

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Maja JAMNIK

**VPLIV KROMPIRJEVEGA VIRUSA Y NA
RAZLIČNE DIVJE SORODNIKE KROMPIRJA**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja Molekulska biologija

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Maja JAMNIK

**VPLIV KROMPIRJEVEGA VIRUSA Y NA RAZLIČNE DIVJE
SORODNIKE KROMPIRJA**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja Molekulska biologija

**THE EFFECT OF POTATO VIRUS Y ON DIFFERENT WILD
RELATIVES OF POTATO**

M. Sc. Thesis
Master study Programmes – Molecular biology

Ljubljana, 2013

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študija Molekulska biologija. Raziskovalno delo je bilo opravljeno na Oddelku za biotehnologijo in sistemsko biologijo na Nacionalnem inštitutu za biologijo v Ljubljani.

Po sklepu komisije za študij 1. in 2. stopnje je bila 3. 2. 2012 za mentorico magistrskega dela imenovana prof. dr. Jana Žel, za recenzentko doc. dr. Jasna Dolenc Koce in za predsednico prof. dr. Marjana Regvar. Na seji senata dne 18. 5. 2012 je bil za somentorja magistrskega dela imenovan dr. David Dobnik.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Marjana REGVAR

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Jana ŽEL

Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo

Član: dr. David DOBNIK

Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo

Članica: doc. dr. Jasna DOLENC KOCE

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 27.9.2013

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

Maja Jamnik

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du2
DK	635.21:581.2(043.2)=163.6
KG	krompirjev virus Y/divji sorodniki krompirja/VIGS/agroinfiltracija/qPCR
AV	JAMNIK, Maja
SA	ŽEL, Jana (mentorica) / DOBNIK, David (somentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI	2013
IN	VPLIV KROMPIRJEVEGA VIRUSA Y NA RAZLIČNE DIVJE SORODNIKE KROMPIRJA
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja)
OP	XI, 72 str., 13 pregl., 28 sl., 3 pril., 51 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Krompirjev virus Y (PVY) povzroča škodo na mnogih kultivarjih krompirja (<i>Solanum tuberosum</i>), ki se na okužbo različno odzivajo. Želeli smo ugotoviti odziv 15 različnih divjih sorodnikov krompirja na okužbo z virusom PVY ^{NTN} ter spremljati širjenje virusa PVY ^N , označenega z zelenim fluorescenčnim proteinom (PVY ^N -GFP). Morfološke razlike med kontrolnimi in okuženimi rastlinami smo opazili le pri rastlinah vrst <i>S. lesteri</i> in <i>S. bulbocastanum</i> , pri katerih so se na listih pojavile kloroze. Rezultati verižne reakcije s polimerazo v realnem času (qPCR) so potrdili prisotnost virusne RNA v vseh vzorcih razen pri vrsti <i>S. bulbocastanum</i> . Zanimal nas je tudi vpliv predhodne agroinfiltracije divjih sorodnikov krompirja z virusnim vektorjem TRV, ki se ga lahko uporabi za utišanje genov, na kasnejše širjenje virusa PVY ^{NTN} . Ugotovili smo, da prisotnost TRV vpliva na prisotnost virusa PVY ^{NTN} , ker pri predstavnikih vrst <i>S. hjertingii</i> in <i>S. mochiquense</i> niso bile uspešno okužene vse rastline, pri vrstah <i>S. lesteri</i> in <i>S. bulbocastanum</i> pa ni bilo razlik med okuženimi in neokuženimi rastlinami. S konfokalno mikroskopijo smo pokazali, da se je virus sistemsko razširil v rastlinah divjega sorodnika krompirja <i>S. venturii</i> 366-2 in 283-1, kar pomeni, da se je uspešno razmnožil in prešel v zgornje neinokulirane liste. Testirali smo delovanje metode z virusom posredovanega utišanja genov (VIGS) na izbranih sortah vrste <i>S. tuberosum</i> in opazili, da se je pričakovani beli fenotip zaradi utišanja gena za fitoen desaturazo razvil le pri kontrolnih rastlinah tobaka <i>Nicotiana benthamiana</i> in krompirja <i>Solanum venturii</i> 896-4.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Du2
DC 635.21:581.2(043.2)=163.6
CX potato virus Y/wild potato relatives/VIGS/agroinfiltration/qPCR
AU JAMNIK, Maja
AA ŽEL, Jana (supervisor)/DOBNIK, David (co-advisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Department of Biology
PY 2013
TI THE EFFECT OF POTATO VIRUS Y ON DIFFERENT WILD
RELATIVES OF POTATO
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)
NO XI, 72 p., 13 tab., 28 fig., 3 ann., 51 ref.
LA sl
AL sl/en
AB The potato virus Y (PVY) causes damage to a lot of different potato (*Solanum tuberosum*) cultivars which in turn react very differently to the infection. In this study we investigated the response of 15 different wild relatives of potato to PVY^{NTN} infection and monitored the spread of PVY^N labeled with green fluorescence protein (PVY^N-GFP). The only morphological differences between inoculated and control plants were present in *S. lesteri* and *S. bulbocastanum* which showed signs of chlorosis. The results of the real time polymerase chain reaction (qPCR) confirmed the presence of viral RNA in all samples except in *S. bulbocastanum*. We also wanted to determine the effect of agroinfiltration with TRV vector, with potential use for gene silencing, on the spread of PVY^{NTN}. We have determined that the presence of TRV vector does affect the reproduction and spreading of PVY^{NTN}. Not all test plants of *S. hjertingii* and *S. mochiquense* were infected and there were no statistical differences between infected and control plants of *S. lesteri* and *S. bulbocastanum*. Confocal microscopy showed that the virus spread systemically in *S. venturii* 366-2 and 283-1, which means that it was able to successfully reproduce and spread into upper uninfected leaves. We have also tested the virus induced gene silencing (VIGS) method on selected representatives of potato *S. tuberosum*. The white phenotype which we expected as a result of phytoen desaturase gene silencing was only present in the control plants of *Nicotiana benthamiana* and *S. venturii* 896-4.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VII
KAZALO PREGLEDNIC	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 KROMPIR	2
2.2 IZVOR KROMPIRJA IN NJEGOVI DIVJI SORODNIKI	3
2.3 KROMPIRJEV VIRUS Y	4
2.3.1 Družina <i>Potyviridae</i>	5
2.3.2 Različki virusa	6
2.3.3 Razširjenost PVY	6
2.3.4 Različek PVY ^{NTN}	6
2.3.5 Prenos virusa med rastlinami	8
2.3.6 Odziv rastlin na virusno okužbo	8
2.4 Z VIRUSOM POSREDOVANO UTIŠANJE GENOV (VIGS)	8
2.4.1 Prednosti in slabosti metode VIGS	10
2.4.2 RNA interferenca (RNAi)	11
2.4.3 Fitoen desaturaza (PDS)	12
2.4.4 Vektorji za utišanje genov	15
2.5 NAMEN DELA	17
2.6 HIPOTEZE	17
3 MATERIALI IN METODE	18
3.1 RASTLINSKI MATERIAL	18
3.1.1 Tkivne kulture	19
3.1.2 Razmnoževanje rastlinskega materiala	19
3.1.3 Sajenje	20
3.2 BAKTERIJSKI MATERIAL	20
3.3 VIRUSNI MATERIAL	20
3.4 SEZNAM UPORABLJENIH KEMIKALIJ IN NAPRAV	20
3.6 UPORABLJENA GOJIŠČA	22
3.7 VIRUSNA INOKULACIJA	24
3.8 POBIRANJE RASTLINSKEGA MATERIALA	25
3.9 HOMOGENIZACIJA	25

3.10 IZOLACIJA RNA	26
3.11 MERJENJE KONCENTRACIJE IN ČISTOSTI RNA.....	26
3.12 GELSKA ELEKTROFOREZA.....	27
3.13 DNAZNA REAKCIJA	27
3.14 OBRATNA TRANSKRIPCIJA	28
3.15 PCR V REALNEM ČASU.....	29
3.16 ISTOČASNA AGROINFILTRACIJA S pTRV1 in pTRV2 IN INOKULACIJA S PVY ^{ntn}	30
3.17 KONFOKALNA MIKROSKOPIJA	30
3.18 AGROINFILTRACIJA	31
3.19 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV	33
3.20 SHEMA DELA	33
4 REZULTATI	35
4.1 TESTIRANJE DIVJIH SORODNIKOV KROMPIRJA NA OKUŽBO S PVY ^{NTN}	35
4.1.1 Izolacija RNA in gelska elektroforeza	43
4.1.2 Prisotnost virusa PVY^{NTN} v divjih sorodnikih krompirja merjena s qPCR	44
4.2 REZULTATI ISTOČASNE AGROINFILTRACIJE IN INOKULACIJE S PVY ^{NTN} ..	46
4.3 SLEDENJE VIRUSNE OKUŽBE DIVJIH SORODNIKOV KROMPIRJA S PVY ^N - GFP IN KONFOKALNO MIKROSKOPIJO	47
4.4 REZULTATI METODE VIGS	54
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	59
5.1 RAZPRAVA.....	59
5.2 SKLEPI.....	63
6 POVZETEK	65
7 VIRI	67

KAZALO SLIK

Slika 1: Število vrst divjega krompirja na posameznem območju velikosti 50x50 km (Hijmans in Spooner, 2001).....	4
Slika 2: Obročasta nekroza gomolja pri krompirju, okuženem z virusom PVY ^{NTN} (Jones in sod., 2003).....	7
Slika 3: Mehanizem VIGS.....	10
Slika 4: Struktura beta karotena, ki je predstavnik karotenoidov z molekulsko formulo C ₄₀ H ₅₆ (PubChem, 2013).	13
Slika 5: Biosintezna pot karotenoidov. PDS igra ključno vlogo v pretvorbi fitoena v zeta karoten (Liang in sod., 2006).	14
Slika 6: Simptomi utišanja <i>pds</i> gena.	14
Slika 7: Organizacija vektorja TRV.	16
Slika 8: Shema dela.	34
Slika 9: Fotografije rastlin MOCK in s PVY ^{NTN} inokuliranih rastlin <i>S. bulbocastanum</i> in <i>S. hjertingii</i>	36
Slika 10: Fotografije rastlin MOCK in s PVY ^{NTN} inokuliranih rastlin <i>S. jamesii</i> in <i>S. lesteri</i>	37
Slika 11: Fotografije rastlin MOCK in s PVY ^{NTN} inokuliranih rastlin <i>S. mochiquense</i> in <i>S. okade</i>	38
Slika 12: Fotografije rastlin MOCK in s PVY ^{NTN} inokuliranih rastlin <i>S. papita</i> in <i>S. polytrichon</i>	39
Slika 13: Fotografije rastlin MOCK in s PVY ^{NTN} inokuliranih rastlin <i>S. sp.</i> in <i>S. venturii</i> 250-2.	40
Slika 14: Fotografije rastlin MOCK in s PVY ^{NTN} inokuliranih rastlin <i>S. venturii</i> 283-1 in <i>S. venturii</i> 365-1.....	41
Slika 15: Fotografije rastlin MOCK in s PVY ^{NTN} inokuliranih rastlin <i>S. venturii</i> 366-2 in <i>S. venturii</i> 741-1.....	42
Slika 16: Fotografije rastlin MOCK in s PVY ^{NTN} inokuliranih rastlin <i>S. venturii</i> 896-4....	43
Slika 17: Gelska elektroforeza.....	44

Slika 18: Vsebnost PVY v neokuženih (MOCK) rastlinah in okuženih s PVY, izmerjena s qPCR.....	45
Slika 19: Vsebnost PVY v neokuženih (MOCK) in okuženih PVY rastlinah, ki smo jih predhodno agroinfilirali z virusnim vektorjem TRV.....	46
Slika 20: Primerki listov za analizo s konfokalnim mikroskopom.....	48
Slika 21: Prisotnost virusa PVY v listih divjih sorodnikov krompirja <i>S. venturii</i> 283-1 in <i>S. venturii</i> 366-2, slikanih s konfokalnim mikroskopom.....	50
Slika 22: Prisotnost virusa PVY v listih divjih sorodnikov krompirja <i>S. venturii</i> 365-1 in <i>S. mochiquense</i> , slikanih s konfokalnim mikroskopom.....	51
Slika 23: Prisotnost virusa PVY v listih divjih sorodnikov krompirja <i>S. papita</i> in <i>S. jamesii</i> , slikanih s konfokalnim mikroskopom.....	52
Slika 24: Prisotnost virusa PVY v listih divjih sorodnikov krompirja <i>S. hjertingii</i> in žilnih prerezih, slikanih s konfokalnim mikroskopom.....	53
Slika 25: Morfološki znaki kontrolnih in agroinfiliranih rastlin <i>N. benthamiana</i> , Désirée in Désirée NahG D2	55
Slika 26: Morfološki znaki kontrolnih in agroinfiliranih rastlin Désirée J3, Igor in PW363.....	56
Slika 27: Morfološki znaki kontrolnih in agroinfiliranih rastlin Rywal, Rywal NahG 16 in Sante.....	57
Slika 28: Kontrolni in agroinfilirani divji sorodnik krompirja <i>S. venturii</i> 896-4.....	58

KAZALO PREGLEDNIC

Tabela 1: Divji sorodniki krompirja.	18
Tabela 2: Sorte <i>Solanum tuberosum</i> L.	19
Tabela 3: Seznam uporabljenih kemikalij.	21
Tabela 4: Seznam uporabljenih naprav.	21
Tabela 5: Sestava gojišča MS30.	22
Tabela 6: Sestava gojišča LB-tekoče.	23
Tabela 7: Sestava gojišča YEB.	23
Tabela 8: Sestava infiltracijskega pufra MMA.	24
Tabela 9: Sestava fosfatnega pufra.	25
Tabela 10: Sestava reakcijske mešanice za DNazno reakcijo.	28
Tabela 11: Sestava reakcijske mešanice za obratno transkripcijo.	28
Tabela 12: Program segrevanja in ohlajanja za obratno transkripcijo.	28
Tabela 13: Sestava reakcijske mešanice za qPCR.	29

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AGO	argonavtni protein
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
BP	brez posebnosti
cDNA	komplementarna DNA
<i>cox</i>	gen, ki sintetizira citokromoksidazo
ddH ₂ O	bidestilirana voda
DNA	deoksiribonukleinska kislina
DNaza	deribonukleaza
dNTP	deoksiribonukleotid trifosfat
dsRNA	dvoverižna RNA
ssRNA	enoverižna RNA
EDTA	etilendiamin tetraacetat
EtBr	etidijev bromid
EtOH	etanol
GFP	zeleni fluorescenčni protein (angl. "green fluorescent protein")
LB	gojišče Luria Broth
MES	morfolinoetansulfonična kislina (angl. "2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid")
MMA	infiltracijski pufer
mRNA	informacijska ribonukleinska kislina
MS 30	prirejeno gojišče Murashige in Skoog
<i>N. benthamiana</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i>
nm	nanometer
NTC	kontrolni vzorec brez matrične DNA (angl. "No Template Control")
OD	optična gostota
<i>pds</i>	gen, ki sintetizira fitoen desaturazo
pH	negativni logaritem koncentracije vodikovih ionov
PTGS	posttranskripcijsko utišanje genov (angl. "posttranscriptional gene silencing")
PVP	polivinilpirolidon
PVY	krompirjev virus Y (angl. "Potato virus Y")
PVY ^{NTN}	krompirjev virus Y, nekrotična različica NTN
qPCR	verižna reakcija s polimerazo v realnem času
RISC	z RNA induciran kompleks za utišanje genov (angl. "RNA Induced Silencing Complex")
RNA	ribonukleinska kislina
RNAi	RNA interferenca
RNaza	ribonukleaza
rpm	število obratov na minuto (angl. "revolutions per minute")

TAE pufer	tris acetatni pufer
TRV	virus tobačnega mozaika (angl. "Tobacco Rattle Virus")
VIGS	z virusom posredovano utišanje genov (angl. "Virus Induced Gene Silencing")
YEB	gojišče s kvasnim ekstraktom (angl. "Yeast Extract Broth")

1 UVOD

Krompir je po količini pridelka četrto najpomembnejše živilo na svetu, takoj za koruzo, pšenico in rižem. Čeprav se je njegova uporaba v Evropi nekoliko zmanjšala, se je na račun preostalega sveta proizvodnja v zadnjih dvajsetih letih skoraj podvojila. Njegovo pomembno vlogo v prehranjevanju naraščajočega števila svetovnega prebivalstva je prepoznala tudi Organizacija združenih narodov za prehrano in kmetijstvo, ki je leto 2008 razglasila za mednarodno leto krompirja (Food and agriculture organisation, 2008).

Prednosti, ki jih ima krompir pred ostalimi pridelki, so predvsem hitra rast, prilagodljivost, visok doprinos in relativno nizki stroški pridelave. Gomolji vsebujejo veliko ogljikovih hidratov, ki predstavljajo dober vir energije, dovolj beljakovin (2,1% sveže mase), in vlaknin. Bogati so tudi z vitamini in minerali (Full Report..., 2013).

Slabost pridelave krompirja je njegova dovzetnost za najrazličnejše škodljivce, bakterijske in virusne okužbe. Med virusnimi okužbami je gospodarsko najbolj pomembna okužba s krompirjevim virusom Y (PVY), ki povzroča do 40% izgube pridelka (Food and agriculture organisation, 2008). Virus ima več različkov, v magistrski nalogi pa smo se osredotočili na proučevanje različka PVY^{NTN}, ki povzroča obročkasto nekrozo gomoljev in s tem prizadene pridelek po količini in kakovosti.

Različni kultivarji krompirja se na virusne okužbe različno odzivajo, ker so nanje različno občutljivi. Kljub številnim znanstvenim raziskavam pa mehanizmi odpornosti še niso povsem poznani. Pomemben nov vir genov, ki posredujejo odpornost, predstavljajo divji sorodniki krompirja.

2 PREGLED OBJAV

2.1 KROMPIR

Krompir (*Solanum tuberosum* L.) je zelnata trajnica z užitnimi gomolji, belim ali lila cvetnim vencem in zelenimi plodovi. Domovina izvora krompirja, ki je danes kultiviran in prehodno podivjan, je Južna Amerika. Krompir spada v družino razhudnikovk (*Solanaceae*). To so zelišča ali grmi z enostavnimi listi, ki so lahko celi ali deljeni. Cvetovi razhudnikovk so dvospolni, s petimi venčnimi in čašnimi listi. Plodovi so mnogosemenske glavice ali jagode (Martinčič in sod., 2007). Cvetove razhudnikovk oprahujejo žuželke. Družina je razširjena po vsem svetu in združuje približno 2300 vrst. Mnoge izmed njih vsebujejo alkaloidne in so posledično strupene, npr. volčja češnja in zobnik. Gospodarsko najpomembnejše razhudnikovke so krompir, paprika, paradižnik, jajčevci in tobak (Strgar, 2007).

V luči nezadržne rasti svetovnega prebivalstva je ključnega pomena najti globalno rešitev, ki bo uspela zagotoviti dovolj hrane za vse, brez negativnih vplivov na okolje. Pri tem igra pomembno vlogo krompir. Gre za resnično globalno kulturno rastlino, ki uspeva praktično povsod. Predstavlja primarni vir energije mnogih prebivalcev držav v razvoju ter hiter in velik doprinos glede na potrebno rastno površino (The international year of the potato, 2013).

