 3: 277–286
- Ichimura K., Shinozaki K., Tena G., Sheen J. 2002. Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends Plant Sci.*, 7, 7: 301–308
- Ishihama N., Yamada R., Yoshioka M., Katou S., Yoshioka H. 2011. Phosphorylation of the *Nicotiana benthamiana* WRKY8 transcription factor by MAPK functions in the defense response. *The Plant Cell*, 23, 3: 1153–1170
- Janitza P., Ullrich K.K., Quint M. 2012. Toward a comprehensive phylogenetic reconstruction of the evolutionary history of mitogen-activated protein kinases in the plant kingdom. *Frontiers in Plant Sciences*, 3: 271
- Jin H., Liu Y., Yang K.Y., Kim C., Baker B., Zhang S. 2003. Function of a mitogen-activated protein kinase pathway in N gene-mediated resistance in tobacco. *The Plant Journal*, 33, 4: 719–731
- Jones J.D.G., Dangl J. L. 2006. The plant immune system. *Nature*, 444, 7117: 323–329

- Kalbina I., Strid A. 2006. The role of NADPH oxidase and MAP kinase phosphatase in UV-B-dependent gene expression in Arabidopsis. *Plant, Cell and Environment*, 29, 9: 1783–1793
- Karimi M., Meyer B.D, Hilson P. 2005. Modular cloning in plant cells. *Trends in Plant Sciences*, 10, 3: 103–105
- Katoh K., Standley D.M. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30, 4: 772–780
- Katou S., Karita E., Yamakawa H., Seo S., Mitsuhashi I., Kuchitsu K., Ohashi Y. 2005a. Catalytic activation of the plant MAPK phosphatase NtMKP1 by its physiological substrate salicylic acid-induced protein kinase but not by calmodulins. *Journal of Biological Chemistry*, 280, 47: 39569–39581
- Katou S., Kuroda K., Seo S., Yanagawa Y., Tsuge T., Yamazaki M., Miyao A., Hirochika H., Ohashi Y. 2007. A calmodulin-binding mitogen-activated protein kinase phosphatase is induced by wounding and regulates the activities of stress-related mitogen-activated protein kinases in rice. *Plant and Cell Physiology*, 48, 2: 332–344
- Katou S., Yamamoto A., Yoshioka H., Kawakita K., Doke N. 2003. Functional analysis of potato mitogen-activated protein kinase kinase, StMEK1. *Journal of General Plant Pathology*, 69: 161–168
- Katou S., Yoshioka H., Kawakita K., Rowland O., Jones J., Mori H., Doke N. 2005b. Involvement of PPS3 phosphorylated by elicitor-responsive mitogen-activated protein kinases in the regulation of plant cell death. *Plant Physiology*, 139: 1914–1926
- Kerlan C. 2006. Description of plant viruses. No. 414; <http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=414> (13. feb. 2014)
- Kesarwani M., Yoo J., Dong X. 2007. Genetic interactions of TGA transcription factors in the regulation of pathogenesis-related genes and disease resistance in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 144, 1: 336–346
- Keyse S. M. 2008. The regulation of stress-activated MAP kinase signalling by protein phosphatases. V: Stress-activated protein kinases, Vol.20. Posas F. in Nebreda A. R. (eds.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 40: 33–49
- Kieber J.J., Rothenberg M., Roman G., Feldmann K.A., Ecker J.R. 1993. CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in Arabidopsis, encodes a member of the Raf family of protein kinases. *The Cell*, 72, 3: 427–441
- Kishi-Kaboshi M., Okada K., Kurimoto L., Murakami S., Umezawa T., Shibuya N., Yamane H., Miyao A., Takatsuki H., Takahashi A., Hirochika H. 2010. A rice fungal MAMP-responsive MAPK cascade regulates metabolic flow to antimicrobial metabolite synthesis. *The Plant Journal*, 63, 4: 599–612

- Klessig D.F., Menke F.L. H., Pelt J.A. Van 2004. Silencing of the mitogen-activated protein kinase MPK6 compromises disease resistance in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 16, 4: 897–907
- Kloosterman B., Koeyer D.D, Griffiths R., Flinn B., Steuernagel B., Scholz U., Sonnewald S., Sonnewald U., Bryan G.J., Prat S., Bánfalvi Z., Hammond J.P., Geigenberger P., Nielsen K.L., Visser R.G.F., Bachem C.W.B. 2008. Genes driving potato tuber initiation and growth: identification based on transcriptional changes using the POCI array. *Functional and Integrative Genomics*, 8, 4: 329–340
- Kogovšek P., Ravnikar M. 2013. Physiology of the potato-Potato virus Y interaction. V: *Progress in Botany*. Vol. 74. Lüttge U., Beyschlag W., Francis D. in Cushman J. (ur.). Springer Berlin Heidelberg: 101–133
- Kong F., Wang J., Cheng L., Liu S., Wu J., Peng Z., Lu G. 2012. Genome-wide analysis of the mitogen-activated protein kinase gene family in *Solanum lycopersicum*. *Gene*, 499, 1: 108–120
- Kovtun Y., Chiu W.L., Tena G., Sheen J. 2000. Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U. S. A.*, 97, 6: 2940–2945
- Krzymowska M., Konopka-Postupolska D., Sobczak M., Macioszek V., Ellis B.E., Hennig J. 2007. Infection of tobacco with different *Pseudomonas syringae* pathovars leads to distinct morphotypes of programmed cell death. *The Plant Journal*., 50, 253–264
- Kumar D., Klessig D.F. 2000. Differential induction of tobacco MAP kinases by the defense signals nitric oxide, salicylic acid, ethylene, and jasmonic acid. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13, 3: 347–351
- Kus M. 1995. Investigations of the sensitivity of potato cultivars to tuber necrotic ringspot strain of potato virus Y (PVY^{NTN}). V: *Proceedings of the 9th EAPR virology section meeting*, Bled, 18-22 jun. 1995. Rečnik M., Kus M. (ur.). M-KŽK Kmetijstvo: 135–138
- Lazar A., Coll A., Dobnik D., Baebler Š., Bedina-Zavec A., Žel J., Gruden K. 2014. Involvement of potato (*Solanum tuberosum* L.) MKK6 in response to Potato virus Y. *PLoS One*, 9, 8: e104553
- Lebel E., Heifetz P., Thorne L., Uknes S., Ryals J., Ward E. 1998. Functional analysis of regulatory sequences controlling PR-1 gene expression in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 16, 2: 223–233
- Lee J.S., Ellis B. E. 2007. Arabidopsis MAPK phosphatase 2 (MKP2) positively regulates oxidative stress tolerance and inactivates the MPK3 and MPK6 MAPKs. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 34: 25020–25029
- Lee J.S., Huh K.W., Bhargava A., Ellis B.E. 2008. Comprehensive analysis of protein-protein interactions between Arabidopsis MAPKs and MAPK kinases helps define