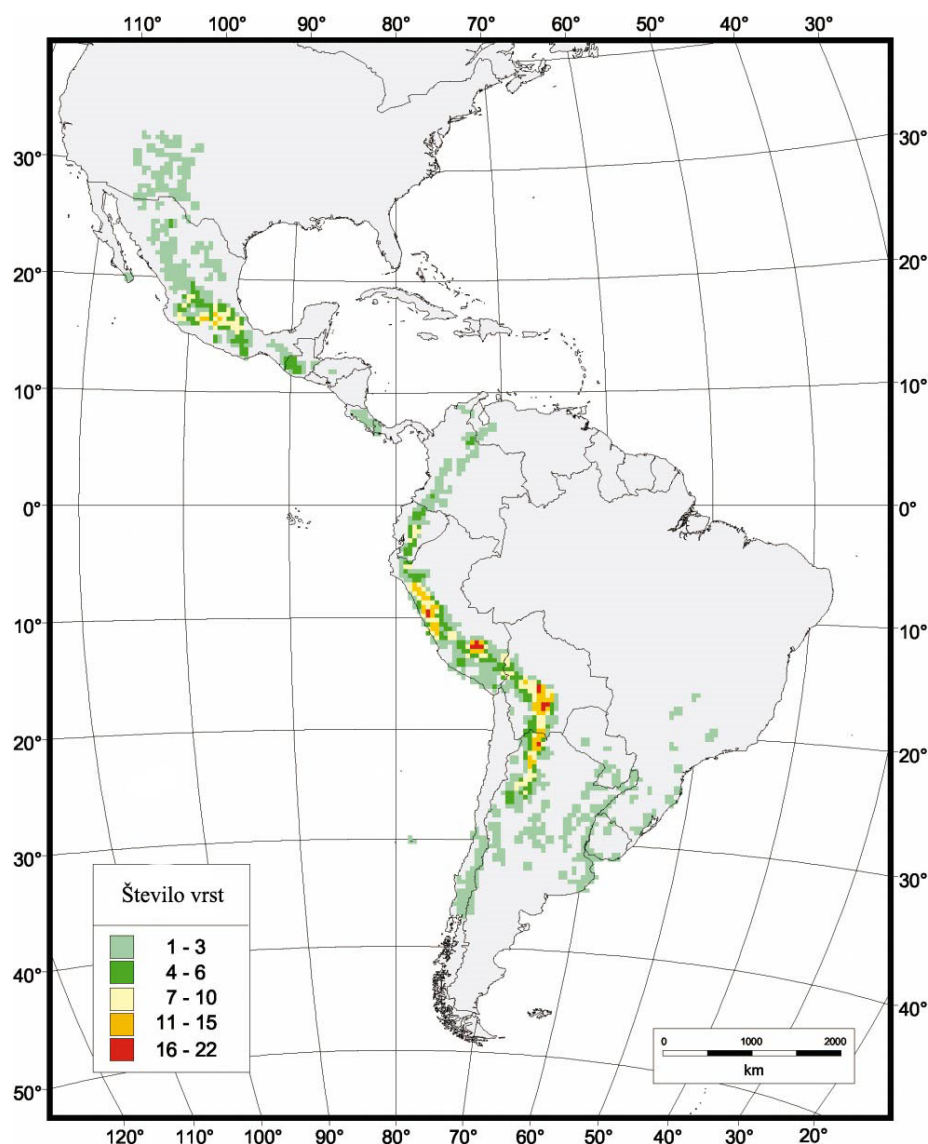
Vzgoja novih sort krompirja z žlahtnjenjem ima v Sloveniji dolgoletno tradicijo. S prvimi križanji so raziskovalci pričeli že leta 1947 in od takrat vzgojili mnogo uspešnih in poznanih sort, npr. krompir Igor, ki je bil 20 let nosilna slovenska sorta krompirja (Žlahtnenje slovenskih sort krompirja, 2013).

2.2 IZVOR KROMPIRJA IN NJEGOVI DIVJI SORODNIKI

Kultivacija divjih vrst krompirja naj bi segala 8000 let nazaj v bližino visoko ležečega jezera Titikaka (International year of the potato, 2013). Divji sorodniki krompirja so prisotni v 16 državah po svetu, kar 88 % vseh najdemo v Argentini, Peruju, Boliviji in Mehiki (Slika 1). Največ redkih in skupno 47 % vseh vrst se nahaja v Peruju (Hijmans in Spooner, 2001). Gomolji divjih predstavnikov so manjši od gojenih, različnih oblik in barv (International potato center, 2013).

Večina divjih sorodnikov krompirja je zelo ozkih endemitov. Le 39 se jih pojavi v dveh ali več različnih državah. Najbolj pogosti so v tropskih visokogorjih na nadmorskih višinah med 2000 in 4000 m, povprečna nadmorska višina vseh vrst je 2770 m. Najpogosteje jih najdemo med zemljepisnima širinama 38°S in 41°J (Hijmans in Spooner, 2001).

V preteklosti je bilo v genetsko odpornost vrst usmerjeno manj pozornosti, ker je bila v ospredju predvsem kemijska zaščita rastlin. Ta je bila cenovno ugodna in visoko učinkovita v zatiranju škodljivcev. Danes so ti razvili odpornosti na najrazličnejša škropiva, ljudje pa smo se začeli zavedati škodljivega vpliva pesticidov na naše zdravje in okolje. Tako pot do zdravega in obilnega pridelka iščemo v naravni odpornosti divjih rastlinskih vrst (Spooner in Bamberg, 1994).



Slika 1: Število vrst divjega krompirja na posameznem območju velikosti 50x50 km (Hijmans in Spooner, 2001).

2.3 KROMPIRJEV VIRUS Y

Krompirjev virus Y (PVY) spada v družino *Potyviriidae* (Shukla in Ward, 1994) in rod *Potyvirus* (Hollings in Brunt, 1981), je helikalne oblike in meri 730 nm v dolžino in 11 nm v širino. Razširjen je po celem svetu in z okužbo kulturnih rastlin povzroča veliko ekonomsko škodo (Delgado-Sanches in Grogan, 1970). Genom virusa predstavlja ena molekula enoverižne, linearne, pozitivno orientirane RNA (Bokx in Huttinga, 1981).

2.3.1 Družina *Potyviridae*

Družina *Potyviridae* je največja med trenutno 34 prepoznanimi družinami rastlinskih virusov in združuje okoli 25 % vseh poznanih virusov, ki okužujejo rastline (Ward in Shukla, 1991). Deli se na rodove z monopartitnimi genomi (*Potyvirus*, *Macluravirus*, *Ipomovirus*, *Tritimovirus*, *Rymovirus*), ki v dolžino merijo od 650 do 950 nm, in bipartitnim genomom (*Bymovirus*), ki meri 200 do 300 nm in 500 do 600 nm. Virusne delce sestavlja plaščni protein in enoverižna, pozitivno orientirana RNA (Shukla in sod., 1998), ki je sama infektivna (Le Mercier in sod., 2013). Rodove z monopartitnim genomom prenašajo uši, pršice in ščitkarji, bipartitne pa gliva *Polymyxa graminis*. Razen pri nekaterih predstavnikih rodu *Bymovirus* se lahko okužba širi tudi preko inokulacije z rastlinskim sokom.

Večina predstavnikov družine *Potyviridae* ima zelo ozek izbor gostiteljev, a kljub temu okužujejo mnogo ekonomsko pomembnih rastlinskih vrst. Nekateri ne povzročajo bolezenskih znakov in okužbe na pogled ni mogoče opaziti, drugi pa lahko zakrivijo občutne izgube pridelka (Shukla in sod., 1998). V krompirju se virusi hitro širijo, od mesta okužbe do gomolja potrebujejo običajno samo 10 do 14 dni (Kus, 1994).

Razmnoževanje poteka v citoplazmi gostitelja. Najprej poteče okužba rastline, sledi odstranitev plaščnega proteina, translacija, procesiranje nastalega poliproteina, podvajanje genoma, sestavljanje virusnega delca in prenos med celicami gostitelja. Razmnoževalni krog se zaključi z vektorskim prenosom virusa v zdravo rastlino (Shukla in sod., 1998).

Rod *Potyvirus* je razširjen po celem svetu, predvsem v tropskih in subtropskih območjih (Hollings in Brunt, 1981), *Rymovirus* se pojavlja v Severni Ameriki in Evropi, *Bymovirus* in *Tritimovirus* v Severni Ameriki, Evropi in na Japonskem, predstavnike rodu *Ipamovirus* najdemo le v vzhodni Afriki, *Macluravirus* pa v Evropi, Severni Ameriki in Avstraliji (Shukla in sod., 1998).

2.3.2 Različki virusa

Krompirjev virus Y ločimo na pet različkov glede na bolezenska znamenja, ki jih povzročajo pri okuženih rastlinah: Y^N , Y^O , Y^C , Y^Z in Y^E (Kerlan in sod., 2011).

Različek Y^N povzroča obročkasto nekrozo na okuženih listih, a so znaki v prvem letu okužbe zelo blagi. Sekundarna okužba, ki se pojavi v naslednjem letu, je mnogo hujša in opaznejša.

Različek Y^O povzroča nekrozo, rumenenje in odpadanje listov, redkeje nekrozo stebel. Sekundarna okužba povzroči pritlikavost rastlin. Znaki so nekoliko odvisni od kultivarja, ki ga virus okuži.

Različek Y^C povzroča nekrozo listov in stebel, pegavost in gubanje listov. Nekroza se lahko pojavi tudi na gomoljih (Bokx in Huttinga, 1981).

Različka Y^Z in Y^E sta bila karakterizirana najkasneje. Njuna geografska razširjenost, pomen in pogostost pojavljanja še niso opisani in pogosto sta različka ob naštevanju oblik virusa PVY v novejših objavah celo izpuščena (Kerlan in sod., 2011).

2.3.3 Razširjenost PVY

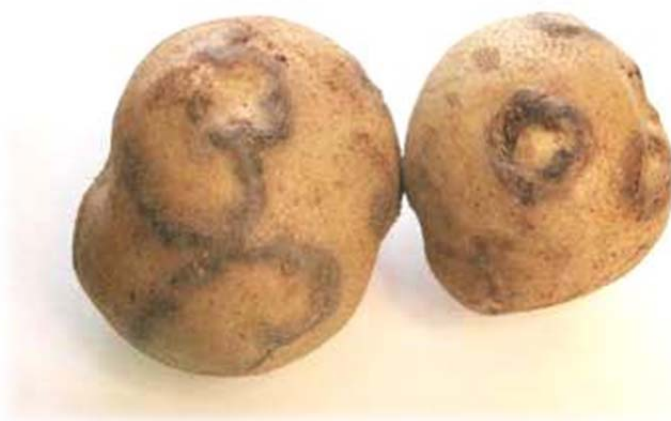
Krompirjev virus Y je razširjen po celem svetu, vendar ne vsi različki enako. Oblika Y^N se pojavlja v Evropi, delih Afrike in Južni Ameriki, Y^C v Avstraliji, Indiji, Veliki Britaniji in delih preostale Evrope, Y^O je prisoten po celem svetu (Bokx in Huttinga, 1981).

2.3.4 Različek PVY^{NTN}

Različek PVY^{NTN} se serološko bistveno ne razlikuje od različice PVY^N, razlike so predvsem v bolezenskih znakih, ki jih povzroči pri okuženi rastlini (Le Romancer in sod., 1994). Gre za nekrotično obliko PVY, ki povzroča rastlinsko bolezen, imenovano obročkasta nekroza gomoljev (»Potato tuber necrosis ring disease«). V Sloveniji je ta

oblika virusa zaradi zelo uspešnega in hitrega širjenja med leti 1989 in 1991 iz pridelave izrinila sorto Igor (Kus, 1994).

Simptomi okužbe se sprva pojavijo na mestih, kjer je virus vstopil v rastlino, in se nato skupaj s širjenjem virusa prenesejo na neinokulirane liste in gomolje (Pompe in sod., 2006). Bolezenski znaki so odvisni od sorte okuženega krompirja in se lahko pojavijo tudi dva meseca po pobiranju pridelka. Značilna je površinska nekroza gomoljev. Nekrotični obroči so sprva izbočeni, nato vdrti in temno rjavi (Slika 2). Pod površino nekroz lahko ob prerezu opazimo tanko plast rjavega odmrlega tkiva. Na listih okužene rastline se pojavijo kloroze, pogost je vzorec mozaika. Prisotne so lahko tudi manjše nekroze listov, pri bolj občutljivih sortah tudi nekroze stebel. Ob napredovanju okužbe listi odpadejo in rastlina odmre. Enako kot pri ostalih različnih krompirjevega virusa Y se tudi pri PVY^{NTN} pojavi sekundarna okužba, ko nova rastlina zraste iz okuženega gomolja. Bolezenski znaki so podobni kot pri primarni okužbi, a je njihova oblika običajno milejša (Kus, 1994).



Slika 2: Obročasta nekroza gomolja pri krompirju, okuženem z virusom PVY^{NTN} (Jones in sod., 2003).

2.3.5 Prenos virusa med rastlinami

Krompirjev virus Y se brez posrednika ne more širiti med rastlinami, ker ni sposoben predreti listne povrhnjice (Kus, 1994). Okužba se prenaša z rastlinskim sokom ali s pomočjo okoli 25 različnih vrst listnih uši (Bokx in Huttinga, 1981). Najuspešnejša je vrsta *Myzus persicae*, prenašajo pa ga tudi uši *Macrosiphum euphorbiae*, *Myzus certus*, *Aphis fabae*, *Phorodon humuli* in *Rhopalosiphum insertum* (Kennedy in sod., 1962, cit. po Bokx in Huttinga, 1981). Listne uši prenašajo viruse, ker se hranijo z okuženimi in neokuženimi rastlinami, ki jih zbodejo z rilčkom in med njimi prenesejo rastlinski sok. Brez posredovanja listnih uši se virusi širijo z rastlinskim sokom, če pride do kontakta listov, ob katerem se listne dlačice polomijo. Nastanejo majhne rane skozi katere lahko vstopi okužen rastlinski sok. V vseh primerih gre za mehansko okužbo (Kus, 1994). Virus se pogosto širi tudi s sajenjem gomoljev, ki so pridobljeni iz okužene rastline (Jones in sod., 2003).

2.3.6 Odziv rastlin na virusno okužbo

Krompirjev virus Y je sposoben okužiti najmanj 60 različnih rastlinskih vrst predvsem iz družine *Solanaceae* (Delgado-Sanchez in Grogan, 1970). Različni kultivarji krompirja se na okužbo različno odzovejo, ker posedujejo različno stopnjo odpornosti. Sorta Igor je zelo občutljiva, Desiree in Pentland squire sta tolerantni in Sante visoko odporna (Mehle in sod., 2004). Za zmanjšanje širjenja virusne okužbe so mogoči različni ukrepi, ki imajo različno mero uspešnosti. Priporočeni so vzgajanje pridelka v obdobju, ko je v okolju manj naravnih prenašalcev, uporaba mineralnih olj za škropljenje, ki nekoliko zmanjšajo frekvenco prenosa virusa in zlahtnjenje sort za pridobitev odpornosti na okužbe (Bokx in Huttinga, 1981).

2.4 Z VIRUSOM POSREDOVANO UTIŠANJE GENOV (VIGS)

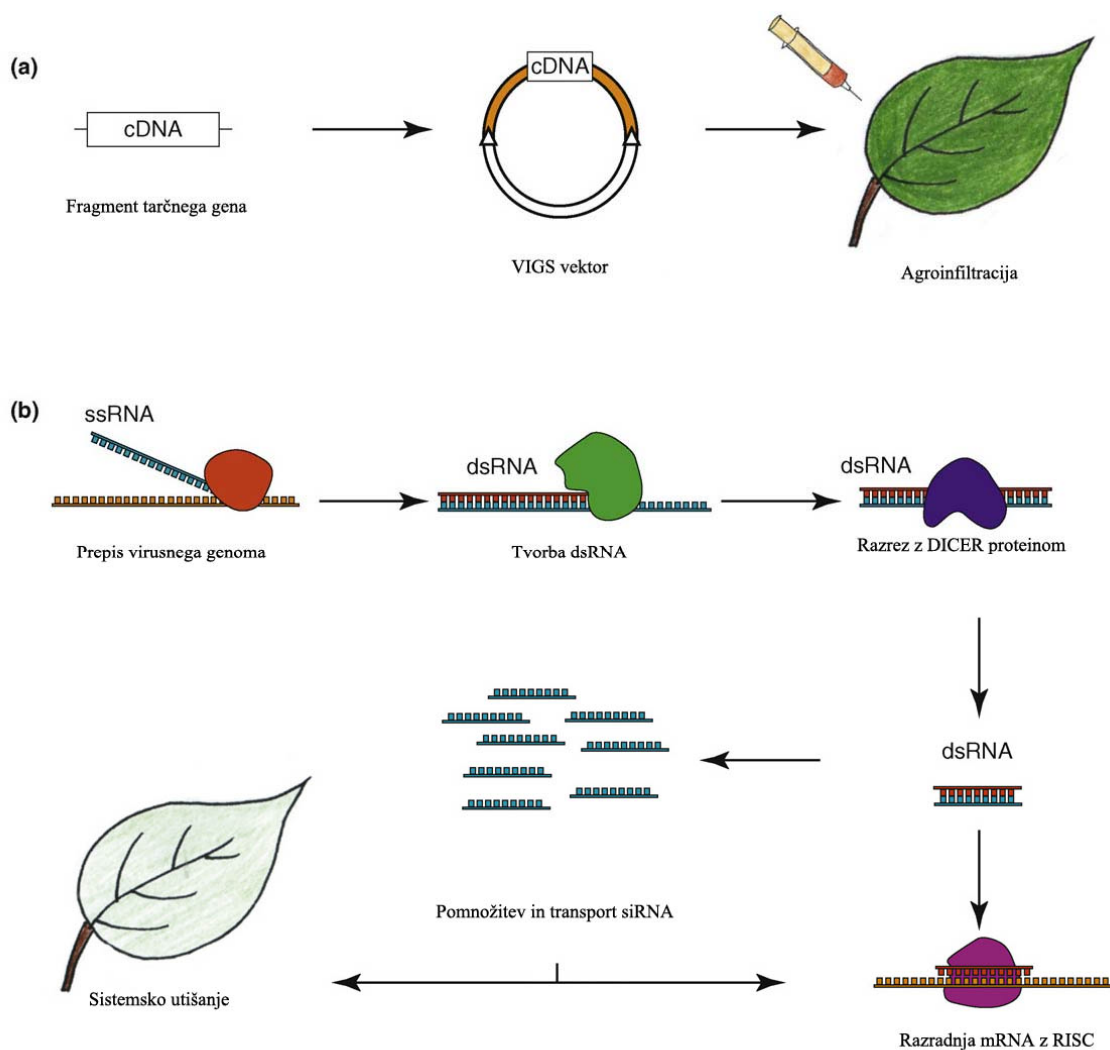
Najlažji in najučinkovitejši način za določitev funkcije gena ali proteina je povzročitev spremembe v izražanju ali vzpostavitev mutante z okvaro proučevanega elementa (Burch-Smith in sod., 2004). V rastlinah obstaja mehanizem utišanja imenovan posttranskripcijsko

utišanje genov (PTGS). Gre za mehanizem pri katerem virus, transgen ali molekula RNA sproži razgradnjo celične RNA (Thain in Hickman, 2004). Ko je utišanje gena posledica virusne okužbe, ga imenujemo z virusom posredovano utišanje gena (VIGS). Pojem je sprva označeval okrevanje rastline po virusni okužbi (Van Kammen, 1997). Danes je izraz VIGS sinonim za metodo, v kateri uporabimo rekombinantni virusni vektor za utišanje endogena, ki poteka posttranskripcijsko v citoplazmi (Ruiz in sod., 1998).