- potential MAPK signalling modules. *Plant Signaling and Behaviour*, 3, 12: 1037–1041
- Lee J.S., Wang S., Sritubtim S., Chen J. G., Ellis B.E. 2009. Arabidopsis mitogen-activated protein kinase MPK12 interacts with the MAPK phosphatase IBR5 and regulates auxin signaling. *The Plant Journal*, 57, 6: 975–985
- Lehti-Shiu M.D., Shiu S.H. 2012. Diversity, classification and function of the plant protein kinase superfamily. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 367, 1602: 2619–2639
- Lehti-Shiu M.D., Zou C., Hanada K., Shiu S.H. 2009. Evolutionary history and stress regulation of plant receptor-like kinase/pelle genes. *Plant Physiology*, 150, 1: 12–26
- Lescot M., Déhais P., Thijs G., Marchal K., Moreau Y., Peer Y. Van de, Rouzé P., Rombauts S. 2002. PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. *Nucleic Acids Research*, 30, 1: 325–327
- Liang W., Yang B., Yu B.J., Zhou Z., Li C., Jia M., Sun Y., Zhang Y., Wu F., Zhang H., Wang B., Deyholos M.K., Jiang Y.Q. 2013. Identification and analysis of MKK and MPK gene families in canola (*Brassica napus* L.). *BMC Genomics*, 14, 1: 392
- Ligterink W., Kroj T., Nieden U. zur, Hirt H., Scheel D. 1997. Receptor-mediated activation of a MAP kinase in pathogen defense of plants. *Science*, 276: 2054–2057
- Lin W.Y., Matsuoka D., Sasayama D., Nanmori T. 2010. A splice variant of Arabidopsis mitogen-activated protein kinase and its regulatory function in the MKK6–MPK13 pathway. *Plant Science*, 178, 3: 245–250
- Liu H., Wang Y., Xu J., Su T., Liu G., Ren D. 2008. Ethylene signaling is required for the acceleration of cell death induced by the activation of AtMEK5 in Arabidopsis. *Cell Research*, 18, 3: 422–432
- Liu Y., Ren D., Pike S., Pallardy S., Gassmann W., Zhang S. 2007. Chloroplast-generated reactive oxygen species are involved in hypersensitive response-like cell death mediated by a mitogen-activated protein kinase cascade. *The Plant Journal*, 51, 6: 941–954
- Liu Y., Schiff M., Dinesh-Kumar S. P. 2004. Involvement of MEK1 MAPKK, NTF6 MAPK, WRKY/MYB transcription factors, COI1 and CTR1 in N-mediated resistance to tobacco mosaic virus. *The Plant Journal*, 38, 5: 800–809
- Liu Y., Zhou Y., Liu L., Sun L., Zhang M., Liu Y., Li D. 2012. Maize ZmMEK1 is a single-copy gene. *Molecular Biology Reports*, 39, 3: 2957–2966

- Lumbreras V., Vilela B., Irar S., Solé M., Capellades M., Valls M., Coca M., Pagès M. 2010. MAPK phosphatase MKP2 mediates disease responses in *Arabidopsis* and functionally interacts with MPK3 and MPK6. *The Plant Journal*, 63, 6: 1017–1030
- Manning G., Plowman G.D., Hunter T., Sudarsanam S. 2002. Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. *Trends in Biochemical Sciences*, 27, 10: 514–520
- Manning G., Whyte D.B., Martinez R., Hunter T., Sudarsanam S. 2002. The protein kinase complement of the human genome. *Science*, 298, 5600: 1912–1934
- Mase K., Mizuno T., Ishihama N., Fujii T., Mori H., Kodama M., Yoshioka H. 2012. Ethylene signaling pathway and MAPK cascades are required for AAL toxin-induced programmed cell death. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25, 8: 1015–1025
- Massa A.N., Childs K L., Lin H., Bryan G.J., Giuliano G., Buell C.R. 2011. The transcriptome of the reference potato genome *Solanum tuberosum* Group Phureja clone DM1-3 516R44. *PLoS One*, 6, 10: e26801
- Mauch-Mani B., Mauch F. 2005. The role of abscisic acid in plant-pathogen interactions. *Current Opinion in Plant Biology*, 8, 4: 409–414
- Meldau S., Ullman-Zeunert L., Govind G., Bartram S., Baldwin I.T. 2012. MAPK-dependent JA and SA signalling in *Nicotiana attenuata* affects plant growth and fitness during competition with conspecifics. *BMC Plant Biology*, 12, 213
- Melech-Bonfil S., Sessa G. 2010. Tomato MAPKKKε is a positive regulator of cell-death signaling networks associated with plant immunity. *The Plant Journal*, 64, 3: 379–391
- Melikant B., Giuliani C., Halbmayr-Watzina S., Limmongkon A., Heberle-Bors E., Wilson C. 2004. The *Arabidopsis thaliana* MEK AtMKK6 activates the MAP kinase AtMPK13. *FEBS Letters*, 576, 1-2: 5–8
- Melvin P., Prabhu S.A., Anup C.P., Shailasree S., Shetty H.S., Kini K.R. 2014. Involvement of mitogen-activated protein kinase signalling in pearl millet-downy mildew interaction. *Plant Science*, 214: 29–37
- Meng X., Xu J., He Y., Yang K.Y., Mordorski B., Liu Y., Zhang S. 2013. Phosphorylation of an ERF transcription factor by *Arabidopsis* MPK3/MPK6 regulates plant defense gene induction and fungal resistance. *The Plant Cell*, 25, 3: 1126–1142
- Meng X., Zhang S. 2013. MAPK cascades in plant disease resistance signaling. *Annual Review in Phytopathology*, 51: 245–266
- Monroe-Augustus M., Zolman B.K., Bartel B. 2003. IBR5, a dual-specificity phosphatase-like protein modulating auxin and abscisic acid responsiveness in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 15, 12: 2979–2991

- Müller J., Beck M., Mettlich U., Komis G., Hause G., Menzel D., Samaj J. 2010. Arabidopsis MPK6 is involved in cell division plane control during early root development, and localizes to the pre-prophase band, phragmoplast, trans-Golgi network and plasma membrane. *The Plant Journal*, 61, 2: 234–248
- Mur L.A.J., Kenton P., Lloyd A.J., Ougham H., Prats E. 2008. The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? *Journal of Experimental Botany*, 59, 3: 501–520
- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 3: 473–497
- Naoi K., Hashimoto T. 2004. A semidominant mutation in an Arabidopsis mitogen-activated protein kinase phosphatase-like gene compromises cortical microtubule organization. *The Plant Cell*, 16, 7: 1841–1853
- National Center for Biotechnology Information
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (20. jul. 2014)
- Navarro L., Bari R., Achard P., Lisón P., Nemri A., Harberd N.P., Jones J.D.G. 2008. DELLAs control plant immune responses by modulating the balance of jasmonic acid and salicylic acid signaling. *Current Biology*, 18, 9: 650–655
- Nicole M.C., Hamel L.P., Morency M.J., Beaudoin N., Ellis B.E., Séguin A. 2006. MAP-ping genomic organization and organ-specific expression profiles of poplar MAP kinases and MAP kinase kinases. *BMC Genomics*, 7: 223
- Oka K., Amano Y., Katou S., Seo S., Kawazu K., Mochizuki A., Kuchitsu K., Mitsuhashi I. 2013. Tobacco MAP kinase phosphatase (NtMKP1) negatively regulates wound response and induced resistance against necrotrophic pathogens and lepidopteran herbivores. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 26, 6: 668–675
- Pedley K. F., Martin G. B. 2004. Identification of MAPKs and their possible MAPK kinase activators involved in the Pto-mediated defense response of tomato. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 47: 49229–49235
- Petersen M., Brodersen P., Naested H., Andreasson E., Lindhart U., Johansen B., Nielsen H.B., Lacy M., Austin M.J., Parker J.E., Sharma S.B., Klessig D.F., Martienssen R., Mattsson O., Jensen A.B., Mundy J., Louis S., Gene M.P.K. 2000. Arabidopsis MAP kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. *The Cell*, 103: 1111–1120
- Piche L., Singh R., Nie X., Gudmestad N. 2004. Diversity among Potato virus Y isolates obtained from potatoes grown in the United States. *Phytopathology*, 94, 12: 1368–1375
- Pieterse C.M.J., Does D. Van der, Zamioudis C., Leon-Reyes A., Wees S.C.M. Van 2012. Hormonal modulation of plant immunity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 28: 489–521