Za virusno utišanje so v uporabi virusni vektorji, ki so spremenjeni do te mere, da vsebujejo fragment eksona gostiteljevega tarčnega gena (Becker in Lange, 2009). Mehanizem RNAi je usmerjen proti virusnemu genomu v VIGS-vektorju. Ker vektor vsebuje tudi del endogena rastline, se posledično utiša tudi rastlinski gen z ustrežno mero homologije. Minimalna dolžina fragmenta, ki je zadostna za prepoznavo homologije, je 23 nukleotidov s 100 % ujemanjem (Purkayastha in Dasgupta, 2009).

Za nadzor utišanja je v poskus pomembno vključiti kontrole. Kot pozitivna kontrola je pogosto v uporabi gen, ki kodira fitoen desaturazo (PDS). V virusni vektor je vstavljen del cDNA, ki kodira PDS. Po prepisu v gostiteljski rastlini pride do razgradnje mRNA za PDS, inhibicije sinteze karotenoidov in pojava belega fenotipa, ki ga zlahka zaznamo (Kumagai in sod., 1995). Negativno kontrolo predstavlja virus brez vključenega vektorja. Služi za zaznavo fenotipa, ki je posledica okužbe z virusnim vektorjem (Burch-Smith in sod., 2004).

Mehanizem VIGS je predstavljen na sliki 3.



Slika 3: Mehanizem VIGS.

a) Fragment tarčnega gena vstavimo v virusni genom in z vektorjem transformiramo bakterijo *Agrobacterium tumefaciens*. Bakterije z virusnim vektorjem agroinfiltriramo skozi spodnjo povrhnjico lista v medcelične prostore, ki so napolnjeni z zrakom. b) Virusni genom se vstavi v genom okužene rastline in prepíše z gostiteljevo RNA-polimerazo. Iz enoverižnega transkripta se tvori dsRNA, ki jo prepoznajo DICER-proteini in jo razrežejo v kratke fragmente. Te prepoznajo kompleks RISC, ki tvori enoverižne fragmente RNA. Ti služijo kot matrica za razgradnjo komplementarne mRNA. Enoverižne RNA se pomnožijo in razširijo po rastlini, kjer nato pride do sistemskega utišanja tarčnega gena (Becker in Lange, 2009).

2.4.1 Prednosti in slabosti metode VIGS

Z virusom posredovano utišanje genov ima mnogo prednosti pred drugimi metodami za ugotavljanje genske funkcije. Gre za zelo hitro metodo. Gen, ki povzroči spremembo fenotipa, lahko identificiramo že v eni generaciji ter za to potrebujemo le eno rastlino

(Burch-Smith in sod., 2004). Rezultati so vidni že 2 do 3 tedne po inokulaciji (Purkayastha in Dasgupta, 2009). V primeru, da smo v vektorje vstavili celotno genomsko knjižnico, lahko gen, ki je povzročil nek zanimiv fenotip, tudi hitro identificiramo iz vektorja. Metoda je uporabna tudi za proučevanje genov, ki vodijo v smrten fenotip in jih drugače ne bi zaznali.

Na metodo ne vpliva funkcionalna redundanca. Spremembo fenotipa lahko pogosto prekrije delovanje drugega gena iste genske družine. Pri metodi VIGS lahko v vektor vstavimo visoko ohranjeno zaporedje genske družine in tako utišamo skoraj vse gene te družine (Burch-Smith in sod., 2004). VIGS omogoča tudi proučevanje genov rastlin, za katere še ni standardiziranih transformacijskih protokolov (Purkayastha in Dasgupta, 2009).

Kot vse metode ima tudi metoda VIGS nekatere slabosti. Le redko lahko popolnoma utišamo tarčni gen. Izražanje je lahko še vedno dovolj močno, da vodi v nastanek funkcionalnega proteina in ohranitev normalnega fenotipa. Utišanje gena pogosto tudi ni enotno po celotni rastlini in med vsemi rastlinami raziskave. Lahko pride tudi do naključnega utišanja netarčnih genov, predvsem pri vrstah, katerih genom še ni dobro poznan (Burch-Smith in sod., 2004).

2.4.2 RNA interferenca (RNAi)

Mehanizem za regulacijo stabilnosti mRNA je interferenca RNA (RNAi). Gre za zaporedje celičnih odzivov na prisotnost dvoverižne RNA (dsRNA), ki se v rastlinski celici pojavi kot mikro RNA, ki je del običajnih razvojnih procesov, kot kratka interferenčna RNA, ki utiša nekatere gene ali ob vnosu tuje RNA z virusom ali transformacijo. V celici DICER-protein razreže dsRNA na 21 do 24 nukleotidov dolge fragmente. Ena veriga dupleksa se veže z RNA-induciranim kompleksom za utišanje genov (RISC), ki vsebuje vsaj en katalitični argonavtni protein (AGO). Veriga, ki se veže na AGO nato vodi RISC do komplementarne mRNA, ki jo AGO razgradi. Nastali fragmenti se sprostijo v citoplazmo, kjer pride še do dodatne razgradnje (Taiz in Zeiger, 2010).

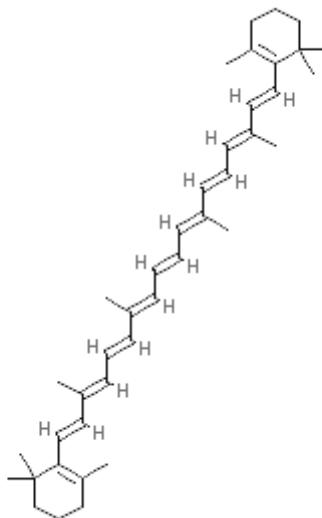
Strokovnjaki menijo, da se je mehanizem RNAi razvil pred več milijardami let. Prisoten je v rastlinah, živalih in enoceličnih organizmih. Velja prepričanje, da se je RNAi pojavila kot obrambni celični mehanizem pred tujki, kot so RNA-virusi (RNA interference fact sheet, 2013).

Rastline uporabljajo RNAi tudi kot imunski odziv na virusno okužbo. Genomi virusov so različni, nekateri injicirajo dsRNA, drugi ds ali ssRNA (enoverižno RNA), vsi pa v nekem trenutku tvorijo dvoverižno RNA. V odgovor rastlina sproži RNAi odziv, ki vodi v uničenje virusne RNA. Obenem se tvorijo tudi kratke dvoverižne RNA, ki potujejo po celotni rastlini in preprečijo širjenje virusa (Taiz in Zeiger, 2010).

2.4.3 Fitoen desaturaza (PDS)

Fitoen desaturaza (PDS) je eden izmed ključnih encimov biosintezne poti karotenoidov (Lopez in sod., 2008).

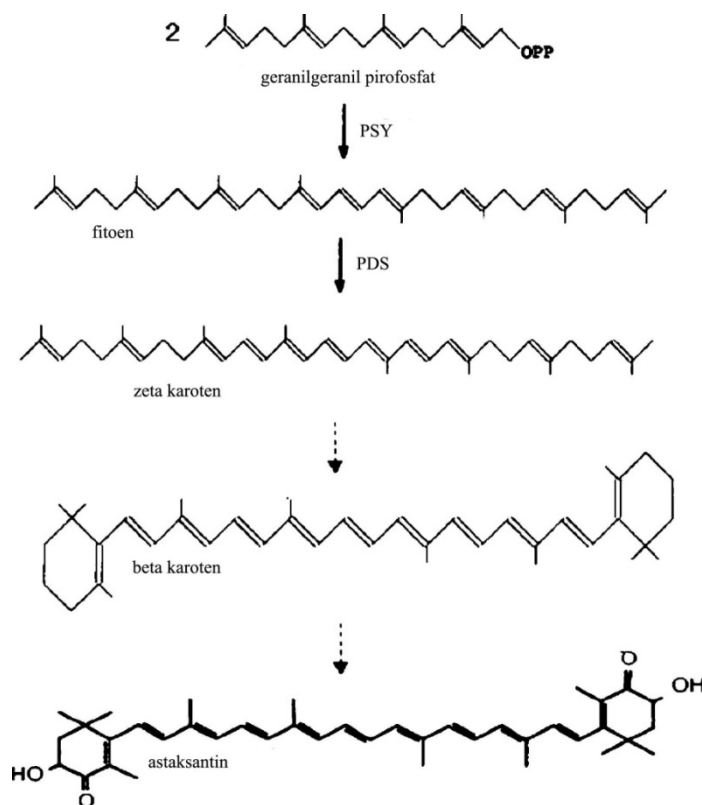
Karotenoidi so linearni ogljikovodiki, ki služijo kot antenska barvila in fotozaščitni elementi (Slika 4). Najdemo jih v vseh fotosinteznih organizmih kot sestavni del tilakoidne membrane. So pomožna barvila, kar pomeni, da svetlobno energijo, ki jo absorbirajo, prenesejo naprej na klorofil. Membrane klorofila zlahka poškoduje velika količina energije, ki jo barvila absorbirajo. Fotozaščita deluje kot varnostni ventil, ki razprši odvečno energijo svetlobe preden pride do poškodb organizma (Taiz in Zeiger, 2010).



Slika 4: Struktura beta karotena, ki je predstavnik karotenoidov z molekulsko formulo $C_{40}H_{56}$ (PubChem, 2013).

Energija, ki je shranjena v vzbujenem stanju klorofila, se hitro razprši s prenosom v fotokemijo. Vzbujeno stanje je tako zadušeno. Če se proces ne zgodi dovolj hitro, lahko klorofil reagira z molekularnim kisikom in tvori zelo reaktivno obliko 1O_2 , ki zlahka poškoduje celične elemente. Karotenoidi igrajo pomembno vlogo pri dušenju vzbujenega stanja klorofila. Vzbujeno stanje karotenoidov, ki nastane kot posledica absorpcije svetlobe, nima dovolj energije za nastanek 1O_2 . Energija se izgubi v obliki toplote in karotenoidi se vrnejo na izhodiščno energijsko stanje. Mutante brez karotenoidov ne morejo preživeti v okolju s kisikom in svetlobo (Taiz in Zeiger, 2010).

ri metodi VIGS v virusni vektor ustavimo del cDNA gena *pds*. Utišanje povzroči zavrtje biosinteze karotenoidov (Ruiz in sod., 1998). Fitoen se ne desaturira in se začne nalagati v listih. Biosintezna pot ne privede do končnega produkta karotena (Slika 5), kar pomeni, da se fotoprotekcija klorofila ne vrši.



Slika 5: Biosintezna pot karotenoidov. PDS igra ključno vlogo v pretvorbi fitoena v zeta karoten (Liang in sod., 2006).

Posledica je bel fenotip rastline (Bartley in Scolnik, 1995). Ob utišanja gena *pds* so na začetku prizadete listne žile, kmalu je fenotip viden po celotni listni ploskvi, sledijo stbla in poganjki (Slika 6). Beli so tudi poganjki, ki izraščajo do 2 meseca po virusni inokulaciji. Začetna faza metode VIGS je povsem pogojena z virusno inokulacijo, a ta naprej ni več pogoj za ohranjanje utišanja (Ruiz in sod., 1998).



Slika 6: Simptomi utišanja *pds* gena.

a) Listi paradižnika, inokulirani z običajnim virusom TRV. b) Utišanje gena *pds* pri paradižniku z uporabo TRV-vektorja. c) Utišanje gena *pds* pri tobaku z uporabo TRV-vektorja (Burch-Smith in sod., 2004).

2.4.4 Vektorji za utišanje genov

V uporabi je več različnih virusnih vektorjev, ki imajo svoje prednosti in slabosti. Omejujemo se na opis virusa tobačnega mozaika (TRV), ki smo ga uporabili v naši raziskavi.

Virus TRV se od ostalih rastlinskih virusov loči po specifičnih delcih dveh dolžin. Daljši merijo od 185 do 196 nm, krajši pa od 50 do 115 nm. Delci vsebujejo molekule RNA-1 in RNA-2 (Robinson in Harrison, 1989). Genom TRV je torej bipartiten. Proteini, ki jih kodira RNA-1, so zadostni za replikacijo in premikanje znotraj gostiteljske rastline. Proteini, ki jih kodira RNA-2, omogočijo tvorbo virionov in prenos na druge gostiteljske rastline (MacFarlane, 1999). Virus se širi z rastlinskim sokom in glistami (Nematoda). Ima zelo širok nabor gostiteljev, med njimi tudi mnogo kulturnih vrst. Okužuje špinačo, krompir, tobak, narcise, tulipane ipd. (Robinson in Harrison, 1989).

TRV ima kot vektor številne prednosti pri metodi VIGS v primerjavi z ostalimi uporabljenimi virusi (PVX, TMV, TGMV). Ob okužbi povzroči le zelo blage simptome, okuži široko področje in utiša tudi gene v rastočih delih rastline.

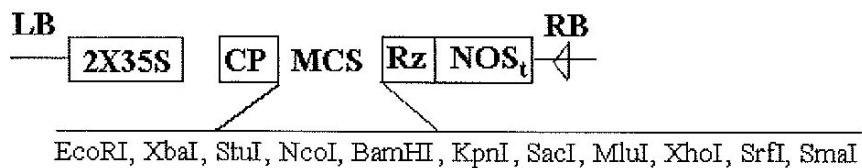
Za metodo VIGS sta posebej pripravljena cDNA klona pTRV1 in pTRV2 (Slika 7), ki sta pod nadzorom promotorja virusa cvetačnega mozaika (CaMV) 35S vstavljena v binarni transformacijski vektor (Ratcliff in sod., 2001).

cDNA klone v vektorju omejujeta robni sekvenci LB in RB ter promotor 35S in nopalni sintezni terminator NOS (Liu in sod., 2002). Geni, ki niso esencialni in so potrebni le za prenos TRV med rastlinami, so bili odstranjeni iz vektorja TRV-2. Nadomestila sta jih poliklonsko mesto in ribozim. Gre za zaporedje RNA, ki je sposobno opravljati biokemijske reakcije podobno kot encimi. Dotično zaporedje ima sposobnost lastnega izreza iz genoma. pTRV1 in pTRV2 sta s transformacijo vstavljena v bakterijo *Agrobacterium tumefaciens*, nato so bakterije združene in z agroinfiltracijo vnesene v gostiteljsko rastlino (Ratcliff in sod., 2001).

pTRV1



pTRV2



Slika 7: Organizacija vektorja TRV.

a) Vektor pTRV1 vsebuje levo in desno robno sekvenco (Lb, Rb), promotor (35S), protein za premikanje (Mp), 16k protein (16k), ribozim (Rz), nopolin sintetazni terminator (NOS) in od RNA odvisno RNA polimerazo (RdRp) (Liu in sod., 2002).

2.5 NAMEN DELA

Krompirjev virus Y (PVY) povzroča škodo na mnogih sortah krompirja, a se ti na okužbo različno odzivajo, ker so na okužbo z virusom različno odporni. Namen magistrskega dela je bil ugotoviti vpliv okužbe z virusom PVY^{NTN} pri različnih divjih sorodnikih krompirja. Razlike smo zaznavali z opazovanjem morfoloških značilnosti, z uporabo verižne reakcije s polimerazo v realnem času (qPCR) in s konfokalno mikroskopijo. Za nadaljnje proučevanje genov, ki posredujejo odpornost proti virusnim okužbam, smo na izbranih sortah krompirja preizkusili metodo z virusom posredovanega utišanja genov (VIGS). Uspešnost metode smo ocenili na podlagi morfoloških značilnosti rastlin.

2.6 HIPOTEZE

1. Pričakujemo, da se bodo različnih divji sorodniki krompirja na okužbo z virusom PVY^{NTN} različno odzivali.
2. Predvidevamo, da ima predhodna okužba rastline s TRV vpliv na okužbo s PVY^{NTN}.
3. Predvidevamo, da bo metoda VIGS delovala vsaj pri kateri izmed uporabljenih sort krompirja Igor, Rywal, PW363, Sante, Désirée, Rywal NahG 16, Désirée J3 in Désirée NahG D2.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 RASTLINSKI MATERIAL

Vpliv okužbe z virusom PVY^{NTN} smo proučevali na različnih divjih sorodnikih krompirja (Tabela 1), ki izvirajo iz Južne Amerike in ZDA. Predstavniki so bili izbrani na podlagi predhodnih testiranj na Nacionalnem inštitutu za biologijo.

Tabela 1: Divji sorodniki krompirja.

Divji sorodniki krompirja	Oznaka	Akscesijska številka	Država izvora
<i>Solanum bulbocastanum</i>	BLB	331-2	Mehika
<i>Solanum hjertingii</i>	HJT	349-3	Mehika
<i>Solanum jamesii</i>	JAM	355-1	ZDA
<i>Solanum lesteri</i>	LES	358-4	Mehika
<i>Solanum mochiquense</i>	MCQ	186-1	Peru
<i>Solanum okadae</i>	OKA	970-3	Bolivija
<i>Solanum polytrichon</i>	PLT	378-2	Mehika
<i>Solanum papita</i>	PTA	767-8	Mehika
<i>Solanum</i> sp.	SPEC	287-2	Peru
<i>Solanum venturii</i>	VNT	365-1	Argentina
<i>Solanum venturii</i>	VNT	366-2	Argentina
<i>Solanum venturii</i>	VNT	741-1	Argentina
<i>Solanum venturii</i>	VNT	250-2	Argentina
<i>Solanum venturii</i>	VNT	283-1	Argentina
<i>Solanum venturii</i>	VNT	896-4	Argentina

Metodo VIGS smo preizkusili na različnih sortah krompirja *Solanum tuberosum* L. (Tabela 2). Uporabljene sorte so se v predhodnih raziskavah izkazale za različno občutljive na okužbo z virusom PVY^{NTN}. Za pozitivno kontrolo virusne okužbe smo uporabili rastline tobaka (*Nicotiana benthamiana*), ker je metoda VIGS za to vrsto dobro poznana in uveljavljena ter divjega sorodnika krompirja *Solanum venturii* 896-4. Za inokulacijo z virusom PVY^{NTN} smo uporabili rastlinski sok sorte Pentland Squire gojene v tkivni kulturi, ki kljub okužbi dobro uspeva in nam je služila kot zaloga virusnih delcev. Ves rastlinski material smo dobili iz zbirke Nacionalnega inštituta za biologijo. Pri delu z gensko spremenjenimi organizmi smo upoštevali vse predvidene varnostne ukrepe.

Tabela 2: Občutljivost sort krompirja *Solanum tuberosum*.

Sorta	Občutljivost / Sprememba metabolizma
Igor	zelo občutljiv na PVY ^{NTN}
Rywal	odporen proti PVY ^{NTN}
PW363	visoko odporen proti PVY ^{NTN}
Sante	visoko odporen proti PVY ^{NTN}
Désirée	toleranten za PVY ^{NTN}
Rywal NahG 16	okvarjena pot salicilne kisline
Désirée J3	povišano izražanje β -1,3-glukanaze razreda III
Désirée NahG D2	okvarjena pot salicilne kisline

3.1.1 Tkivne kulture

Izhodne rastline za poskus so bile vzgojene v tkivni kulturi na trdnem MS-gojišču, dobili smo jih iz zbirke Nacionalnega inštituta za biologijo. Shranjene so bile v rastni komori v plastičnih epruvetah s pokrovčki.

3.1.2 Razmnoževanje rastlinskega materiala

Rastlinski material iz tkivne kulture smo namnožili s procesom segmentacije na posamezne nodije. Delo je potekalo sterilno v laminariju, uporabili smo dva kompleta laboratorijskega pribora, da se je lahko vsak po sterilizaciji s plamenom povsem ohladil. S pinceto smo potegnili celotno rastlino iz epruvete in steblo odrezali nad gojiščem. Na sterilnem papirju smo s skalpelom odstranili liste in za razmnoževanje uporabili približno 3 srednje nodije. Pazili smo, da izbrani nodiji niso imeli porumenelih listov, da smo za nadaljnji poskus dobili čim bolj enotne izsečke. Nodije smo s pinceto s spodnjo stranjo naprej vstavili v pripravljene petrijevke z gojiščem MS30, da je bil zalistni brst nad gojiščem. Poleg nodijev smo za razmnoževanje uporabili tudi vršiček poganjka z dvema najmlajšima listoma. Skupno smo v vsako petrijevko vstavili približno 12 izsečkov.

3.1.3 Sajenje

Namnožen rastlinski material smo po uspešnem koreninjenju prestavili v lončke z zemljo. Korenine so se pojavile že po enem tednu rasti v rastni komori. V plastične lončke smo nasuli univerzalno zemljo, jo rahlo potlačili in zalili z vodo. V zemljo smo naredili majhno luknjo in vanjo posadili rastlinski material. Lončke smo zložili na pladnje za kasnejše lažje zalivanje in jih postavili v komoro rastlinjaka, v kateri so bili pogoji rasti natančno uravnavani: svetloba: 21 ± 2 °C, 16h, tema: 19 ± 2 °C, 8h, vlažnost je bila vzdrževana pri 75 ± 2 %, rastoče rastline smo redno zalivali in pregledovali.

3.2 BAKTERIJSKI MATERIAL

V magistrski nalogi smo uporabili bakterije vrste *Agrobacterium tumefaciens*, ki so bile predhodno transformirane, da so vsebovale virusne vektorje pTRV1, pTRV2 in pTRV2-PDS. Bakterije smo uporabili pri agroinfiltraciji, ki je del preizkusa metode VIGS. Bakterije so bile shranjene pri temperaturi -80 °C kot del zbirke Nacionalnega inštituta za biologijo.

3.3 VIRUSNI MATERIAL

Proučevali smo vpliv virusa PVY^{NTN} na različne divje sorodnike krompirja. Uporabili smo rastlinski sok krompirja sorte Pentland Squire, ki je za virus toleranten in se ta v njem namnožuje in ohranja. Za opazovanje lokalizacije virusa s konfokalnim mikroskopom smo rastlinski material inokulirali z virusom PVY^N označenim z zelenim fluorescenčnim proteinom (PVY^N-GFP) (uporabljen klon PVY^N-GFP je plod sodelovanja med NIB in francoskim inštitutom INRA Rennes-FN3PT). Prisoten je bil v rastlinskem soku okuženih in zamrznjenih listov tobaka.

3.4 SEZNAM UPORABLJENIH KEMIKALIJ IN NAPRAV

V magistrskem delu smo uporabili naslednje kemikalije in naprave (tabeli 3 in 4).

Tabela 3: Seznam uporabljenih kemikalij.

Kemikalija	Proizvajalec
acetosiringon	Sigma
agaroz	Invitrogen
EDTA	Sigma
etanol	Carlo Erba Reagenti
etidijev bromid	Gibco BRL
kanamicin monosulfat	Duchefa
karborund	Prolabo
komplet za Dnazno reakcijo	Invitrogen
komplet za reverzno transkripcijo	ABI
Massruler DNA ladder mix	Fermentas
nanašalno barvilo 6x DNA Loading Dye	Fermentas
perfluorodekalin	Sigma
rifampicin	Sigma
RNA izolacijski komplet	AnalytikJena
RNase Zap	Ambion
voda brez Rnaze	Qiagen

Tabela 4: Seznam uporabljenih naprav.

Naprava	Proizvajalec
avtoklav	Kambič
avtomatske pipete	Eppendorf
brezprašna komora	Biosafe
centrifuga	Eppendorf
centrifuga velika	Sigma
ciklični termostat	Applied biosystems
elektroforeza	Bio-rad
fotografski aparat	Pentax
homogenizator	Qiagen
komora za pripravo PCR reakcijske mešanice	Eppendorf
konfokalni mikroskop	Leica
mikrovalovna pečica	Sharp
multispin stresalnik	Biosan
PCR v realnem času	Applied Biosystems
pH meter	Mettler Toledo
karantenski rastlinjak	Kambič
rastna komora	Kambič
ročni homogenizator	IBU
skrinja -80 °C	Sanyo

Se nadaljuje

Nadaljevanje

<u>Naprava</u>	<u>Proizvajalec</u>
spektrofotometer	Amersham Biosciences
spektrofotometer	Nano drop
stresalnik	Kambič
tehnica	Sartorius
transiluminator	UVI-tec
vodna kopel	Kambič
vrtničnik	Tehtnica

3.6 UPORABLJENA GOJIŠČA

Za gojenje rastlin v tkivni kulturi smo pripravili gojišče MS30 (Tabela 5).

Tabela 5: Sestava gojišča MS30.

<u>Sestavina</u>	<u>Proizvajalec</u>	<u>Kataloška št.</u>	<u>Količina</u>
MS z vitamini (Murashige in Skoog, 1962)	Duchefa Biochemie	Mo222.0050	5 g/l
saharozna	Kemika	200-334-9	30 g/l
bacto agar	BD	2090181	0,8 %
bidestilirana voda	/	/	750 ml

Pripravili smo dve steklenici po 750 ml gojišča MS30. V vsako steklenico smo natehtali MS z vitamini, saharozo in dodali 750 ml bidestilirane vode ter agar. pH gojišča smo pred dodatkom agarja z dodajanjem NaOH ali HCl umerili na 5,85 in steklenici avtoklavirali 15 min pri 121 °C. Gojišče smo nato v laminariju razlili v petrijevke, v vsako približno 30 ml, počakali, da se je gojišče ohladilo in strdilo ter petrijevke pokrili s pokrovi.

Za gojenje bakterij, ki smo jih uporabili pri agroinfiltraciji, smo pripravili tekoče gojišče Luria Broth (LB) (Tabela 6).

Tabela 6: Sestava gojišča LB-tekoče.

Sestavina	Proizvajalec	Kataloška št.	Količina
tripton	BD	1069558	10 g/l
kvasni ekstrakt	DIFCO	269002	5 g/l
NaCl	Merck	1.009.711.000	5 g/l
bidestilirana voda	/	/	1000 ml

Tripton, kvasni ekstrakt in NaCl smo natehtali v steklenico in raztopili v 1 l bidestilirane vode. Raztopino smo nato avtoklavirali 15 min pri 121 °C in jo do nadaljnega hranili v hladilniku.

Za gojenje bakterij, ki smo jih uporabili pri agroinfiltraciji, smo pripravili tudi gojišče s kvasnim ekstraktom (YEB) (Tabela 7).

Tabela 7: Sestava gojišča YEB.

Sestavina	Proizvajalec	Kataloška št.	Količina
goveji ekstrakt bakteriološki	DIFCO	139062XA	5 g/l
pepton	OXOID	Lp0037	5 g/l
saharozna	Kemika	200-334-9	5 g/l
kvasni ekstrakt	DIFCO	269002	1 g/l
1M MgSO ₄	Invitrogen	52044	2 ml/l
bidestilirana voda	/	/	1000 ml

Goveji ekstrakt, bakteriološki pepton, saharozo in kvasni ekstrakt smo natehtali v steklenico in dodali 1 l bidestilirane vode. Raztopini smo dodali 2 ml 1 M MgSO₄ (1 M = 246 g/l).

Za namen agroinfiltracije smo pripravili tudi infiltracijski pufer (MMA) (Tabela 8).

Tabela 8: Sestava infiltracijskega pufra MMA.

Sestavina	Proizvajalec	Kataloška št.	Količina
saharoza	Kemika	200-334-9	20 g/l
MS brez vitaminov	Duchefa	Mo221.0050	5 g/l
MES	Sigma	M2933-100g	2 g/l
1M NaOH	Merck	215-185-5	2 ml/l
200mM acetosiringon	Sigma	D134406	1 ml/l
bidestilirana voda	/	/	250 ml

Saharozo, MS brez vitaminov in MES smo natehtali v steklenico in dodali 250 ml bidestilirane vode. Raztopini smo dodali 250 µl 200 mM acetosiringona in z 0,5 ml 1 M NaOH umerili pH na vrednost 5,6.

3.7 VIRUSNA INOKULACIJA

Divji sorodniki krompirja so štiri tedne rasli pod nadzorovanimi pogoji v rastlinjaku. Nato smo določili njihovo občutljivost za okužbo z virusom PVY^{NTN}. Pet rastlin smo uporabili za okužbo z virusom in 5 za kontrolne slepo okužene (v nadaljevanju označene z MOCK). Za okuževanje rastlin smo uporabili protokol za inokulacijo z virusom PVY Nacionalnega inštituta za biologijo. Divje sorodnike krompirja smo okužili z rastlinskim sokom, ki smo ga pridobili iz z virusom okuženih in neokuženih krompirjev sorte Pentland squire, ki so zrasli v tkivni kulturi v zbirki Nacionalnega inštituta za biologijo. Krompir sorte Pentland squire smo brez korenin homogenizirali v vrečki Bioreba z ročnim homogenizatorjem. Pridobljenemu rastlinskemu soku smo dodali fosfatni pufer (Tabela 9) in mešanico inkubirali pri sobni temperaturi 10 min. Fosfatni pufer lahko hranimo v hladilniku največ 1 mesec, založni raztopini A in B pa hranimo pri -20 °C.

Na vsaki izmed okuževanih rastlin smo izbrali 3 spodnje, dobro razvite liste, ki smo jih označili z alkoholnim flomastrom in rahlo posuli s karborundom. Na vsak list smo kanili 2 kapljici rastlinskega soka, ga dobro razmazali in čez 10 minut sprali z vodo. Pazili smo, da nismo z virusom okuževali neoznačenih listov in rastlin MOCK. Postopek smo ponovili še

pri rastlinah MOCK s to razliko, da smo uporabili rastlinski sok neokuženih krompirjev sorte Pentland squire.

Tabela 9: Sestava fosfatnega pufra.

	<u>Sestavina</u>	<u>Količina</u>
Raztopina A (0,2M)	NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	2,76 g
	dd H ₂ O	100 ml
Raztopina B (0,2M)	Na ₂ HPO ₄	2,84 g
	dd H ₂ O	100 ml
Fosfatni puffer (100 ml, 20mM)	raztopina A	1,9 ml
	raztopina B	8,1 ml
	PVP	2 g
	dd H ₂ O	do 100 ml

3.8 POBIRANJE RASTLINSKEGA MATERIALA

Z virusom PVY^{NTN} okužen rastlinski material smo po enomesečnem opazovanju, popisovanju znakov in fotografiranju pobrali za nadaljnje raziskave. S skalpelom smo odrezali zgornje tri liste, jih zvilili, vstavili v mikrocentrifugirko in potopili v tekoči dušik. Najprej smo pobrali liste kontrolnih rastlin, da ne bi prišlo do navzkrižnih okužb. Mikrocentrifugirke smo shranili v zamrzovalni skrinji pri -80 °C.

3.9 HOMOGENIZACIJA

Pobran rastlinski material smo do homogenizacije hranili v zamrzovalniku pri -80 °C, nato smo vzorce prestavili v zaboj s tekočim dušikom. V vsako mikrocentrifugirko smo z ezo vstavili kovinsko kroglico in jo nato prestavili v nosilec homogenizatorja. Vzorce smo stresali 1 minuto pri 30 tresljajih na sekundo. V primeru, da se material vidno ni dovolj homogeniziral, smo čas stresanja še nekoliko podaljšali. Do nadaljnje uporabe smo mikrocentrifugirke ponovno shranili pri -80 °C.

3.10 IZOLACIJA RNA

RNA smo iz homogeniziranega rastlinskega materiala izolirali s pomočjo kompleta innuPREP Plant RNA Kit (AnalytikJena). Izolacija je potekala v več korakih:

1. Homogeniziranemu vzorcu smo dodali 500 μ l pufra RL in ga inkubirali v vodni kopeli 5 minut pri 56 °C.
2. Vzorec smo centrifugirali pri hitrosti 14000 rpm (oziroma 20817 g) 5 minut.
3. 500 μ l supernatanta smo prestavili na filter D z zbiralno mikrocentrifugirko.
4. Centrifugirali smo pri nastavitvi 10000 g 5 minut.
5. Zavrgli smo filter D.
6. V zbiralni mikrocentrifugirki smo zmešali enak volumen supernatanta in 70 % etanola in mešanico prenesli na filter R.
7. Centrifugirali smo pri nastavitvi 10000 g 2 minuti.
8. Filter smo postavili na novo zbiralno mikrocentrifugirko in dodali 500 μ l pufra HS.
9. Centrifugirali smo pri nastavitvi 10000 g 1 minuto.
10. Filter smo postavili na novo zbiralno mikrocentrifugirko in dodali 650 μ l pufra LS.
11. Centrifugirali smo pri nastavitvi 10000 g 1 minuto.
12. Filter smo postavili na novo zbiralno mikrocentrifugirko in dodali 650 μ l pufra LS.
13. Centrifugirali smo pri nastavitvi 10000 g 1 minuto.
14. Filter smo postavili na navadno 2 ml mikrocentrifugirko in centrifugirali pri nastavitvi 10000 g 4 minute.
15. Filter smo postavili na 1,5 ml elucijsko mikrocentrifugirko in dodali 50 μ l vode brez RNaze.
16. Vzorec smo inkubirali pri sobni temperaturi 10 minut.
17. Centrifugirali smo pri nastavitvi 6000 g 1 minuto, zavrgli filter R in izolirano RNA shranili pri -80 °C.

3.11 MERJENJE KONCENTRACIJE IN ČISTOSTI RNA

Za merjenje koncentracije in čistosti izolirane RNA smo uporabili spektrofotometer NanoDrop ND-1000. Za umeritev naprave smo na senzor najprej nanesli 1,5 μ l vode brez

RNaze, ki smo jo uporabljali tudi pri izolaciji. Absorpcijo vzorcev smo merili pri 260 in 280 nm ter iz dobljenih rezultatov izračunali razmerje 260/280, ki je pričalo o čistosti izolirane RNA, ker je absorpcija nukleinskih kislin največja pri 260 nm, absorpcija beljakovin pa pri 280 nm. Koncentracija izolirane RNA je bila podana v ng/ μ l.

3.12 GELSKA ELEKTROFOREZA

S pomočjo gelske elektroforeze smo preverili čistost in stopnjo razgrajenosti izolirane RNA. Rezultate spektrofotometričnih meritev smo uporabili v ta namen, da smo glede na koncentracijo RNA v posameznem vzorcu prilagodili količino vzorca in barvila, ki smo ga nanesli na agarozni gel, da je bila na koncu koncentracija v vseh vzorcih približno enaka. Če je bila izmerjena koncentracija zelo nizka, smo nanesli več vzorca in barvila ter obratno pri velikih koncentracijah.

Za gelsko elektroforezo smo pripravili 1,5 % gel. V erlenmajerici smo zmešali 0,45 g agaroze in 30 ml pufra TAE. Erlenmajerico smo zaprli s čepom iz papirne brisače, da raztopina ni izhlapevala, ko smo jo segrevali v mikrovalovni pečici. Raztopino smo večkrat premešali, dokler se ni agarozna povsem raztopila. Ko se je raztopina nekoliko ohladila, smo ji dodali 0,75 μ l etidijevega bromida. Gel smo razlili v plastičen model z vstavljenimi glavnički in počakali, da se je povsem strdil. Nato smo ga prenesli v elektroforezno banjico s pufrom TAE. Odstranili smo glavničke in v nastale jamice nanesli vzorce izolirane RNA z nanašalnim barvilom 6x DNA Loading Dye (Fermentas). V prvo jamico smo nanesli lestvico Massruler DNA ladder mix, ki nam je kasneje omogočila določitev velikosti posameznih fragmentov naših vzorcev. Elektroforezno banjico smo priklopili na napetost 80 V in jo pustili teči 30 minut. Po končani ločitvi različno velikih fragmentov smo gel pregledali pod UV-svetlobo v transiluminatorju in ga fotografirali.

3.13 DNAZNA REAKCIJA

Izolirano RNA smo pred nadaljnjimi poskusi očistili z DNazno reakcijo. Uporabili smo komplet za DNazno reakcijo podjetja Invitrogen. Najprej smo pripravili ustrezne redčitve RNA, da je bila končna koncentracija 2 μ g v 8 μ l v vseh vzorcih enotna. Nato smo 8 μ l

vzorca RNA dodali 3,4 µl reakcijske mešanice (Tabela 10) in raztopino inkubirali v cikličnem termostatu 15 minut pri 25 °C. Nato smo dodali 1,1 µl EDTA in raztopino inkubirali v cikličnem termostatu 10 minut pri 65 °C.

Tabela 10: Sestava reakcijske mešanice za DNazno reakcijo.

Sestavina	Količina za 1 vzorec
H ₂ O	2,4 µl
pufër	1,1 µl
DNaza	0,2 µl

3.14 OBRATNA TRANSKRIPCIJA

Izolirano RNA smo po čiščenju z DNazo prepisali v cDNA z uporabo kompleta High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (ABI). Vzorce iz DNazne reakcije smo 5 minut inkubirali v cikličnem termostatu pri 80 °C in jih nato takoj predstavili na led. Dodali smo 12,5 µl reakcijske mešanice (Tabela 11) in nastavili program za obratno transkripcijo (Tabela 12). Po končani reakciji smo vzorce shranili pri -20 °C.

Tabela 11: Sestava reakcijske mešanice za obratno transkripcijo.

Sestavina	Količina za 1 vzorec
pufër	2,5 µl
dNTP	1 µl
naključni začetniki	2,5 µl
RNazni inhibitor	1 µl
H ₂ O	4,25 µl
reverzna transkriptaza	1,25 µl

Tabela 12: Program segrevanja in ohlajanja za obratno transkripcijo.