Potato Oligo Chip Initiative (POCI)

http://pgrc-35.ipk-gatersleben.de/pls/htmldb_pgrc/f?p=194:1 (julij, 2013)

- Poljšak-Prijatelj M., Ravnikar M. 1992. Detection of PVYN with decoration and gold immuno labeling of thin sections in some secondary infected potato cultivars. *Electron Microscopy*, 3: 465–466
- Pompe-Novak M., Gruden K., Baebler Š., Krečič-Stres H., Kovač M., Jongsma M., Ravnikar M. 2005. Potato virus Y induced changes in the gene expression of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 67, 3-5: 237–247
- Pompe-Novak M., Poljšak-Prijatelj M., Popovič T., Štrukelj B., Ravnikar M. 2002. The impact of potato cysteine proteinases in plant growth and development. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 60, 2: 71–78
- Popescu S.C., Popescu G. V, Bachan S., Zhang Z., Gerstein M., Snyder M., Dinesh-Kumar S.P. 2009. MAPK target networks in *Arabidopsis thaliana* revealed using functional protein microarrays. *Genes and Development*, 23, 1: 80–92
- Potato Genome Sequencing Consortium 2011. Genome sequence and analysis of the tuber crop potato. *Nature*, 475, 7355: 189–195
- Pozo O. del, Pedley K.F., Martin G.B. 2004. MAPKKKalpha is a positive regulator of cell death associated with both plant immunity and disease. *The EMBO Journal*, 23, 15: 3072–3082
- Qiu J.L., Zhou L., Yun B.W., Nielsen H.B., Fiil B.K., Petersen K., Mackinlay J., Loake G. J., Mundy J., Morris P.C. 2008. *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase kinases MKK1 and MKK2 have overlapping functions in defense signaling mediated by MEKK1, MPK4, and MKS1. *Plant Physiology*, 148, 1: 212–222
- Quettier A.L., Bertrand C., Habricot Y., Miginiac E., Agnes C., Jeannette E., Maldiney R. 2006. The *phs1-3* mutation in a putative dual-specificity protein tyrosine phosphatase gene provokes hypersensitive responses to abscisic acid in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 47, 5: 711–719
- Rakhshandehroo F., Takeshita M., Squires J., Palukaitis P. 2009. The influence of RNA-dependent RNA polymerase 1 on potato virus Y infection and on other antiviral response genes. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22, 10: 1312–1318
- Ramšak Ž., Baebler Š., Rotter A., Korbar M., Mozetič I., Usadel B., Gruden K. 2014. GoMapMan: integration, consolidation and visualization of plant gene annotations within the MapMan ontology. *Nucleic Acids Research*, 42, 1: D1167–1175
- Rasmussen M.W., Roux M., Petersen M., Mundy J. 2012. MAP kinase cascades in *Arabidopsis* innate immunity. *Frontiers in Plant Sciences*, 3: 169
- Rodriguez M.C.S., Petersen M., Mundy J. 2010. Mitogen-activated protein kinase signaling in plants. *Annual Review in Plant Biology*, 61: 621–649

- Romeis T., Piedras P., Zhang S., Klessig D.F., Hirt H., Jones J. D. 1999. Rapid Avr9- and Cf-9 -dependent activation of MAP kinases in tobacco cell cultures and leaves: convergence of resistance gene, elicitor, wound, and salicylate responses. *The Plant Cell*, 11, 2: 273–287
- Roux M., Schwessinger B., Albrecht C., Chinchilla D., Jones A., Holton N., Malinovsky F. G., Tör M., Vries S. de, Zipfel C. 2011. The Arabidopsis leucine-rich repeat receptor-like kinases BAK1/SERK3 and BKK1/SERK4 are required for innate immunity to hemibiotrophic and biotrophic pathogens. *The Plant Cell*, 23, 6: 2440–2455
- Saito N., Nei M. 1987. The neighbour-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4, 4: 406–425
- Samuel M.A., Hall H., Krzymowska M., Drzewiecka K., Hennig J., Ellis B.E. 2005. SIPK signaling controls multiple components of harpin-induced cell death in tobacco. *The Plant Journal*, 42, 3: 406–416
- Sano H., Seo S., Koizumi N., Niki T., Iwamura H., Ohashi Y. 1996. Regulation by cytokinins of endogenous levels of jasmonic and salicylic acids in mechanically wounded tobacco plants. *Plant and Cell Physiology*, 37, 6: 762–769
- Scholthof K.G., Adkins S., Czosnek H., Palukaitis P., Jacquot E., Hohn T., Hohn B., Saunders K., Candresse T., Ahlquist P., Hemenway C., Foster G.D. 2011. Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 12, 9: 938–954
- Schwessinger B., Roux M., Kadota Y., Ntoukakis V., Sklenar J., Jones A., Zipfel C. 2011. Phosphorylation-dependent differential regulation of plant growth, cell death, and innate immunity by the regulatory receptor-like kinase BAK1. *PLoS Genetics*: 7, 4: e1002046
- Seo S., Katou S., Seto H., Gomi K., Ohashi Y. 2007. The mitogen-activated protein kinases WIPK and SIPK regulate the levels of jasmonic and salicylic acids in wounded tobacco plants. *The Plant Journal*, 49, 5: 899–909
- Seo S., Okamoto M., Seto H., Ishizuka K., Sano H., Ohashi Y. 1995. Tobacco MAP kinase: a possible mediator in wound signal transduction pathways. *Science*, 270, 5244: 1988–1992
- Seo S., Sano H., Ohashi Y. 1999. Jasmonate-based wound signal transduction requires activation of WIPK, a tobacco mitogen-activated protein kinase. *The Plant Cell*, 11, 2: 289–298
- Sharma P.C., Ito A., Shimizu T., Terauchi R., Kamoun S., Saitoh H. 2003. Virus-induced silencing of WIPK and SIPK genes reduces resistance to a bacterial pathogen, but has no effect on the INF1-induced hypersensitive response (HR) in *Nicotiana benthamiana*. *Molecular Genetics and Genomics*, 269, 5: 583–591