Temperatura	Trajanje
25 °C	10 min
37 °C	120 min
4 °C	ohlajanje

3.15 PCR V REALNEM ČASU

Za analizo prisotnosti virusnih delcev v posameznem divjem sorodniku krompirja smo uporabili verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (qPCR) (Kogovšek in sod., 2008). S to metodo je omogočeno istočasno pomnoževanje in zaznavanje nastalega produkta (Invitrogen, 2013).

V naši raziskavi smo želeli izvedeti, ali se je virus uspešno namnožil v gostiteljski rastlini in prešel v zgornje liste, absolutne količine virusa v vzorcih pa nismo določali. Za potrditev, da so naši vzorci zares vsebovali RNA, smo uporabili referenčni gen za citokrom oksidazo (*cox*). Najprej smo pripravili 10× in 100× redčitve vzorcev, ker so vsebovali encime, ki lahko vplivajo na reakcije. Nato smo pripravili reakcijsko mešanico (Tabela 13), ki je vsebovala TaqMan Master Mix in cDNA. Na reakcijsko ploščico s 384 jamicami smo odpipetirali vzorce. In sicer vsak vzorec v dve jamici in še dodatno negativno kontrolo, pri kateri smo namesto vzorca v reakcijsko mešanico dodali destilirano vodo. Reakcije qPCR so potekale v napravi 7900HT (Applied Biosystems). Po končani reakciji računalniški program SDS v2.3 (Applied Biosystems) opravi analizo in rezultate pomnoževanja grafično prikaže. Avtomatsko nastavimo bazno linijo, ročno pa linijo prazne vrednosti (treshold) pri vrednosti 0,1.

Z metodo smo pridobili podatke za 10× in 100× redčitev naših vzorcev in podatke o količini referenčnega gena *cox*. Izračunali smo relativno količino RNA od PVY^{NTN} glede na izražanje gena *cox* in nato izračunali še povprečno relativno vrednost med rastlinami posameznega divjega sorodnika.

Tabela 13: Sestava reakcijske mešanice za qPCR.

Sestavina	Količina
cDNA	2 µl
začetni oligonukleotidi in sonda	0,5 µl
TaqMan Master Mix	2,5 µl

3.16 ISTOČASNA AGROINFILTRACIJA S pTRV1 IN pTRV2 IN INOKULACIJA S PVY^{NTN}

Želeli smo preveriti vpliv istočasne agroinfiltracije z virusnima vektorjema pTRV1 in pTRV2 in virusne inokulacije s PVY^{NTN} na različne divje sorodnike krompirja. Divje sorodnike krompirja smo najprej agroinfiltrirali z agrobakterijami, ki so vsebovale konstrukta pTRV1 in pTRV2. V poskus nismo vključili utišanja gena za fitoen desaturazo. Po dvajsetih dneh opazovanja poskusnih rastlin je sledila inokulacija z virusom. Posamezne rastline različnih divjih sorodnikov krompirja smo razdelili v 4 skupine:

1x KK – kontrolna rastlina brez agroinfiltracije in virusne inokulacije.

2x K – kontrolni rastlini, ki smo ju samo agroinfiltrirali.

3x MOCK – rastline, ki smo jih agroinfiltrirali in inokulirali z rastlinskim sokom brez virusa.

5x PVY^{NTN} – rastline, ki smo jih agroinfiltrirali in inokulirali z virusom PVY^{NTN}.

Po štirinajstih dneh opazovanja smo pobrali po dva zgornja lista rastlin PVY^{NTN} in MOCK vsakega divjega sorodnika krompirja. Vzorce smo shranili pri -80 °C. Spodnje liste od pobranih smo homogenizirali, izolirali RNA, izvedli spektrofotometrične meritve, DNazno reakcijo, reverzno transkripcijo in qPCR.

3.17 KONFOKALNA MIKROSKOPIJA

Konfokalna mikroskopija omogoča pregled objekta po optičnih rezinah. Optične rezine lahko s pomočjo programske opreme sestavimo v tridimenzionalno sliko objekta, ki ima mnogo večjo globinsko ločljivost kot tista, pridobljena s konvencionalnim fluorescentnim mikroskopom (Leica microsystems, 2013).

S konfokalnim mikroskopom smo opazovali dele listov vseh različnih divjih sorodnikov krompirja, ki so predstavljeni v tabeli 1. Inokulirali smo jih z rastlinskim sokom pridobljenim iz zamrznjenih listov tobaka, ki je bil okužen z virusom PVY^N, označenim z zelenim fluorescenčnim proteinom (GFP). Pobrali smo po dva spodnja okužena lista in en

kontrolni list ter po dva zgornja neinokulirana lista in kontrolni list vsakega divjega sorodnika krompirja. Liste smo položili v petrijevko, s skalpelom izrezali majhen kvadrat površine 0,5x0,5 cm in dodali perfluorodekalin, ki izboljša optično prevodnost. Koščke listov smo opazovali s strani spodnje povrhnjice s konfokalnim mikroskopom Leica TCS SP5 na Kemijskem inštitutu v Ljubljani. Ozadje je fluoresciralo v rdeči barvi, zajem slike smo nastavili od 690 do 750 nm, GFP pa v zeleni barvi od 505 do 520 nm.

3.18 AGROINFILTRACIJA

Metodo smo uporabili za vnos virusnega vektorja v rastlinski material, ki je del postopka VIGS.

1. dan: prestavitev bakterij iz trajne kulture v gojišče LB

V 20 ml gojišča LB smo sterilno dodali 20 μ l kanamicina, da smo dosegli želeno koncentracijo 50 μ g/ml (založna koncentracija je bila 50 mg/ml) in 4 μ l rifampicina, da smo dosegli koncentracijo 10 μ g/ml (založna koncentracija je bila 50 mg/ml). Po 3 ml gojišča smo sterilno prenesli v 6 falkonk. Iz trajne kulture smo vzeli bakterije *Agrobacterium tumefaciens* s tremi različnimi konstrukti pTRV1, pTRV2 in pTRV2-PDS. Vsak konstrukt smo z nastavkom avtomatske pipete prenesli v 2 falkonki, ki smo jih nato čez noč stresali na stresalniku pri 30 °C in 200 rpm.

2. dan: prestavitev bakterij v gojišče YEB

S pomočjo spektrofotometra smo izmerili optično gostoto (OD) gojišča z bakterijami iz dneva 1. V kiveto smo dali po 100 μ l vzorca, za slepo kontrolo smo uporabili neinokulirano gojišče LB z antibiotikoma. Iz izmerjene optične gostote smo s pomočjo enačb izrazili, koliko bakterij v gojišču LB smo morali prestaviti v gojišče YEB, da smo dobili želeno končno koncentracijo (enačbi 1,2).

Δt = čas rasti bakterij v gojišču LB

$$- z = \frac{80000}{2^2} \quad \dots(1)$$

$$- x = \frac{z}{OD} \quad \dots(2)$$

$$- \text{količina bakterij v LB, ki jih prenesemo} = x \times 0,15(\mu\text{l}) \quad \dots(3)$$

V dveh falkonkah smo pripravili po 45 ml gojišča YEB. V vsako smo dodali 45 μl kanamicina za končno koncentracijo 50 $\mu\text{g/ml}$ (založna koncentracija je bila 50 mg/ml) in 9 μl rifampicina za končno koncentracijo 10 $\mu\text{g/ml}$ (založna koncentracija je bila 50 mg/ml). Po 15 ml tako pripravljenega gojišča smo prenesli v 6 falkonk in vanje dodali ustrezne količine bakterij v gojišču LB (enačba 3). Falkonke smo čez noč stresali na stresalniku pri 30 °C in 200 rpm.

3. dan: prestavitev bakterij v infiltracijski pufer MMA in agroinfiltracija

Bakterijski material v falkonkah smo tretji dan najprej centrifugirali 10 minut pri 4000 rpm. Nato smo supernatant z gojiščem odlili. Bakterijski pelet smo resuspendirali v 15 ml gojišča MMA in izmerili OD s pomočjo spektrofotometra. Izračunali smo, koliko gojišča MMA v ml smo morali še dodati za končni OD 0,3 (enačba 4).

$$- x = \frac{OD}{0,3 \times 15 - 15} \quad \dots(4)$$

V dveh svežih falkonkah smo zmešali bakterije s konstruktoma pTRV1 in pTRV2 ter pTRV1 in pTRV2-PDS v razmerju 1:1 in jih za aklimatizacijo inkubirali na sobni temperaturi 1 do 6 h.

Rastline smo agroinfiltrirali z brizgo skozi spodnjo povrhnjico. Rastline, ki smo jih agroinfiltrirali z mešanico bakterij s pTRV1 in pTRV2, torej praznima vektorjema brez gena za PDS, so služile za negativno kontrolo.

3.19 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV

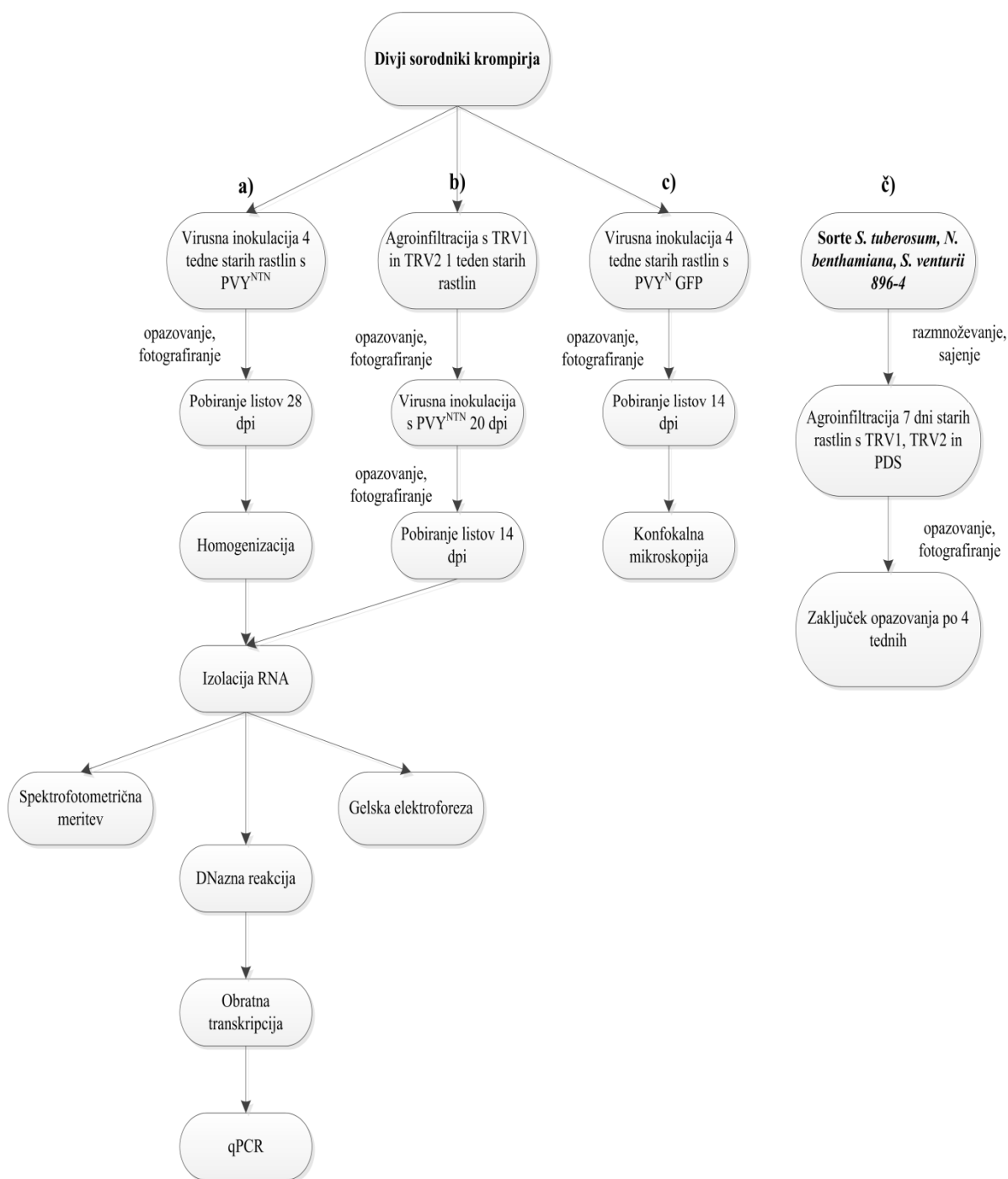
Za statistično obdelavo podatkov smo uporabili Studentov t-test (računalniški program Microsoft Excel). Iskali smo prisotnost statistično značilne razlike med posameznimi vzorci in med kontrolnimi ter testnimi rastlinami ($p \leq 0,05$).

3.20 SHEMA DELA

Potek dela v okviru magistrske naloge je opisan v spodnji shemi (Slika 8). Poskusi so v tkivnih kulturah in rastlinjaku potekali od 29.2.2012 do 3.10.2012. Laboratorijsko delo se je nadaljevalo še nekoliko dlje. Divje sorodnike krompirja (Tabela 1) in sorte krompirja *Solanum tuberosum* L. (Tabela 2) smo posadili 9.3.2012 in z opazovanjem zaključili po štirih (VIGS) oziroma šestih tednih (Testiranje divjih sorodnikov krompirja na okužbo s PVY^{NTN}). Za poskus sledenja okužbe s PVY^N s konfokalnim mikroskopom in istočasne agroinfiltracije in inokulacije s PVY^{NTN} smo divje sorodnike krompirja (Tabela 1) posadili 27.8.2012 in z opazovanjem zaključili po šestih tednih.

Slika 8: Shema dela.

Na shemi dela so s črkami označeni različni deli raziskave v okviru magistrske naloge. Skrajno levo je s črko a) označen potek dela za poskus testiranja divjih sorodnikov krompirja, okuženih z virusom PVY^{NTN}. Označena s črko b) sledi shema poskusa istočasne agroinfiltracije in inokulacije s PVY^{NTN}, s črko c) je označena shema dela za sledenje okužbe s PVY^N s konfokalnim mikroskopom in skrajno desno pod črko č) še potek testiranja metode VIGS na različnih sortah krompirja.



4 REZULTATI

4.1 TESTIRANJE DIVJIH SORODNIKOV KROMPIRJA NA OKUŽBO S PVY^{NTN}

Za inokulacijo z virusom PVY^{NTN} smo uporabili 15 različnih divjih sorodnikov krompirja, ki so se v predhodnih raziskavah na Nacionalnem inštitutu za biologijo izkazali za najbolj primerne za nadaljnje raziskave. Potek dela je opisan v več korakih, ki so predstavljeni na sliki 8 in podrobneje opisani v poglavju Materiali in metode.

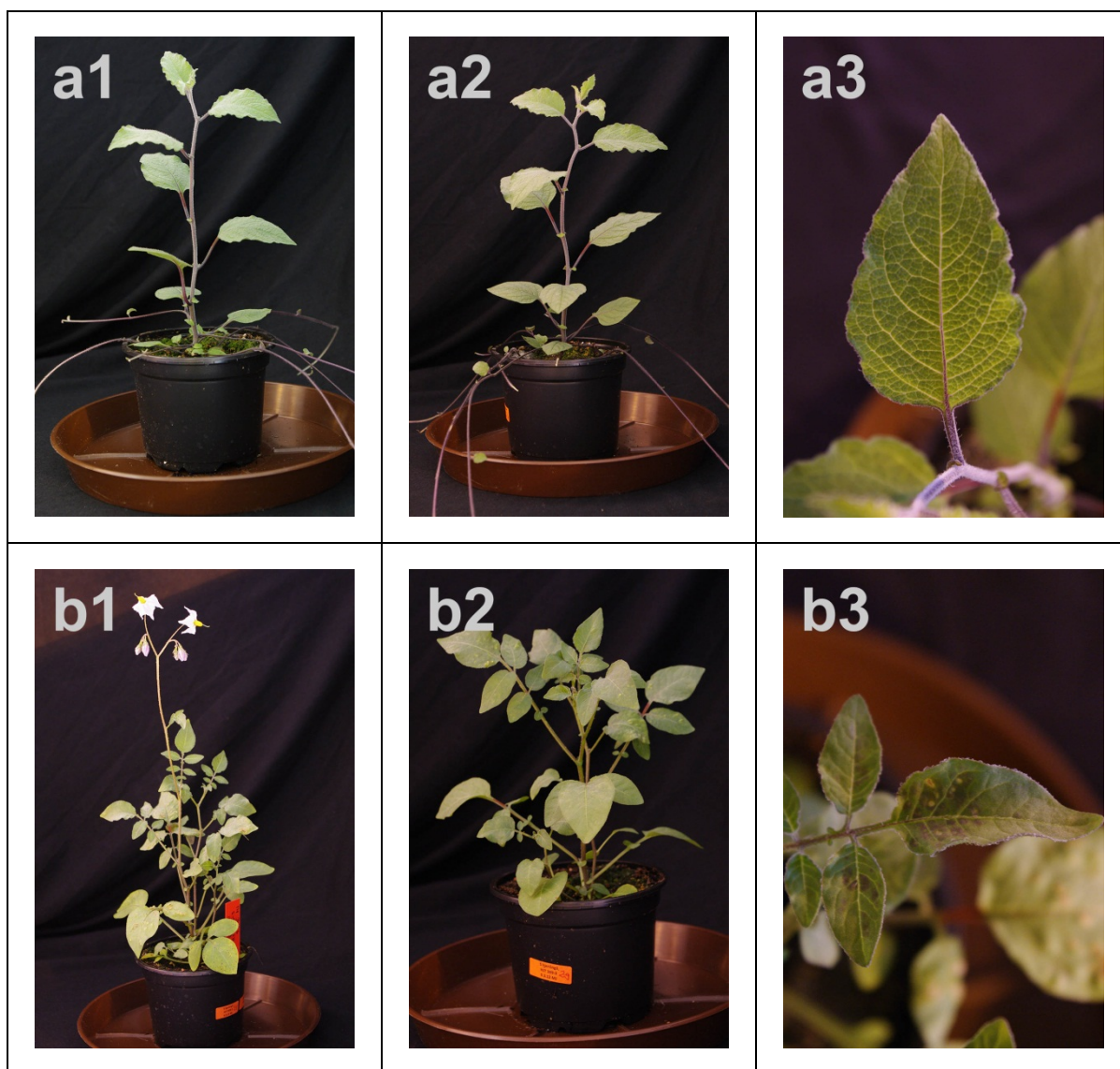
Po okužbi smo opazovali razlike v morfologiji med petimi kontrolnimi (MOCK) in petimi testnimi rastlinami (PVY^{NTN}) vsakega divjega sorodnika, ki smo jih tudi redno fotografirali. Iz rezultatov različnih meritev smo sklepali na uspešnost okužbe in širjenja virusa v posameznem divjem sorodniku krompirja ter posledično na odpornost proti okužbi z virusom PVY^{NTN}.

Opazili smo, da so se morfološke spremembe, ki so se razlikovale od kontrolnih rastlin pojavile pri divjih sorodnikih *S. lesteri* in *S. bulbocastanum*. Rezultati qPCR so pokazali, da se je virus uspešno razmnožil v vseh divjih sorodnikih in prešel v zgornje neokužene liste.

Pri nekaterih slepo okuženih rastlinah MOCK so se pojavile morfološke spremembe, ki smo jih natančno spremljali in fotografirali ter jih primerjali s spremembami okuženih rastlin, da smo kasneje lahko sklepali, katere so resnično posledica virusne okužbe. Pogosto so se pojavljale nekroze, kloroze, kalusno tkivo in rumenenje listov. Pri nekaterih divjih sorodnikih krompirja je prišlo celo do zvijanja in odpadanja listov. Povsem brez vidnih morfoloških sprememb (oz. brez posebnosti - BP) so bile le rastline divjih sorodnikov krompirja *S. bulbocastanum* (Slika 9a1), *S. mochiquense* (Slika 11d1), *S. venturii* 896-4 (Slika 16n1) in *S. venturii* 741-1 (Slika 15m1).

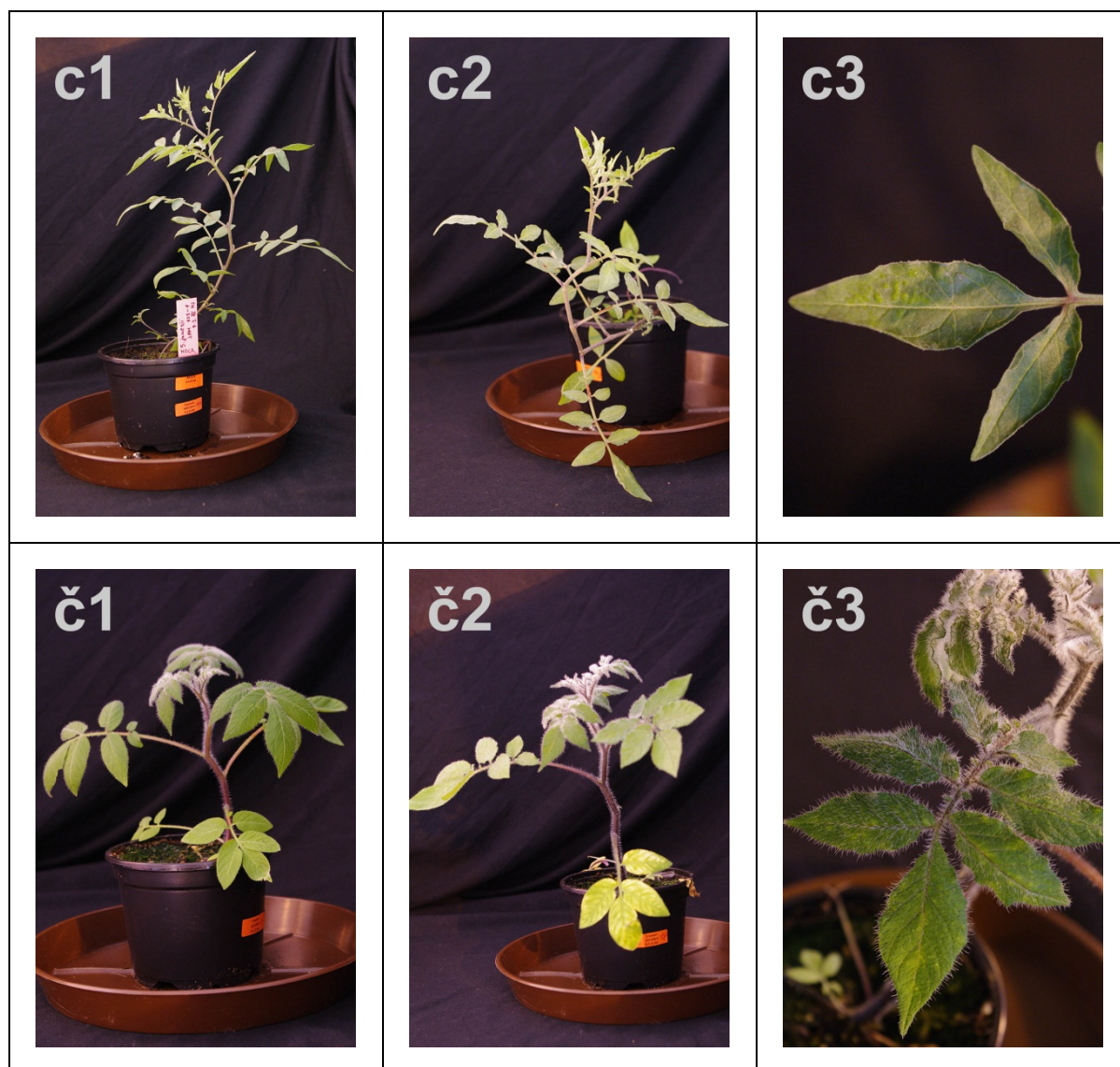
Pri divjih sorodnikih krompirja, ki smo jih inokulirali z virusom PVY^{NTN}, smo opazili kar nekaj različnih morfoloških sprememb. Povsem brez posebnosti so ostali *S. venturii* 283-1 (Slika 14j2, j3), *S. venturii* 365-1 (Slika 14k2, k3) in *S. venturii* 896-4 (Slika 16n2, n3). Pri

ostalih so se pojavljali simptomi, ki so bili večinoma prisotni tudi pri kontrolnih rastlinah. Najbolj opazna razlika med kontrolnimi in okuženimi rastlinami je bila pri vrstah *S. lesteri* (Slika 10č2, č3) in *S. bulbocastanum* (Slika 9a2, a3). Pri prvem smo opazili mozaično klorozo, pri slednjem pa klorozo. Teh morfoloških sprememb pri kontrolnih rastlinah ni bilo.



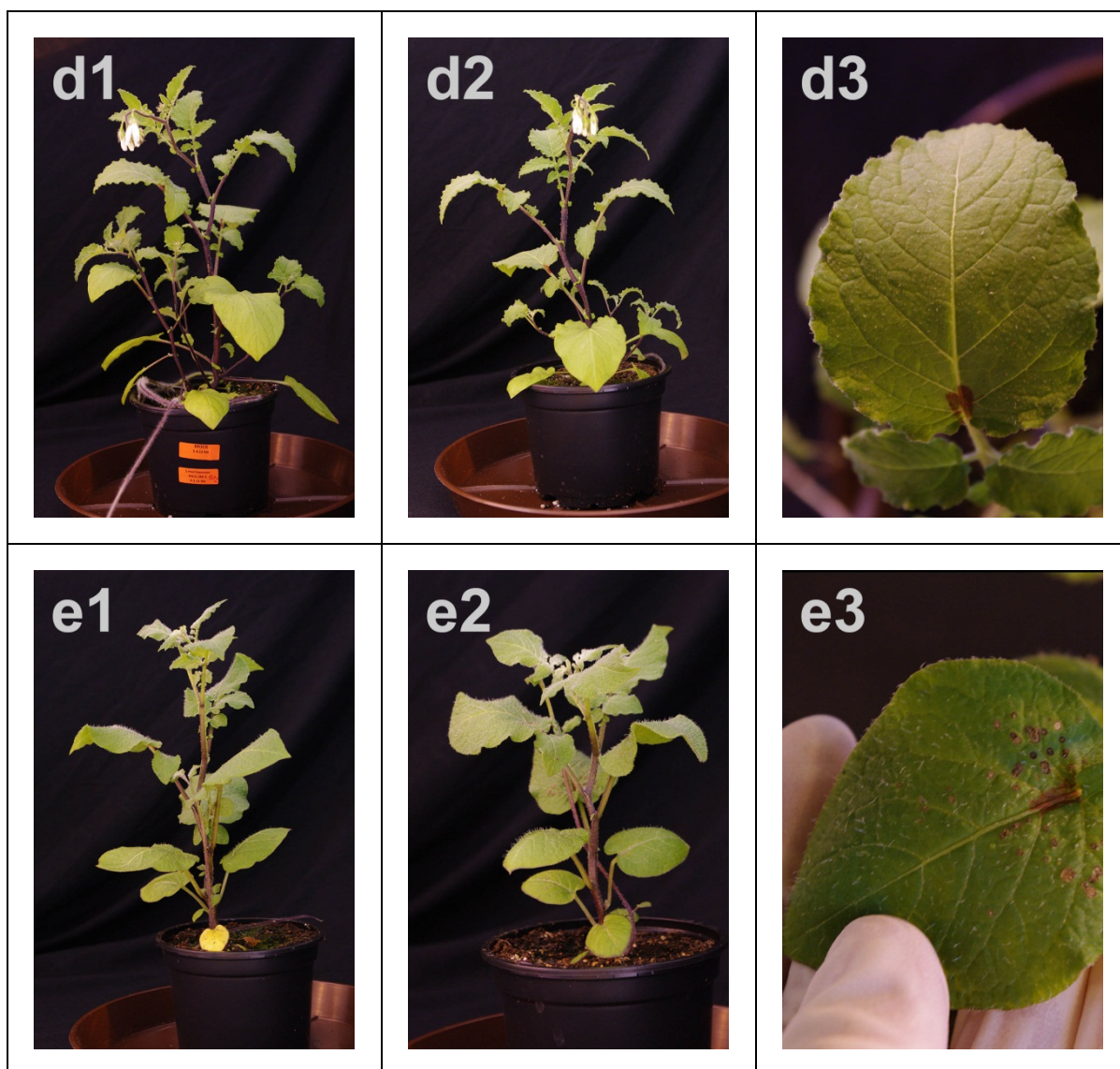
Slika 9: Fotografije rastlin MOCK in s PVY^{NTN} inokuliranih rastlin *S. bulbocastanum* in *S. hjertingii*.

V levem stolpcu je z oznako 1 predstavljena kontrolna rastlina (MOCK), v srednjem stolpcu z oznako 2 rastlina infiltrirana s PVY^{NTN} in v desnem stolpcu z oznako 3 posamezen list rastline, inokulirane s PVY^{NTN} z vidnimi morfološkimi spremembami. Divji sorodniki krompirja so označeni s črkami (a) *S. bulbocastanum*, (b) *S. hjertingii*.



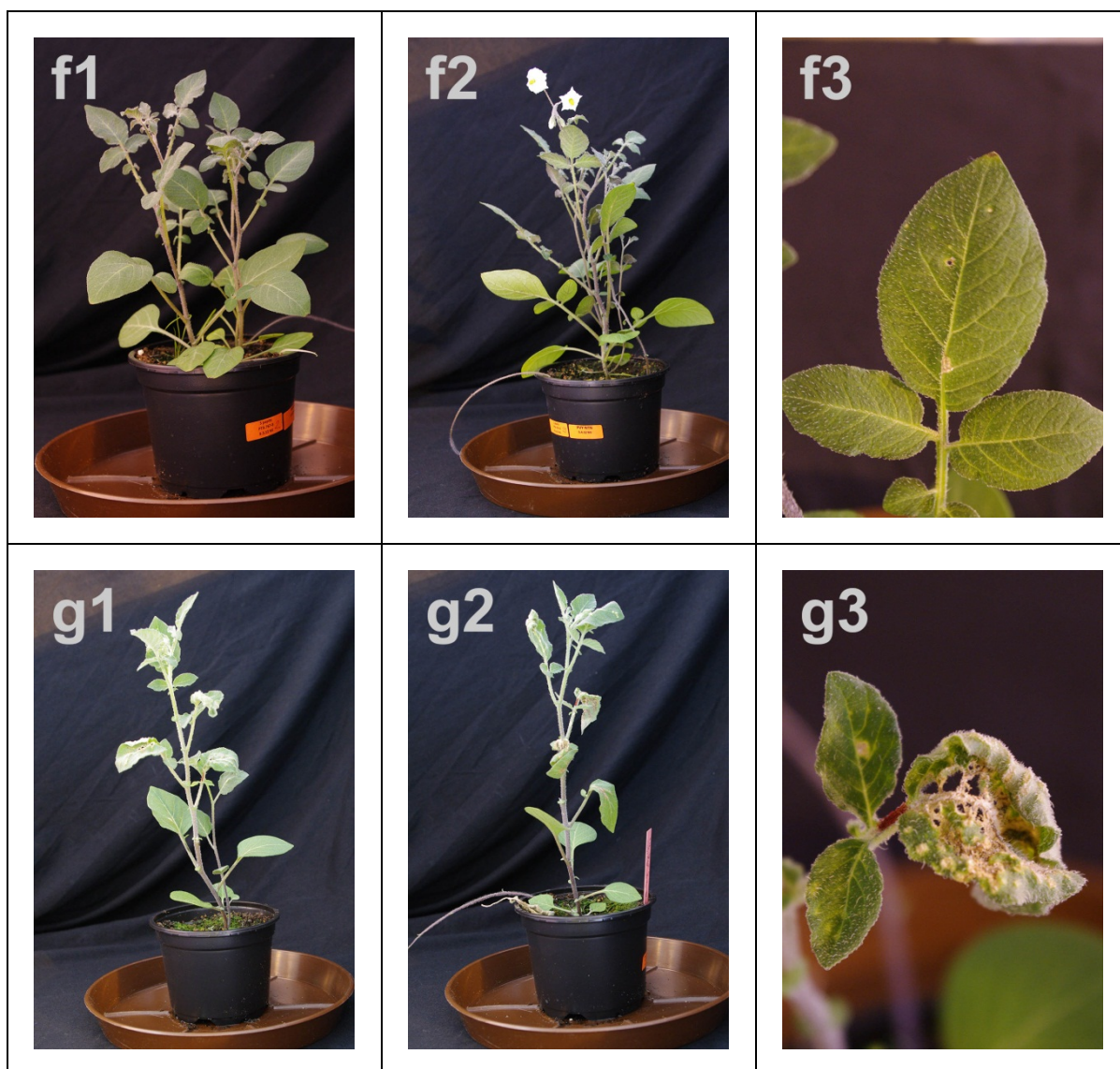
Slika 10: Fotografije rastlin MOCK in s PVY^{NTN} inokuliranih rastlin *S. jamesii* in *S. lesteri*.

V levem stolpcu je z oznako 1 predstavljena kontrolna rastlina (MOCK), v srednjem stolpcu z oznako 2 rastlina infiltrirana s PVY^{NTN} in v desnem stolpcu z oznako 3 posamezen list rastline, inokulirane s PVY^{NTN} z vidnimi morfološkim spremembami. Divji sorodniki krompirja so označeni s črkami (c) *S. jamesii*, (č) *S. lesteri*.



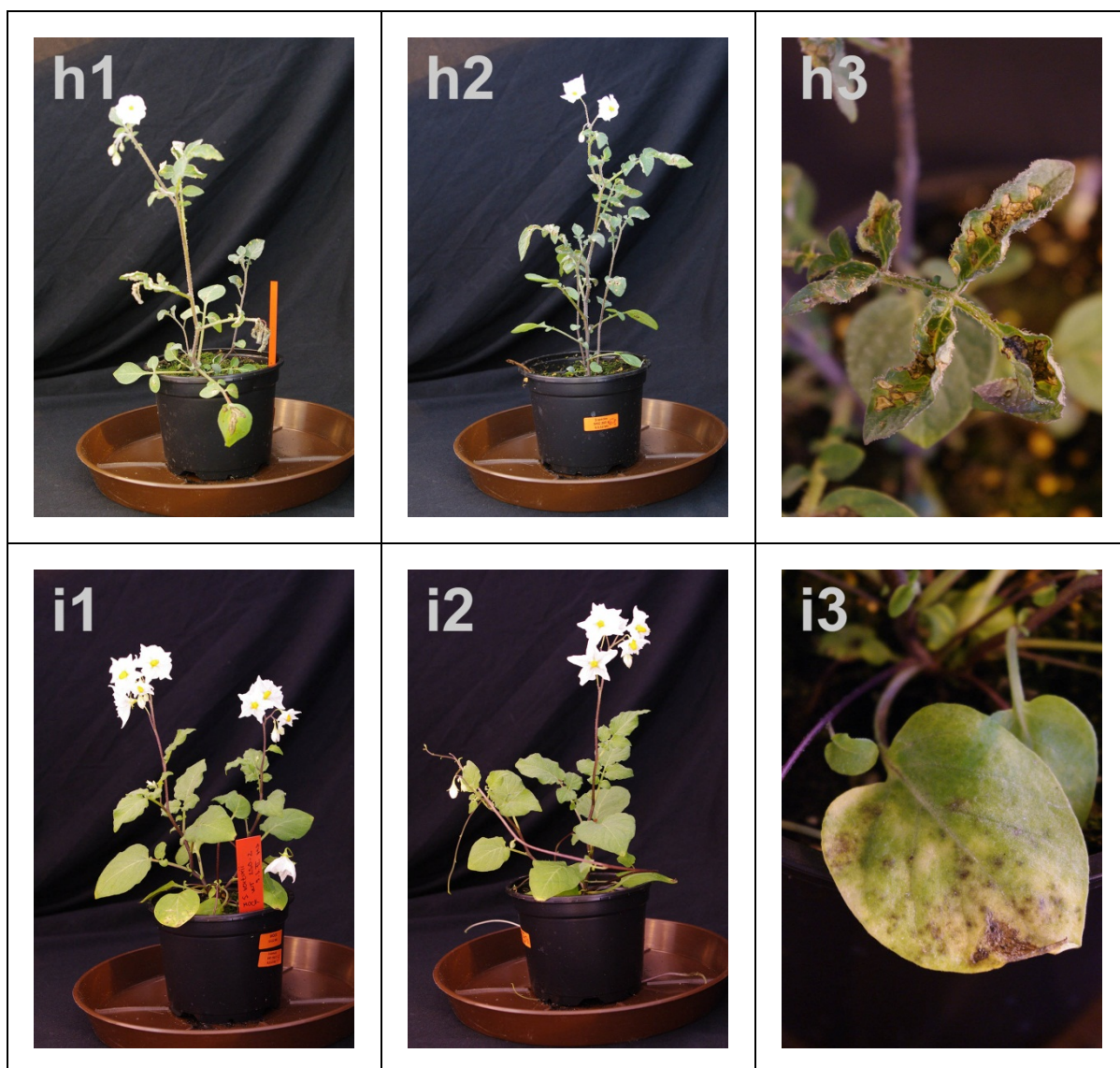
Slika 11: Fotografije rastlin MOCK in s PVY^{NTN} inokuliranih rastlin *S. mochiquense* in *S. okade*.

V levem stolpcu je z oznako 1 predstavljena kontrolna rastlina (MOCK), v srednjem stolpcu z oznako 2 rastlina infiltrirana s PVY^{NTN} in v desnem stolpcu z oznako 3 posamezen list rastline, inokulirane s PVY^{NTN} z vidnimi morfološki spremembami. Divji sorodniki krompirja so označeni s črkami (d) *S. mochiquense*, (e) *S. okade*.