- Shiu S.H., Karlowski W.M., Pan R., Tzeng Y.H., Mayer K.F.X., Li W.H. 2004. Comparative analysis of the receptor-like kinase family in Arabidopsis and rice. *The Plant Cell*, 16, 5: 1220–1234
- Singh R., Jwa N.S. 2013. The rice MAPKK-MAPK interactome: the biological significance of MAPK components in hormone signal transduction. *Plant Cell Reports*, 32, 6: 923–931
- Soyano T., Nishihama R., Morikiyo K., Ishikawa M., Machida Y. 2003. NQK1/NtMEK1 is a MAPKK that acts in the NPK1 MAPKKK-mediated MAPK cascade and is required for plant cytokinesis. *Genes and Development*, 17, 8: 1055–1067
- Spoel S.H., Koornneef A., Claessens S.M.C., Korzelius J.P., Pelt J.A. Van, Mueller M.J., Buchala A.J., Métraux J.P., Brown R., Kazan K., Loon L.C. Van, Dong X., Pieterse C.M.J. 2003. NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *The Plant Cell*, 15, 3: 760–770
- Strader L.C., Monroe-Augustus M., Rogers K.C., Lin G.L., Bartel B. 2008. Arabidopsis iba response5 suppressors separate responses to various hormones. *Genetics*, 180, 4: 2019–2031
- Su S.H., Bush S.M., Zaman N., Stecker K., Sussman M.R., Krysan P. 2013. Deletion of a tandem gene family in Arabidopsis: increased MEKK2 abundance triggers autoimmunity when the MEKK1-MKK1/2-MPK4 signaling cascade is disrupted. *The Plant Cell*, 25, 5: 1895–1910
- Suarez-Rodriguez M.C., Adams-Phillips L., Liu Y., Wang H., Su S.H., Jester P.J., Zhang S., Bent A.F., Krysan P.J. 2007. MEKK1 is required for flg22-induced MPK4 activation in Arabidopsis plants. *Plant Physiology*, 143, 2: 661–669
- Szajko K., Chrzanowska M., Witek K., Strzelczyk-Zyta D., Zagórska H., Gebhardt C., Hennig J., Marczewski W. 2008. The novel gene Ny-1 on potato chromosome IX confers hypersensitive resistance to Potato virus Y and is an alternative to Ry genes in potato breeding for PVY resistance. *Theoretical and Applied Genetics*, 116, 2: 297–303
- Takahashi F., Yoshida R., Ichimura K., Mizoguchi T., Seo S., Yonezawa M., Maruyama K., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. 2007a. The mitogen-activated protein kinase cascade MKK3-MPK6 is an important part of the jasmonate signal transduction pathway in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 19, 3: 805–818
- Takahashi Y., Nasir K. H. Bin, Ito A., Kanzaki H., Matsumura H., Saitoh H., Fujisawa S., Kamoun S., Terauchi R. 2007b. A high-throughput screen of cell-death-inducing factors in *Nicotiana benthamiana* identifies a novel MAPKK that mediates INF1-induced cell death signaling and non-host resistance to *Pseudomonas cichorii*. *The Plant Journal*, 49, 6: 1030–1040

- Takahashi Y., Nasir K. H. Bin, Ito A., Kanzaki H., Matsumura H., Saitoh H., Fujisawa S., Kamoun S., Terauchi R. 2007c. A novel MAPKK involved in cell death and defense signaling. *Plant Signaling and Behavior*, 2, 396–398
- Takahashi Y., Soyano T., Kosetsu K., Sasabe M., Machida Y. 2010. HINKEL kinesin, ANP MAPKKs and MKK6/ANQ MAPKK, which phosphorylates and activates MPK4 MAPK, constitute a pathway that is required for cytokinesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell and Physiology*, 51, 10: 1766–1776
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28, 10: 2731–2739
- Teige M., Scheikl E., Eulgem T., Dóczi R., Ichimura K., Shinozaki K., Dangl J.L., Hirt H. 2004. The MKK2 pathway mediates cold and salt stress signaling in *Arabidopsis*. *Molecular Cell*, 15,1: 141–152
- The Arabidopsis Genome Initiative 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 408, 6814: 796–815
- Theodosiou A., Ashworth A. 2002a. MAP kinase phosphatases. *Genome Biology*, 3, 7: 1–10
- Theodosiou A., Ashworth A. 2002b. Protein family review: MAP kinase phosphatases. *Genome Biology*, 3, 7: 1–10
- Ulm R., Ichimura K., Mizoguchi T., Peck S.C., Zhu T., Wang X., Shinozaki K., Paszkowski J. 2002. Distinct regulation of salinity and genotoxic stress responses by *Arabidopsis* MAP kinase phosphatase 1. *The EMBO Journal*, 21, 23: 6483–6493
- Ulm R., Revenkova E., Sansebastiano G. P. di, Bechtold N., Paszkowski J. 2001. Mitogen-activated protein kinase phosphatase is required for genotoxic stress relief in *Arabidopsis*. *Genes and Development*, 15, 6: 699–709
- Universal Protein Resource (UniProt)
<http://www.uniprot.org/> (7. jul. 2011)
- Valkonen J.P.T. 1994. Natural genes and mechanisms for resistance to viruses in cultivated and wild potato species (*Solanum* spp.). *Plant Breeding*, 112: 1–16
- Vernooij B. 1995. 2,6-dichloroisonicotinic acid-induced resistance to pathogens without the accumulation of salicylic acid. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 8, 2: 228–234
- Vilela B., Pagès M., Lumberras V. 2010. Regulation of MAPK signaling and cell death by MAPK phosphatase MKP2. *Plant Signalling and Behaviour*, 5, 11: 1497–1500

- Vlot A.C., Dempsey D.A., Klessig D.F. 2009. Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual Review in Phytopathology*, 47: 177–206
- Vlot A.C., Klessig D.F., Park S.W. 2008. Systemic acquired resistance: the elusive signal(s). *Current Opinion in Plant Biology*, 11, 4: 436–442
- Walia A., Lee J.S., Wasteneys G., Ellis B. 2009. Arabidopsis mitogen-activated protein kinase MPK18 mediates cortical microtubule functions in plant cells. *The Plant Journal*, 59, 4: 565–575
- Wang D., Pajerowska-Mukhtar K., Culler A.H., Dong X. 2007. Salicylic acid inhibits pathogen growth in plants through repression of the auxin signaling pathway. *Current Biology*, 17, 20: 1784–1790
- Wang H., Ngwenyama N., Liu Y., Walker J.C., Zhang S. 2007. Stomatal development and patterning are regulated by environmentally responsive mitogen-activated protein kinases in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 19, 1: 63–73
- Wei C., Liu X., Long D., Guo Q., Fang Y., Bian C., Zhang D., Zeng Q., Xiang Z., Zhao A. 2014. Molecular cloning and expression analysis of mulberry MAPK gene family. *Plant Physiology and Biochemistry*, 77: 108–116
- Weller S.A., Elphinstone J.G., Smith N.C., Boonham N., Stead D.E. 2000. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a Quantitative, Multiplex, Real-Time, Fluorogenic PCR (TaqMan) assay. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 7: 2853–2858
- Wen J., Oono K., Imai R., Osmek R. 2002. Two novel mitogen-activated protein signaling components, OsMEK1 and OsMAP1, are involved in a moderate low-temperature signaling pathway in rice. *Plant Physiology*, 129, 4: 1880–1891
- Wildermuth M.C. 2006. Variations on a theme: synthesis and modification of plant benzoic acids. *Current Opinion in Plant Biology*, 9, 3: 288–296
- Wildermuth M.C., Dewdney J., Wu G., Ausubel F.M. 2001. Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature*, 414, 6863: 562–565
- Winter D., Vinegar B., Nahal H., Ammar R., Wilson G.V, Provart N.J. 2007. An “Electronic Fluorescent Pictograph” browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS One*, 2, 8: e718
- Xie G., Kato H., Imai R. 2012. Biochemical identification of the OsMKK6-OsMPK3 signalling pathway for chilling stress tolerance in rice. *Biochemical Journal*, 443, 1: 195–102
- Xu J., Li Y., Wang Y., Liu H., Lei L., Yang H., Liu G., Ren D. 2008. Activation of MAPK kinase 9 induces ethylene and camalexin biosynthesis and enhances sensitivity to salt stress in Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry*, 283, 40: 26996–7006