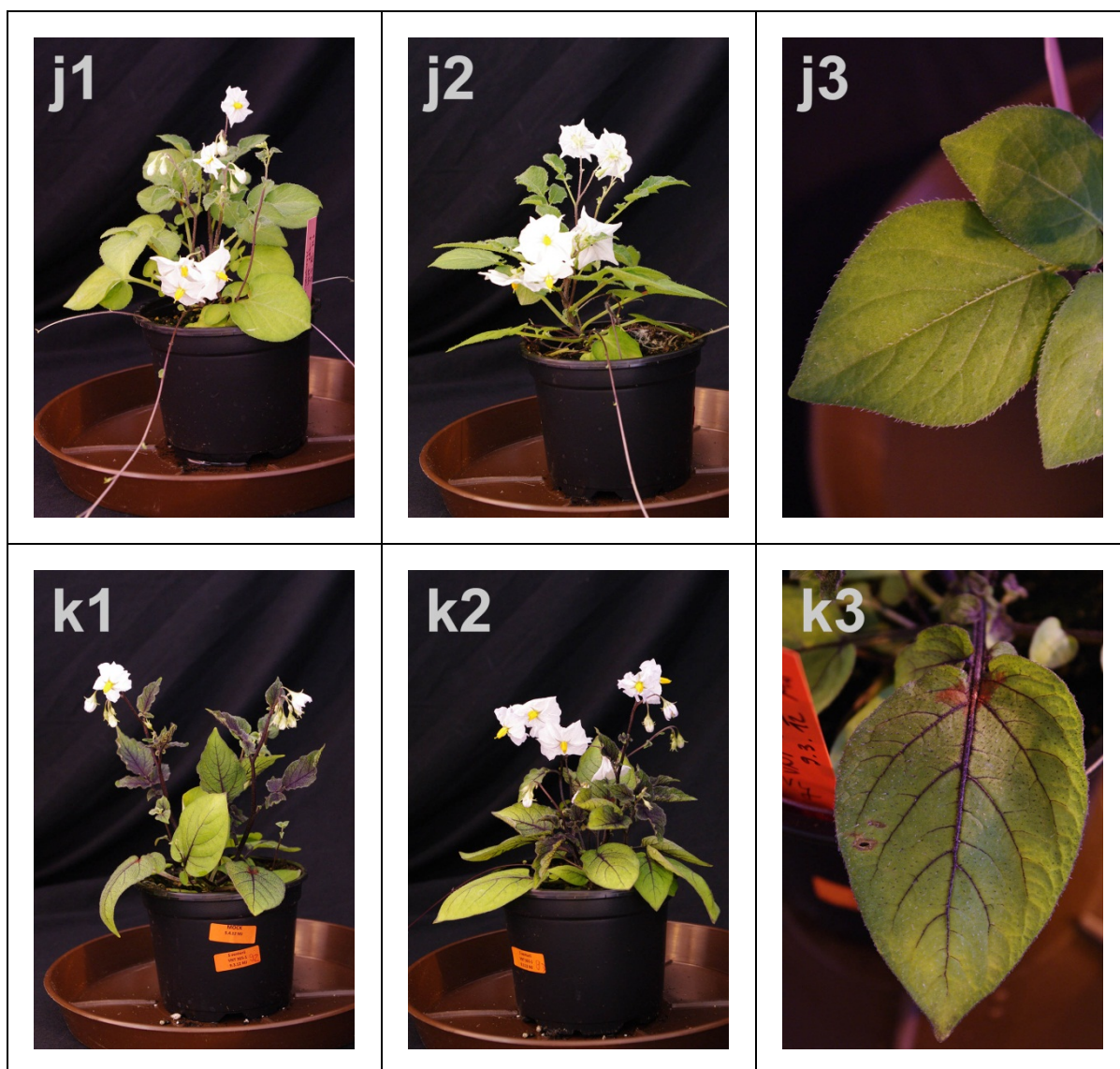
Slika 12: Fotografije rastlin MOCK in s PVY^{NTN} inokuliranih rastlin *S. papita* in *S. polytrichon*.

V levem stolpcu je z oznako 1 predstavljena kontrolna rastlina (MOCK), v srednjem stolpcu z oznako 2 rastlina infiltrirana s PVY^{NTN} in v desnem stolpcu z oznako 3 posamezen list rastline, inokulirane s PVY^{NTN} z vidnimi morfološkimi spremembami. Divji sorodniki krompirja so označeni s črkami (f) *S. papita*, (g) *S. polytrichon*.



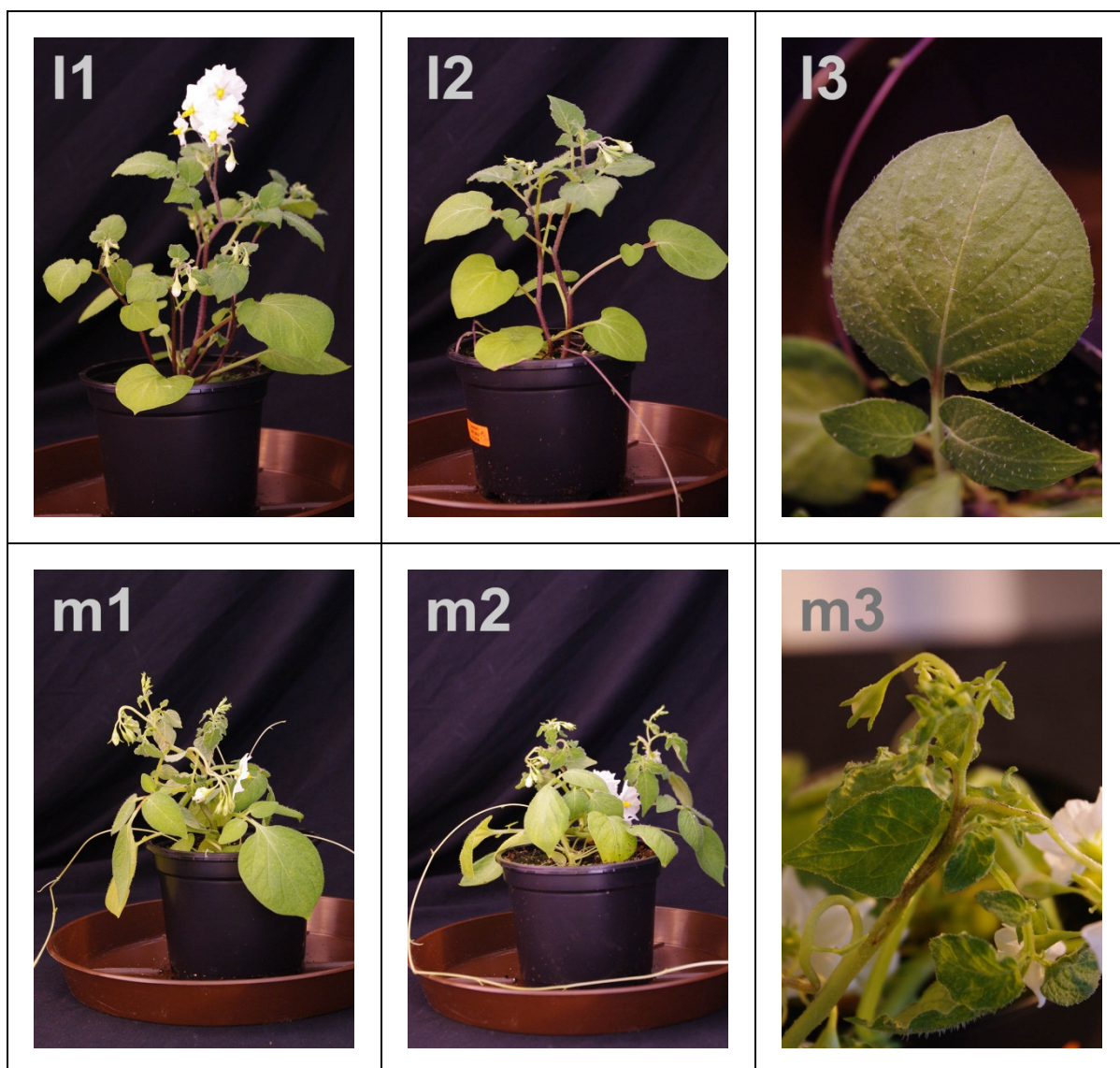
Slika 13: Fotografije rastlin MOCK in s PVY^{NTN} inokuliranih rastlin *S. sp.* in *S. venturii* 250-2.

V levem stolpcu je z oznako 1 predstavljena kontrolna rastlina (MOCK), v srednjem stolpcu z oznako 2 rastlina infiltrirana s PVY^{NTN} in v desnem stolpcu z oznako 3 posamezen list rastline, inokulirane s PVY^{NTN} z vidnimi morfološkimi spremembami. Divji sorodniki krompirja so označeni s črkami (h) *S. sp.*, (i) *S. venturii* 250-2.



Slika 14: Fotografije rastlin MOCK in s PVY^{NTN} inokuliranih rastlin *S. venturii* 283-1 in *S. venturii* 365-1.

V levem stolpcu je z oznako 1 predstavljena kontrolna rastlina (MOCK), v srednjem stolpcu z oznako 2 rastlina infiltrirana s PVY^{NTN} in v desnem stolpcu z oznako 3 posamezen list rastline, inokulirane s PVY^{NTN} z vidnimi morfološkimi spremembami. Divji sorodniki krompirja so označeni s črkami (j) *S. venturii* 283-1, (k) *S. venturii* 365-1.



Slika 15: Fotografije rastlin MOCK in s PVY^{NTN} inokuliranih rastlin *S. venturii* 366-2 in *S. venturii* 741-1.

V levem stolpcu je z oznako 1 predstavljena kontrolna rastlina (MOCK), v srednjem stolpcu z oznako 2 rastlina infiltrirana s PVY^{NTN} in v desnem stolpcu z oznako 3 posamezen list rastline, inokulirane s PVY^{NTN} z vidnimi morfološkim spremembami. Divji sorodniki krompirja so označeni s črkami (l) *S. venturii* 366-2, (m) *S. venturii* 741-1.

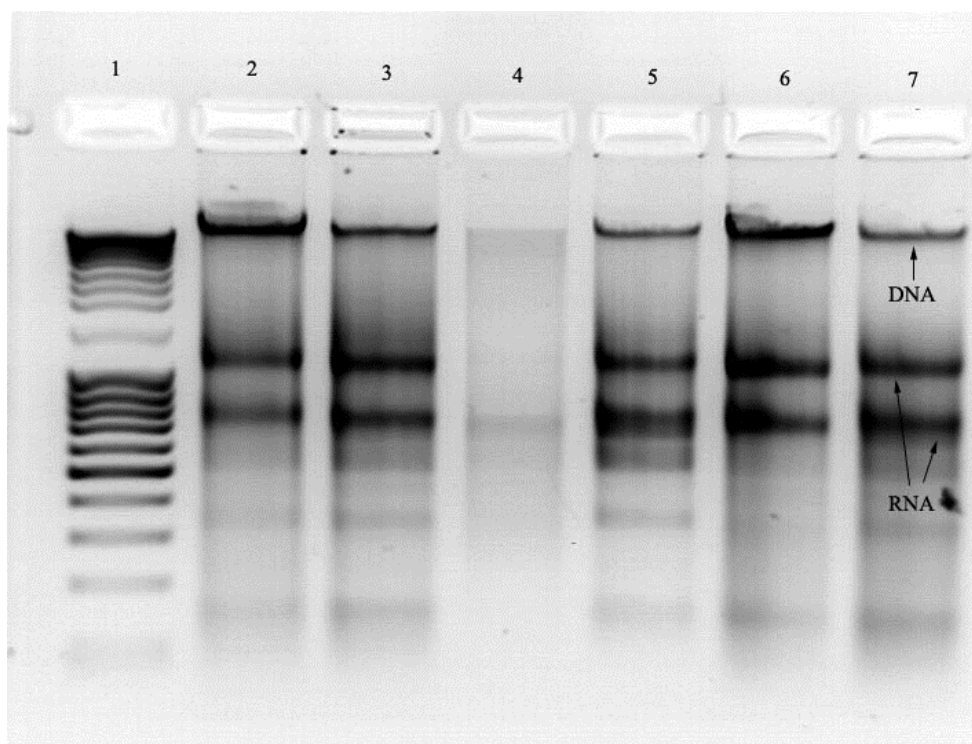


Slika 16: Fotografije rastlin MOCK in s PVY^{NTN} inokuliranih rastlin *S. venturii* 896-4.

V levem stolpcu je z oznako 1 predstavljena kontrolna rastlina (MOCK), v srednjem stolpcu z oznako 2 rastlina infiltrirana s PVY^{NTN} in v desnem stolpcu z oznako 3 posamezen list rastline, inokulirane s PVY^{NTN} z vidnimi morfološki spremembami. Divji sorodniki krompirja so označeni s črko (n) *S. venturii* 896-4.

4.1.1 Izolacija RNA in gelska elektroforeza

Po izolaciji RNA iz rastlin divjih sorodnikov krompirja (Tabela 1) smo uspešnost in čistost izolacije pri vseh vzorcih preverili z gelsko elektroforezo. Rezultat je slika potovanja različno velikih fragmentov vzorcev in standarda, iz katere je razvidno, da je bila izolacija RNA uspešna, opazna pa je tudi prisotnost manjše količine DNA. Na sliki 10 je primer gelske elektroforeze za 6 različnih vzorcev. Vzorec številka 4 je slabše viden, ker je bila prisotna manjša količina RNA. To je bilo razvidno že iz spektrofotometrične meritve. Kljub redčenju ostalih vzorcev je vzorec številka 4 vseboval tako malo izolirane RNA, da koncentracije nismo uspeli izenačiti. Pri vseh vzorcih smo potrdili ustrezno izolacijo in čistost RNA, torej so bili vsi primerni za nadaljnje poskuse.



Slika 17: Gelska elektroforeza.

1) Standardna lestvica Massruler DNA ladder mix. 2-7) Izolirana RNA šestih različnih vzorcev. 2) *S. bulbocastanum*, 3) *S. sp.*, 4-7) *S. lesteri*. S puščicami so označeni zgornji temni pas na gelu, ki predstavlja ostanke DNA, spodnja dva pasova pa izolirano RNA.

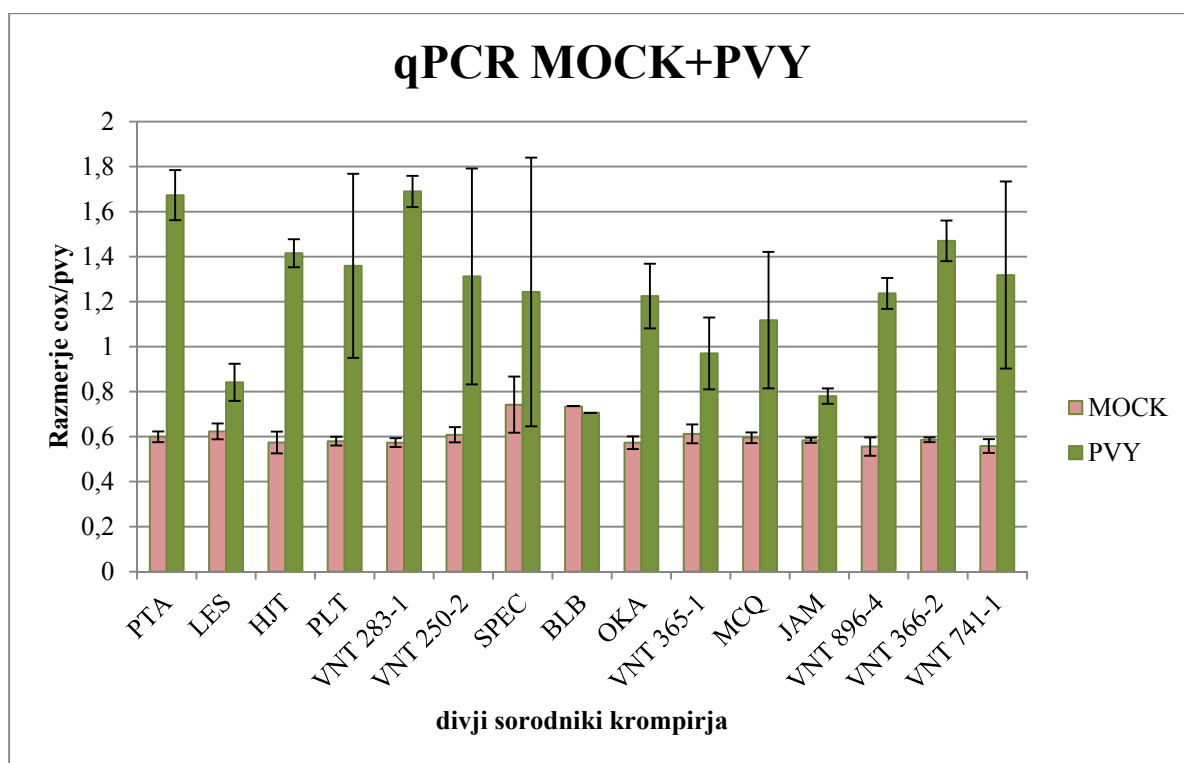
4.1.2 Prisotnost virusa PVY^{NTN} v divjih sorodnikih krompirja merjena s qPCR

Po končani verižni reakciji s polimerazo v realnem času smo pridobili podatke o količini virusnih delcev v posameznem divjem sorodniku krompirja. Podatki so bili podani v obliki C_q, ki predstavlja število ciklov pomnoževanja, ki so potrebni, da fluorescenca posameznega vzorca preseže določeno prazno vrednost. Manj ciklov pomnoževanja je potrebnih pri vzorcih z večjo količino izhodiščnega dednega materiala (Principles of qPCR, 2009).

Med posameznimi kontrolnimi rastlinami divjih sorodnikov ni bilo statistično značilne razlike v relativni vsebnosti virusne RNA na podlagi Studentovega t-testa ($p > 0,05$).

Pri divjih sorodnikih, ki smo jih inokulirali z virusom PVY^{NTN} se pojavljajo razlike v relativni vsebnosti virusne RNA med vzorci ($p \leq 0,05$).

Rezultati qPCR za kontrolne in inokulirane rastline so predstavljeni na skupnem grafu. Podatke smo obdelali s Studentovim t-testom, s katerim smo primerjali relativno vsebnost virusne RNA v kontrolnih in inokuliranih rastlinah. Ugotovili smo statistično značilno razliko v vsebnosti med rastlinami MOCK in okuženimi rastlinami ($p \leq 0,05$) pri vseh divjih sorodnikih razen pri *S. species* in *S. bulbocastanum*. Rezultat lahko pripišemo zelo veliki standardni napaki v meritvah pri *Solanum* sp. in premajhnemu številu meritev pri *S. bulbocastanum*. Pri okuženih rastlinah divjega sorodnika krompirja *S. bulbocastanum* je izmerjena celo manjša vsebnost virusne RNA kot pri MOCK-rastlinah. V tem primeru ne moremo trditi, da je bil ta divji sorodnik krompirja uspešno okužen z virusom, saj smo virusno okužbo zaznali le pri 1 od 3 poskusnih rastlin.