- Yamakawa H., Katou S., Seo S., Mitsuhara I., Kamada H., Ohashi Y. 2004. Plant MAPK phosphatase interacts with calmodulins. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 2: 928–936
- Yamamizo C., Kuchimura K., Kobayashi A., Katou S., Kawakita K., Jones J., Doke N., Yoshioka H. 2006. Rewiring mitogen-activated protein kinase cascade by positive feedback confers potato blight resistance. *Plant Physiology*, 140, 2: 681–692
- Yang K.Y., Liu Y., Zhang S. 2001. Activation of a mitogen-activated protein kinase pathway is involved in disease resistance in tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.*, 98, 2: 741–746
- Yap Y., Kodama Y., Waller F., Chung K.M., Ueda H., Nakamura K. 2005. Activation of a novel transcription factor through phosphorylation by WIPK, a wound-induced mitogen activated protein kinase in tobacco plants. *Plant Physiology*, 139, 1: 127–137
- Yoo J.H., Cheong M.S., Park C.Y., Moon B.C., Kim M.C., Kang Y.H., Park H.C., Choi M.S., Lee J.H., Jung W.Y., Yoon H.W., Chung W.S., Lim C.O., Lee S.Y., Cho M.J. 2004. Regulation of the dual specificity protein phosphatase, DsPTP1, through interactions with calmodulin. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 2: 848–858
- Yoo S.-D., Cho Y.-H., Tena G., Xiong Y., Sheen J. 2008. Dual control of nuclear EIN3 by bifurcate MAPK cascades in C2H4 signalling. *Nature*, 451, 7180: 789–795
- Zäidi I., Ebel C., Touzri M., Herzog E., Evrard J.L., Schmit A.C., Masmoudi K., Hanin M. 2010. TMKP1 is a novel wheat stress responsive MAP kinase phosphatase localized in the nucleus. *Plant Molecular Biology*, 73, 3: 325–338
- Zeng Q., Sritubtim S., Ellis B.E. 2011. AtMKK6 and AtMPK13 are required for lateral root formation in Arabidopsis. *Plant Signalling and Behaviour*, 6, 10: 1436–1439
- Zhang J. 2003. Evolution by gene duplication: an update. *Trends in Ecology & Evolution*, 18, 6: 292–298
- Zhang J., Shao F., Li Y., Cui H., Chen L., Li H., Zou Y., Long C., Lan L., Chai J., Chen S., Tang X., Zhou J.M. 2007. A *Pseudomonas syringae* effector inactivates MAPKs to suppress PAMP-induced immunity in plants. *Cell Host & Microbe*, 1: 175–185
- Zhang S., Klessig D.F. 1997. Salicylic acid activates a 48-kD MAP kinase in tobacco. *The Plant Cell*, 9, 5: 809–824
- Zhang S., Klessig D.F. 1998a. Resistance gene N-mediated de novo synthesis and activation of a tobacco mitogen-activated protein kinase by tobacco mosaic virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.*, 95, 13: 7433–7438

- Zhang S., Klessig D.F. 1998b. The tobacco wounding-activated mitogen-activated protein kinase is encoded by SIPK. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.*, 95, 12: 7225–3720
- Zhang S., Klessig D. F. 2001. MAPK cascades in plant defense signaling. *Trends in Plant Science*, 6: 520–527
- Zhang S., Xu R., Luo X., Jiang Z., Shu H. 2013. Genome-wide identification and expression analysis of MAPK and MAPKK gene family in *Malus domestica*. *Gene*, 531, 2: 377–387
- Zhang X., Cheng T., Wang G., Yan Y., Xia Q. 2013. Cloning and evolutionary analysis of tobacco MAPK gene family. *Molecular Biology Reports*, 40, 2: 1407–1415
- Zhang X., Dai Y., Xiong Y., DeFraia C., Li J., Dong X., Mou Z. 2007. Overexpression of Arabidopsis MAP kinase kinase 7 leads to activation of plant basal and systemic acquired resistance. *The Plant Journal*, 52, 6: 1066–1079
- Zhou C., Cai Z., Guo Y., Gan S. 2009. An arabidopsis mitogen-activated protein kinase cascade, MKK9-MPK6, plays a role in leaf senescence. *Plant Physiology*, 150, 1: 167–177
- Zipfel C., Kunze G., Chinchilla D., Caniard A., Jones J.D.G., Boller T., Felix G. 2006. Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. *The Cell*, 125, 4: 749–760

ZAHVALA

Mentorici prof. dr. Jani Žel in somentorici prof. dr. Kristini Gruden se iskreno zahvaljujem za vso podporo in pomoč. Usmerjali sta me, me motivirali in mi vlivali optimizem ob neuspehlih poskusih in pomagali premagovati raziskovalne prepreke.

Hvala članoma komisije, prof. dr. Branki Javornik in prof. dr. Borutu Štruklju za pregled doktorske disertacije in koristne pripombe.

Za vso pomoč in nasvete pri delu v laboratoriju ter za podporo se zahvaljujem Anni.

Hvala Davidu Dobniku za pomoč pri konfokalni mikroskopiji in pri eksperimentih utišanja, Tini in Katji za pomoč pri laboratorijskem delu ter Lidiji in Špeli za vzdrževanje krompirjev in tobakov.

Prof. dr. Jacku Hennigu in prof. dr. Magdi Krzymowski se zahvaljujem za vse znanje in izkušnje, ki sem ga pridobila v času prijetnega bivanja v Varšavi in tekom dela na Oddelku za rastlinsko patogenezo Inštituta za biokemijo in biofiziko v Varšavi.

Za pomoč pri delu s konfokalnim mikroskopom v Laboratoriju za biotehnologijo Kemijskega inštituta se zahvaljujem dr. Mojci Benčina.

Hvala vsem sodelavcem za krasno delovno vzdušje.

Hvala tudi Davidu in vsem domačim.

PRILOGE

Priloga A: Sekvence genov *StMKK6*, *StWIPK*, *StMAPK4_1*, *StMAPK4_2*, *StMAPK6* in *StMAPK13* in *StMKP1*, izoliranih iz krompirja sorte Rywal.

Appendix A: Sequences of the genes: *StMKK6*, *StWIPK*, *StMAPK4_1*, *StMAPK4_2*, *StMAPK6* and *StMAPK13* in *StMKP1*, all isolated from potato cv. Rywal.

```
>gi|571331414|gb|KF837127.1| Solanum tuberosum cultivar Rywal mitogen-
activated protein kinase kinase 6 (MKK6) mRNA, complete cds
ATGAAGACGACGAAAGCCATTGAAGCAACTTAAGCTCTCTGTACCCGCTCAAGATACTCCCATTTCCAGCT
TCTTGACTGCGAGTGGAAACGTTTCATGATGGCGATTTACTTTTTGAACCAGAAAGGACTCAGACTCATTTC
TGAAGAGAATGAATCTCTGCCCTCAGAACTAAGGAGATAGATCTTCAGTTTTTCATTGGAAGATCTTGAA
ACCATCAAAGTCATTGGAAAAGGAAGTGGGGGTGTTGTTCAACTTGTTCGTCATAAATGGGTGGAAACAT
TGTTTGCTCTGAAGGTTATCCAGATGAATATAACAAGAAGATATTCGTAAGCAGATAGTGCAAGAACTGAA
AATAAATCAAGCATCACAATGTCCACATGTTGTTGTATGCTACCACCTTTCTATCACAATGGAGCTATA
TCTCTGGTTTTGGAGTATATGGACCGTGGATCTTTAGTTGATGTAATCGGGCAACTTAAGACAATTCTTG
AACCATATCTCGCAGTTGTTTGCAAGCAGGTTTTACAAGGCTTGTCTACTTGCATCACGAGAGACATGT
TATCCACAGAGACATAAAGCCATCAAACCTGCTAGTGAACCACAAAGGAGAGGTAAAAATTACAGATTTT
GGTGTAAAGTGAATGCTAGCCAGCTCTATGGGTCAAAGGGATACATTTGTTGGAACCTACAATTACATGG
CACCTGAAAGAATAAGTGGAAAGTACCTATGACTACAAGAGTGATATCTGGAGCTTGGGCATGGTCATCCT
TGAATGTGCTATTTGGACGTTTCCCATACATACAGTCAGAGGACCAGCAAGCTCGGCCTAGCTTTTACGAG
CTTCTGGAGGCTATTGTTAGCAGTCCACCACCTTCTGCTCCAGCAGATCAATTTTCCCCAGAATTCTGTT
CGTTTTGTTTCTGCTTGCATTCAAAAGGATCCCAGGGATAGATCTTCAGCTTTGGACCTTTTGAGTCACCC
TTTCATTAAGAAGTTTGAAGACAAAGACATTGATCTCAGCATCCTTGTGAGTAGCCTGGAACCACCAGTA
AATTTTCCAAGATAA
```

>RyWIPK

```
ATGGTTGATGCTAATATGGGTGGTGTCTCAATTCCTGATTTTCTAAAATTGTTACTCATGGTGGACAAT
ATGTTTCAAGTATGACATTTTGGTAATTAATTTGAGATTACCAACAAGTATAGACCTCCTATCATGCCTAT
TGGCCGTGGCGCTTATGGAATCGTCTGCTCTGTGTTAATGCGGAGCTGAATGAGATGGTTGCAGTTAAG
AAAAATCGCCAATGCTTTTGTATAATTACATGGATGCTAAGAGGACGCTCCGTGAAATTAAGCTTCTCGCC
ATTTAGACCATGAAAATGTCATTTGGTTTAAAGAGATGTGATTCCTCCGCCCTTACGAAGGGAGTTTTCTGA
TGTATACATTGCTACTGAACTCATGGATACTGATCTTCACCAAATAATTCGATCGAACCAAGGTTTATCA
GAGGATCATTGCCAGTACTTCATGTATCAGCTTCTCCGTGGGCTAAAGTACATACATTCAGCGCATGTTA
TTCATAGAGATCTCAAACCAAGTAACCTCTTGCTAAATGCAAATTTGTGATCTTAAGATATGTGATTTTGG
TCTTGCAAGGCCAAACCTAGAGAACGAGAATATGACAGAATATGTAGTAACCAGATGGTACAGGGCACCG
GAGCTTTTTGTTGAACTCTTCAGATTACACTGCTGCCATAGATGTTTGGTCTGTGGGTGTCATCTTCATGG
AGCTTATGAATAGAAAAACCTTTGTTTGTGTTGAAAAGATCATGTACATCAAATACGCTTGCTAACTGAGCT
TCTTGCCACTCCTACAGAATCTGATCTTAGCTTCTCCGAAATGAAGATGCAAAAAGATATGTCAGGCAA
CTCCCACAACATCCACGCCAGCAGTTAGCAACAGTGTTCCTCATGTAAATCCATTAGCCATTGATCTTG
TAGATAAGATGTTGACTCTGACCCCTACTAGAAGAAATTACAGTTGAGGAAGCATTAGCTCATCCATACCT
TGCAAAGCTCCATGATGCCGCTGATGAACCAGTCTGCCCCATCCCGTTCTCTTTGACTTTGAGCAACAA
GGGATAGGAGAAGAGCAGATTAAGACATGATTTATCAAGAAGCCTTGGCGTTGAATCCTGAATATGCTT
AA
```

```
>gi|599089090|gb|KJ027594.1| Solanum tuberosum cultivar Rywal MAPK4_1
protein mRNA, complete cds
```

ATGTCTCTTGATTCAAGTTCAGCTGATCATGGTGGGCACAGTAACATTAGAGGAATTCCTCAACTCATGGGG
GTCGTTATGTTTCAAGTATAATGTGCACGGCTCTCTGTTTGAAGTTTCAAGAAAATATGTTCCCTCCTATTAG
ACCTATTGGTCGTGGAGCTAATGGAATGGTTTTGTGCTGCTGTGAACTCAGAGACACGTGAGGAAGTAGCT
ATTAAGAAGATTGGGAATGCATTTGATAATGTAATAGATGCCAAAAGGACATTAAGAGAGATAAAGCTTC
TCAGTCACATGGATCATGAGAATGTGATTGCAATTAAAGATGTTATACGGCCTCCTCAAAAGAAGAATTT
TAATGATGTGTACATTTGTTTATGAACTGATGGACACTGATCTTCATCAGATTATTCATTCAGCCAACAG
CTGACTGATGAACACTGTGACATTTTCTGTACCAAATATTGCGAGGACTTAAGTACATTCACTCTGCCA
ATATCTTGATCGTGATTTAAAAACCCAGCAATTTGCTTGTCAATGCAAAATGTGACTTAAAGATTGGAGA
TTTTGGGCTAGCAAGGACGACAACCTGAGACAGATTTTCATGATGGAATATTGTGTGACACGCTGGTACCGT
GCACCAGAGTTGCTACTAAATTTGTTTCAGAAATATACATCGGCAATTGATATTTGGTCAGTGGGTTGCATAC
TCGGTGAAATATTGACAAGACAACCCCTTTTTCTGCGAGAGATTACGTACACCAGTTGAGACTTATCAC
TGAGCTCATAGGCTCACCAGATGATGCCAGCCTTGGGTTTTCTCCGGAGTAATAATGCCCGGAGATACGTT
AGACAACCTCCAAGGTACCCAAGGCAACAATTTGCTGCTAGATTCCCAAATTCATCTCCTCGAGCTGTAG
ATTTGCTTGAAAAGATGCTCATCTTTGATCCAAGCAGGCGTATTACTGCTGATGAAGCTCTCTGTACCC
ATACTTGGCACCTCTTCATGAAATCAACGAAGAACCTGTTTTGTCCGAGGCCCTTTCAGTTTGGATTTTGAG
CAGCCATCTCTCACTGAAGATAATATCAAGGAGCTCATCTGGAGGGAAGCTGCAAAATTTAATCCTGATC
CAACTCATTGA

>gi|599089092|gb|KJ027595.1| Solanum tuberosum cultivar Rywal MAPK4_2
protein mRNA, complete cds

ATGGAGGCAAGTTTAGGTGATCATGGTGTCCAAAGTAATTTTCAGTGGAGTTCCAACTCATGGGGGTCGTT
ATATGCAGTATAATGTGTATGGTAATCTTTTTGAAGTTTCCAAAAGTATGTTCCCTTAGGCCTGTGGG
TCGTGGAGCTTATGGCATCGTTTGTGCCGCTTTGAAATTCGGAAACACGTGAGGAAATAGCTATCAAGAAG
ATTGGCAATGCATTTGATAATAGAATAGATGCAAAAAGGACTCTACGAGAGATAAAGCTTCTTCGTCACA
TGGGTCATGACAATGTGATTGCCATTAAAGATATTATAAGGCCACCACAAACTGAGAATTTCAATGATGT
CTACATTTATTTATGAACTGATGGACACTGATCTTCATCAGATAATTCGTTCCAACCAACAATTGACTGAT
GATCACTGTCCGATTTTCTTATACCAAATATTACGAGGACTCAAATACATTCACTCTGCCAATGTCCTGC
ATCGTGATCTAAAACCCAGCAATTTGCTTCTCAATGCAAACTGTGACCTAAAAGTTGGAGATTTTGGGCT
TGCAAGGACAACATCTGAAAACAGATTTTCATGACAGAGTATGTTGTAACACGGTGGTATCGTGCACCGGAG
TTGCTCCTAAAATTTGTTTCAGAATACACAGCAGCAATTGATATCTGGTCAGTTGGTTGCATACTGGGTGAGA
TGATGACACGACAGCCTCTCTTTCTGCGAGGATTACGTTCCACCAGTTGAAACTTATCACAGAGCTCAT
AGGATCACCTGATGATGCCAGTCTTGGATTTCTCCGGAGTGATAATGCTCGGAGGTATGTTAGACAGCTC
CCACAGTACCCAAGGCAACAATTTGCTGCTAAATTTCCCAATTCATCTCCTGGAGCTGTTGATTTGCTTG
AAAAAATGCTTGTCTTTGATCCAAGCAGGCGTGTACAGTTGATGAAGCTCTCTGCCACCCCTACTTGGC
ACCTCTTCATGATATCAATGAGGAGCCTGTTTTGTCCCATGCCCTTTCAGTTTTGACTTTGAGCAGCCATCT
TTTACTGAAGAAAATATCAAGGAGCTCATCTGGAGGGAATCTGTGAACTTTAATCCAGATCCAACCTCACT
GA

>gi|599089094|gb|KJ027596.1| Solanum tuberosum cultivar Rywal MAPK6
protein mRNA, complete cds

ATGGATGTTTTCAGCTCCGCAAACGGACACGATGATGCCGGATGTGGCTGCCCTGCGGTTTCAGCAACCAC
CTCCACCACCGCAACCGCTGCCCGGAATGGATAATTTCCGGCGACGTTAAGCCATGGTGGCAGGTTTCAT
TCAATACAACATATTTGGTAATATTTTTGAAGTTACTGCTAAGTATAAACCTCCTATTATGCCTATTGGT
AAAGGTGCTTATGGAATCGTTTGTCTGCTTTGAAATTCGGAGACAAATGAAAATGTAGCAATTAAGAAAA
TTGCTAATGCTTTTGTATAACAAGATTGATGCTAAGAGGACTTTGAGAGAGATCAAGCTTCTTCGACATAT
GGATCATGAAAACATTTGTTGCGATCAGAGATATAATTCACCACCACAAAGAGAAGCCTTTAATGATGTT
TATATTGCGTATGAGCTTATGGATACTGATCTCCATCAAATTTATTCGCTCGAATCAGGGTTTATCTGAGG
AGCACTGCCAGTATTTCTTGTATCAGATCCTCCGTGGGTTGAAATACATACATTCGCAAATGTTTTGCA
CAGAGACTTAAAGCCTAGCAATCTTCTCTTGAATGCCAACTGTGATTTGAAGATATGTGATTTTGGGCTA
GCTCGTGTCACTTCTGAAAACCGACTTTATGACCGAATATGTTGTGACAAGATGGTATCGTCCACCTGAGC
TGTTGTTGAATTCGTCCGACTATACTGCAGCAATGATGTATGGTCAGTGGGTTGCATCTTCATGGAATT

GATGGACAGAAAAACCCTCTTCCCTGGCAGAGATCATGTACACCAGCTGCGTCTTATTATGGAGTTGATT
GGCACTCCTTCAGAGGCTGAAAATGGAGTTTTTAAATGAGAATGCAAAACGCTACATCCGACAACCTCCTC
TTTACCCTCGACAATCATTTACTGAAAAGTTCCCGCATGTAAACCCAGCTGCTATTGATCTTGTGAGAA
AATGTTGACATTTGATCCCAGAAGGAGAATAACAGTTGAAGACGCACTTGCACATCCTTACCTAACATCG
CTTCATGATAGCAGTGACGAGCCCATTTGCATGACTCCTTTTAACTTCGACTTTGAACAACATGCTCTTA
CAGAGGAACAGATGAAGGAGCTGATTTACAGGGAGTCCATTGCATTTAATCCTGAATACCAGCGCATGTG
A

>gi|599089096|gb|KJ027597.1| Solanum tuberosum cultivar Rywal MAPK13
protein mRNA, complete cds

ATGGATGCTGAAAACATTGAAAATTCAGTGGAAATCAAAGGAATTCCAACTCGGGATGGCAAATATGTTG
AGTACAATGTTGTGGGTAACCTCTTTGAAGTTACCTCAAAGTATGTCCCTCCAATTCAACCCGTAGGCCG
TGGAGCTTACGGAATCGTCTGCTGTGCTACGAATTCGGAGACGAAGGAGGAGATAGCCATCAAAAAAATT
GGGAGTGCATTTGAAAATAGAATTGATGCAAAGAGGACTCTCCGCGAGATCAAACCTCTTTCTCACATGG
ATCATGAAAATGTCATCAAAAATAAAAAGATATAGTAAGACCACCAGACAGAGAGGAATTCAATGATGTGTA
TATTGTGTATGAGCTAATGGATACTGATCTGCATCAGATAATACGCTCTTCACAGGCCCTCACAGAAGAT
CATTGTCAATACTTTCTCTATCAATTATTACGTGGACTCAAGTACGTACATTCTGCTAATGTTCTTCACC
GGGATCTGAAACCTAGCAACTTGCTACTCAATGCAAACCTGTGACCTCAAGATCTGTGATTTTGGGCTTGC
TAGAACCCTTCAGAGGCAGATTTTCATGACAGAGTATGTTGTTACTCGATGGTATAGGGCACCCGAGTTA
CTACTTAATTGTACTGAATATACTTCAGCAATTGATATATGGTCAGTTGGTTGCATTTTGATGGAACCTCA
TTAAGAGAGAGCCTCTTTTCCCCGGCAGAGACTATGCTCAGCAATTGGGGCTTATCATTAAGTTATTAGG
TTCACCCGGAGGAGTCTGATCTTGGATTCCCTAAGGAGTGACAATGCTAGGAAGTACGTCAAGCAGCTGCCT
CAAGTTCCAAAGCAACCATTCTCCGAGCATTTCCAGATGTGTCTCCTTTAGCTCTTGATCTTGCAGAAA
AGATGTTGGTTTTTCGACCAGCTAAACGCATAACTGTTGAGGATGCATTGAATCATCCATTCATGATAAG
TCTCCATGAGATAAATGAGGAACCAGTTTGCCTTCTCCTTTCAATTTGACTTTGAACAAGCATCTCTA
AGCGAGGAAGACATTAAGGAGCTCATATGGAACGAGGCTCTTAAGTTTGATCCCGATACAACCAAGTGA

>MKP1

ATGTTGGAGGTAGATGAGAAGGATAGGGTACCAGCTGGTGGGAATCGGAAAACATATGCACGGTCTATTT
CGTGGTCCGATAGGTCCCTTACCAAGTCCAGTGCCAAACCACAATGGAACAGCAAAGCACGGGCTTGTTT
GCCACCCCTTCAGCCTCTTTCCATTACTAGACCAACTGCTGAGGAGTGGCCTAGGGCTGGATCAGATGAT
CTTGGTGTATGGCCTAATCCCTCTACTCCTGGTGTAAGGCTTGGATCATTACAGCACTCATGAAGGTTAG
CTACTAAGCAGGCTCCGCGAGAATTTGAATTCAGAAAAGATAAGCTTGCTTTCTTCAATAAGGAATGTTT
TAAGATTGTGGATCACATCTATTTAGGAAGTGACACTGTGGCAAAGAATCGAGACATTCTCCGTGAGAAC
GGCATCACTCATGTCTTAAACTGTGTAGGGTTTAGTTGTCTGAACTTTAAGGATGATCTTGTATACA
AGACACTTTGGCTGCAGGATAGCCCCACTGAGGACATCACAAGTATTCTTTATGATGTCTTTGATTATTT
TGAAGATGTTGTTGAAACAAGGTGGGAGAGTCTTTGTACACTGCTTCCAAGGGGTGTCCCGATCAGCCTCC
TTGGTTATTGCATATCTTATGTGGAAGAGGGGATGAGCTTTGAAGATGCATTCCAGCATGTCAAAGCTG
CAAGAGGAGTGACAAAACCGAATATGGGTTTTGCTTGCCAATTGTTGCAGTGCCAGAAACGAGTGCATGC
TCAACCTGTAAGTCTACTTCTGTGCTAAGGATGTACAGGATGGCACCTCACTCCCCATATGATCCCCTT
CATTTGGTGCCAAAAGATGCTGAGTGAGCCAGGAGCTGAAGGACTCGATTCTCGTGGAGCCTTCCTTGTTT
TTATTCCTTCTGTTATATACGTGTGGATAGGGAAGCATTGTACCTCGGTAATGTCAGATAATGCCAGGGC
TGCAGCCTTTCAGGTAATCCGCTATGAAAAGGCCAAGGTCCTGTTTTAATTATCAATGAAGGCAAAGAG
CCTTCTGATTTTTGGAGTGTCTTAGCCAGGAAAGCTTCTTTTCTGGTGGTTGTGGTAAAGAAAAGACCA
AGGTGGACGCCCTTATTAGCTGAAAATGACTTGATTACTGATGATATCAGCCAGTGTATTGGTCAAAA
GAATGAATATGATCTTGATTTTTGAAAATTTTCTGCAAAGCACTCGCCGGCGGGGTTGTTCCACCTTTTCCA
TTGTCAGGTAATCTGAGACATGTCTTCCCAGCAAGGCAGAAATGGATGGAGTAGATTGAGACGGAAAT
TTTCCAGTGGAAATAATGAAAGAATTTATCACAGCTTCCAAGTTATACAGTCATACTGGCATAACAAGTCC
TGTACTTGATAAGATGGACACAATTAAGAAGTCTCTCCTGCTTTGCCCTTCATCACCTTCAAGTCCCTCAG
TGTGGATCACCAGATTTCTTCTCTTCTTATGCAACCCGAGTCCAAGTTGGACAAAGGATCCTTGTAGAG
ATGTGGAAAACCTGGTCTTGATACAGAACCCTGCGCTATCGCCATCTCCTTCATTTAGCTCACTTGATTC
TCTCTCTTGTTTTTCTTGTAGTAAACCAAGTCTAATACCACATCCCCCTCACTCTCACCTTCAACCTCA

GATTACTCCAGTTCTTTACCTTTTCTCCCTCCTCTTCCAATTGGTCTGACTTGGCATAACCTATCTGCAC
AGCCTTCACCCACGAGATTTGAACATGAGGATCCTAATTTTGCGAAGAATGATTTCTCAAAGTAAGTTC
ATCTTTACTTTGTAAAGGATCACCCCTTTCCAGCAGCAGAGGAAGCATTTCACACCAGTCGTGCTCTTAGA
CGGGCAAACAGTTGTTTACAGTACAAAGAACTTCCCCTTCACTAGCAGAGCGTAGAGGCAGTCATCCTC
CTCCTATGATGAAGTTACGTTCCAATGATGATTCCGCTCAAATTTCACTGAAATTTGGTGAGAACATCATC
ATTTTCTCTCCTAATTTTGAAGACGATACAATGAAGTGTGTCGAGTGTAACAGCCTTAATGACGGAGAT
TTTGTGATAGTAGTAAAGAGGAGCTAATGTTAGATGCTGAGAATTCGATTACTGACAATCAACTCCAAA
ATGGAGTTCAACCTGTAGATGATGTATCTGGCAGTTTCAATGACCATCCAATTGGCATTTCCATCCGAGT
CGCAGAAACAACCTGATATAGGTCTTTATCAATGGCCTTCTATGCATAAATTAGGCTTGTCTTCTGTGGTT
TTCGATTCAAGGTCCGTTTATATCATAGTCATTCCTGACTTGAGTTTAGATGAAAATAGTTCCAGTAGTT
TGTACATCTGGATTGGGCGTGATGTGCAATGGAAGGAAAGTTCAGATCAAGTGATCAACAATGATTCCAT
GTGTGAAGATAATCATGTCCATTGGGAGAAAGTTGGACTCGGTTTTCTTATTCAGAAGGGCCTGGCCACT
AGCTCTCTAGTTCAGATAGTAAAAGAAGGTGAGGAACCTGAGCAGCTTCTTAAGCATCTGCCGTGTTTCT
CATTTGATAAGGCATTAGATGTTGGGGTCAAG

Priloga B: Sekvenci promotorja gena *StMKK6*, izoliranega iz krompirja sorte Rywal in Santé.

Appendix B: Sequences of *StMKK6* promotor, isolated from potato cv. Rywal and Santé.

>gi|571331417|gb|KF837129.1| Solanum tuberosum cultivar Sante mitogen-activated protein kinase kinase 6 (MKK6) gene, promoter region
CGACGGCCCGGGCTGGTAAATAATAAAAAAGAATAAAGGATCACTGATTGCTTTGTTTTATTCAATTTTC
AAAAATAAAAAATAAAAAATGTGTAGGCTAAACATTCAAACCTGTCAGTAATAGAAATAGAATATAATTTTGT
TGGTATTTGTCTGAGTTTGAAAATCAGTGGGTATTTTGGGCGGTTTCGTTTCACTTTTCAAATCTAAAAT
CTCCACTTCCCCTTTCAAACCTAGTGGATCAAAAT

>gi|571331416|gb|KF837128.1| Solanum tuberosum cultivar Rywal mitogen-activated protein kinase kinase 6 (MKK6) gene, promoter region
TGTCTTCGAATGGCTCCAACCAAATGCATTTCAAGTTTACAATGAAAGATCAGCTGGGAGAATAGTCATG
CTGTTTAGGCTAGCACTGTTGTTTGGCTTTTCCTTTTGTGTTGTTTCGTAAAGATTTGGTAATTGCTAGCA
CTGTTGTTTGGCTTTTCAACCAATTGCTTTATATTTGTAAAGATTTGGTAGCTGGAATTTGATTTCAAGC
CATCTCTACTTGAAACTCAACACGCTTTGGTTTAAATCCAACATTTGGGCTGGTCGGATAGAATATCAT
GGGTGAACGGGTTATAGTATTTTCGTGCAATTCAACTATTTTCATTAGTATTTGCTACATGCATCAATATA
AACATGGAATAACTCTTCCCTTCGAAAACTAGACATCCAAATGAAAAGAAATCACCTCATTTTTTATCGGA
AAATTTCACTATATTAGGAGTAACAATTAGGTAACATATGTATGTTCAAGCATTTAGGTGACATATATTT
ATCCCGTTGAGAAGAAAACACAATATATATAAGAAATTTTATATAGGCAAATCTTTTTACAAAGGTAGAA
TCCATCTCAACGTTATTTCTTTTTTTTTTTTTAAAAAAGAGAGGATAAAAATAGGGGTATAATTGGT
TAATTTTAATAGTTGAAAAGATATTTTAACTTTTCGTTTAAATAATAAAAAAGAATAAAGGATCACTGATT
GCTTTGTTTTTATTCAATTTTCAAATAAAAAATAAAAAATGTGTAGGCTAAACATTCAAACCTGTCAGTAA
TAGAAATAGAATATAATTTTGTGTTGTTATTTGTCTGAGTTTGAAAATCAGTGGGTATTTTGGGCGGTTTCG
TTCCTTTTCAAATCTAAAATCTCCACTTCCCCTTTCAAACCTAGTGGATCAAAAT