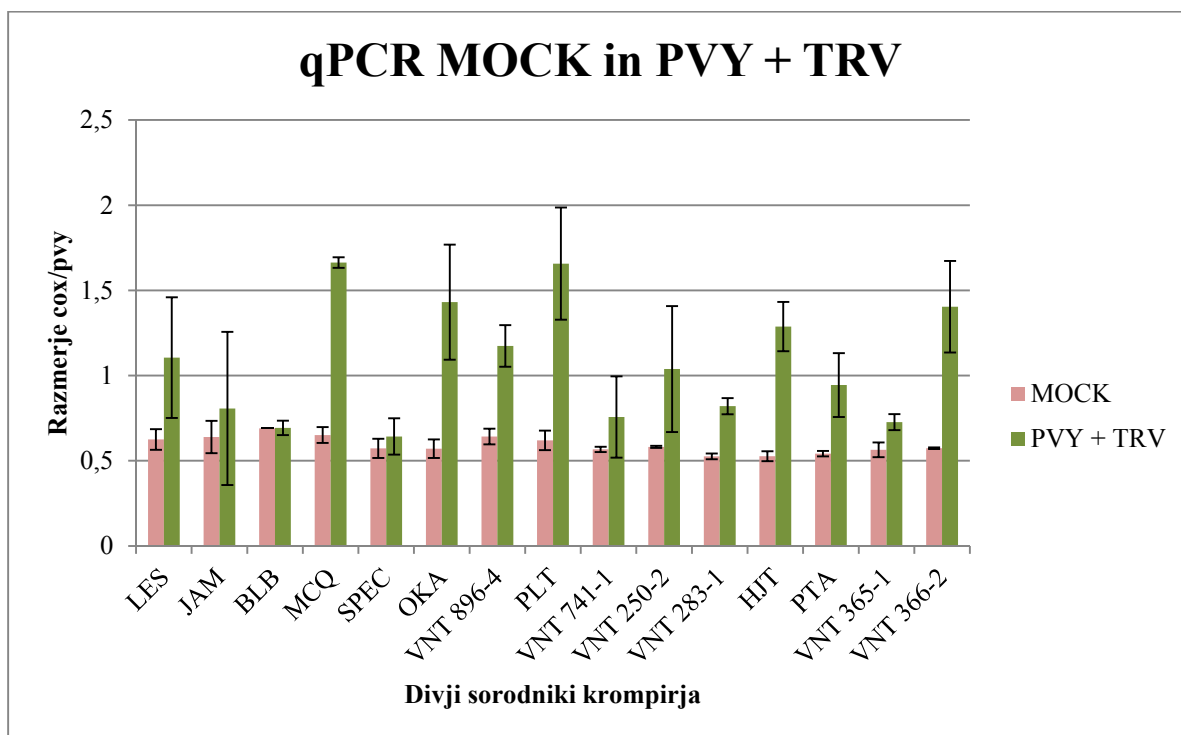


Slika 18: Vsebnost PVY v neokuženih (MOCK) rastlinah in okuženih s PVY, izmerjena s qPCR.

Prikazana je relativna prisotnost RNA virusa pri različnih divjih sorodnikih krompirja, izražena kot razmerje med vsebnostjo referenčnega gena *cox* in vsebnostjo PVY v vzorcih. Prikazane so srednje vrednosti \pm standardna napaka (N= 6). Divji sorodniki krompirja so označeni s krajšimi oznakami (Tabela 1).

4.2 REZULTATI ISTOČASNE AGROINFILTRACIJE IN INOKULACIJE S PVY^{NTN}

Z zaporednim okuževanjem divjih sorodnikov krompirja z virusnim vektorjem TRV in inokulacijo z virusom PVY^{NTN} smo želeli ugotoviti odziv rastline na virusno okužbo, če je en virus v rastlini že predhodno prisoten. Zanimalo nas je, če TRV-vektor onemogoči razmnoževanje virusa. Vsebnost PVY, ki smo jo pridobili z uporabo qPCR, je predstavljena na sliki 12.



Slika 19: Vsebnost PVY v neokuženih (MOCK) in okuženih PVY rastlinah, ki smo jih predhodno agroinfiltrirali z virusnim vektorjem TRV.

Prikazana je relativna prisotnost RNA virusa pri različnih divjih sorodnikih krompirja, izražena kot razmerje med vsebnostjo referenčnega gena *cox* in vsebnostjo PVY v vzorcih. Prikazane so srednje vrednosti \pm standardna napaka (N= 6 pri MOCK in 10 pri PVY^{NTN}). Divji sorodniki krompirja so označeni s krajšimi oznakami (Tabela 1).

Primerjali smo vsebnost virusne RNA v kontrolnih in agroinfiltriranih ter inokuliranih rastlinah. Ugotovili smo statistično značilno razliko v vsebnosti virusne RNA med MOCK in okuženimi rastlinami ($p \leq 0,05$) pri vseh divjih sorodnikih razen pri *S. jamesii*, *S. bulbocastanum*, *S. sp.* in *S. venturii* 741-1. O uspešnosti virusne okužbe in razmnoževanja

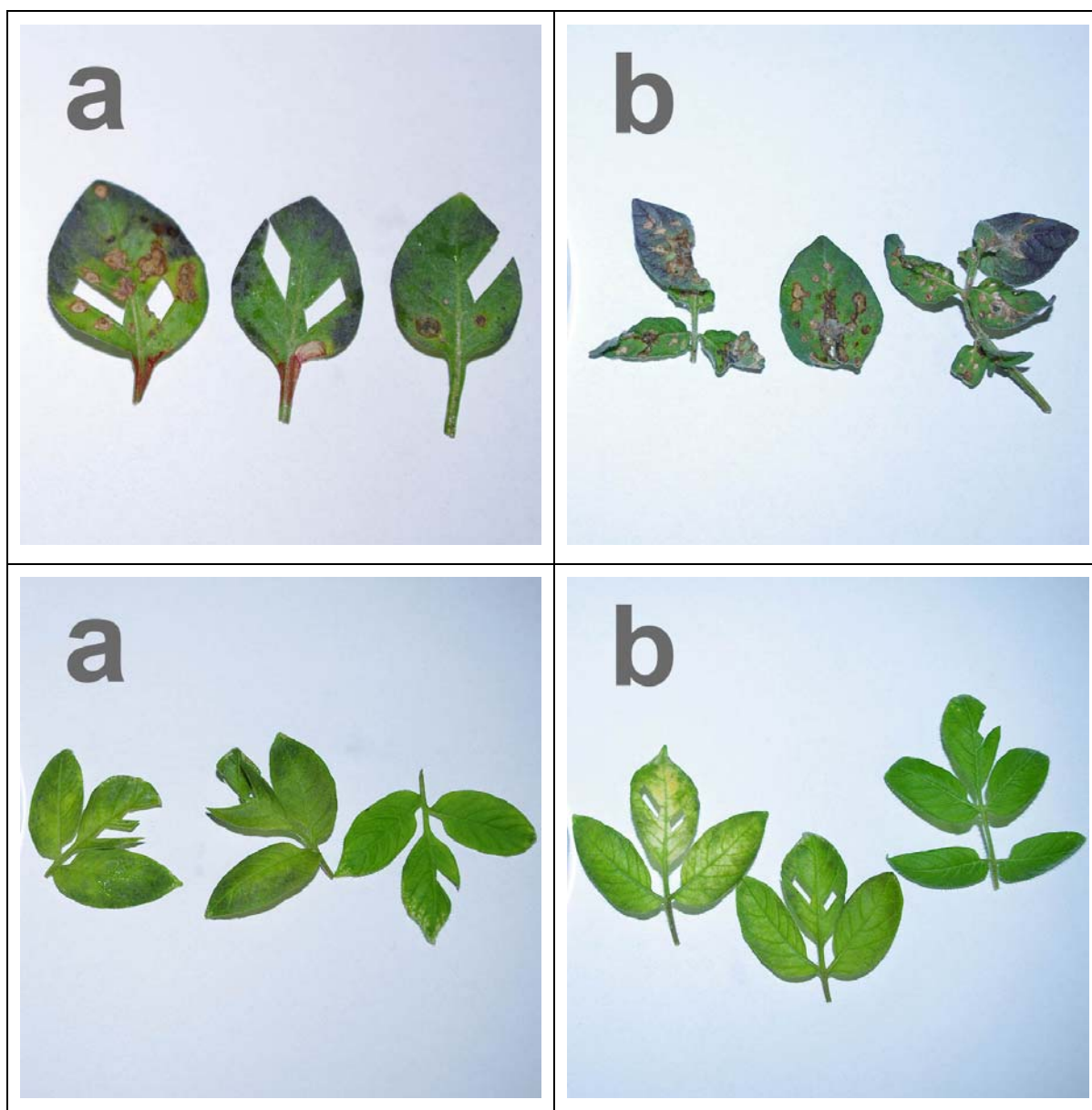
pa ne priča le vsebnost PVY. Pomembne so tudi razlike v številu okuženih rastlin. Pri divjem sorodniku krompirja *S. hjertingii* sta bili uspešno okuženi le 2 od petih rastlin, pri *S. mochiquense* pa 3 od 5 rastlin. Pri teh dveh divjih sorodnikih krompirja je imela predhodna agroinfiltracija največji vpliv na širjenje virusa PVY^{NTN}.

Pri divjih sorodnikih krompirja *S. bulbocastanum* in *S. species* ni bilo statistično značilnih razlik med okuženimi in neokuženimi rastlinami. Enako kot pri poskusu testiranja okužbe s PVY^{NTN}, tudi tu ne moremo zatrditi, da so bile rastline *S. bulbocastanum* in *S. sp.* uspešno okužene z virusom.

4.3 SLEDENJE VIRUSNE OKUŽBE DIVJIH SORODNIKOV KROMPIRJA S PVY^N-GFP IN KONFOKALNO MIKROSKOPIJO

Divje sorodnike krompirja (Tabela 1) smo inokulirali tudi z rastlinskim sokom tobaka, ki je bil okužen z virusom PVY^N označenim z GFP. Tako smo lahko s pomočjo konfokalne mikroskopije zelo hitro preverili, pri katerih divjih sorodnikih krompirja se je virus uspešno namnožil in prešel v zgornje nefiltrirane liste. Rastline smo inokulirali z drugim različkom virusa, zato rezultati niso neposredno primerljivi z rezultati inokulacije s PVY^{NTN}.

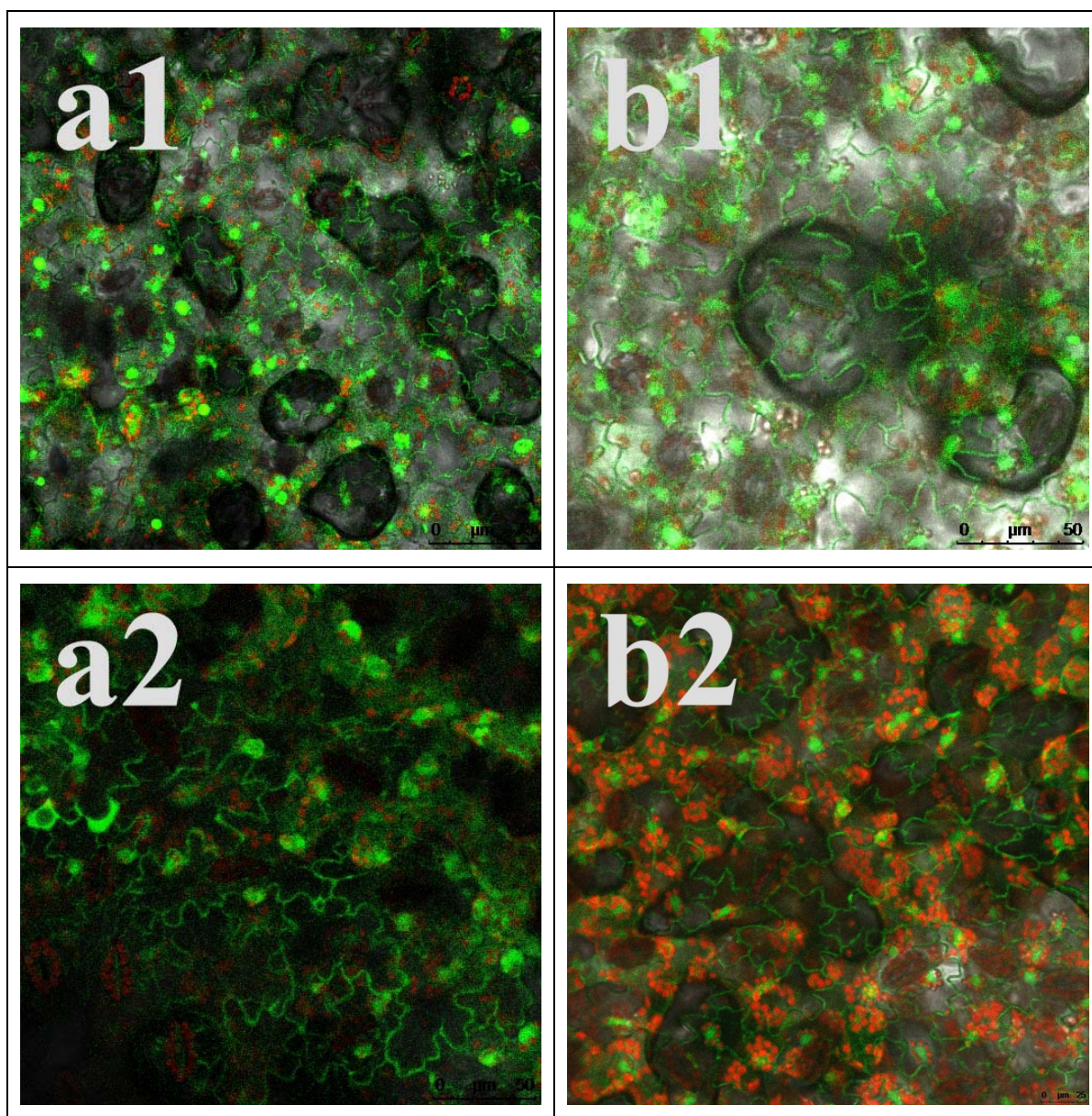
Fotografije prikazujejo liste divjih sorodnikov krompirja po tem, ko smo iz njih izrezali dele za opazovanje s konfokalnim mikroskopom (Slika 13). Razvidno je, da so pri vzorcu *S. sp.* (Slika 13, zgornji dve sliki) vidni simptomi, ki so bili prisotni tudi pri kontroli, pri *S. lesteri* pa simptomi niso vidni (Slika 13, spodnji dve sliki).



Slika 20: Primerki listov za analizo s konfokalnim mikroskopom.

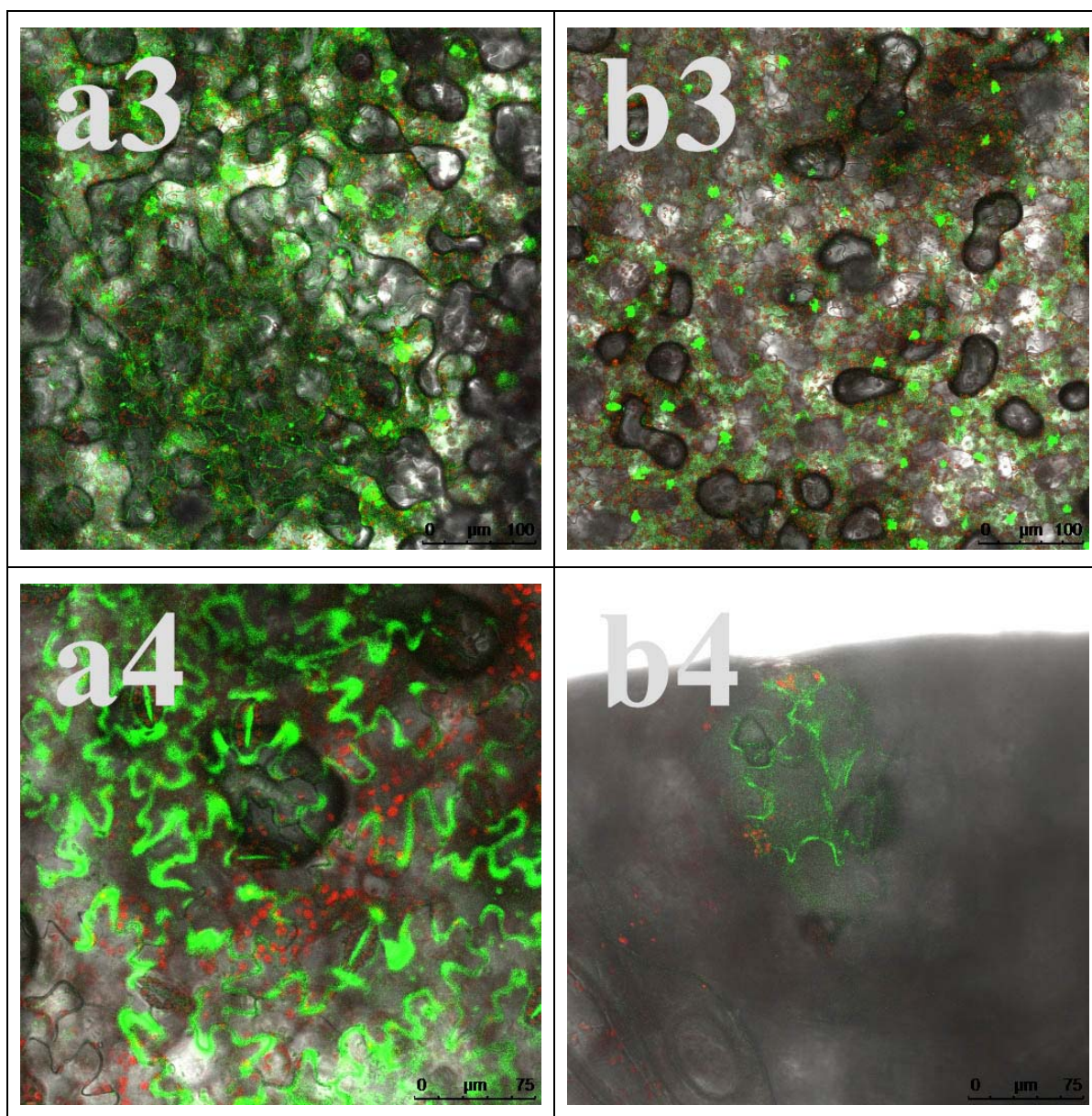
Prikazani so (a) označeni spodnji inokulirani listi in (b) zgornji neinokulirani listi, v katere je virus potencialno prehajal pri vzorcih (1) *Solanum* sp. in (2) *S. lesteri*. Na vsaki sliki sta levi in srednji list inokulirana z virusom, skrajno desni pa je neokužen kontrolni list.

S pomočjo konfokalnega mikroskopa smo opazovali prisotnost in namnoževanje virusa PVY^N označenega z GFP pri različnih divjih sorodnikih krompirja. Rezultat konfokalne mikroskopije so fotografije, ki prikazujejo fluorescenco GFP, ki se je proizvajal, ko se je virus namnoževal (Slike 21-24). Razvidno je, da se je virus prenašal po floemskih celicah v zgornje liste rastline. Virus se je sistemsko razširil po rastlinah divjih sorodnikov krompirja *S. venturii* 283-1 (Slika 21 a1, b1) in *S. venturii* 366-2 (Slika 21 a2, b2). Fluorescenca je bila prisotna ob stenah celic povrhnjice. Fluorescenco smo delno zaznali pri predstavnikih *S. venturii* 365-1 (Slika 22 a3, b3), *S. papita* (Slika 22 a4, b4) in *S. mochiquense* (Slika 23 a5, b5). Fluorescenca je bila pri teh rastlinah dobro opazna le v spodnjih inokuliranih listih, v celicah povrhnjice sistemsko okuženih listov pa je bila prisotna le zelo lokalno. Fluorescence pri ostalih divjih sorodnikih v neinokuliranih listih nismo zaznali, kot primer sta predstavljena *S. jamesii* (Slika 23 a6, b6) in *S. hjertingii* (Slika 24 a7, b7).



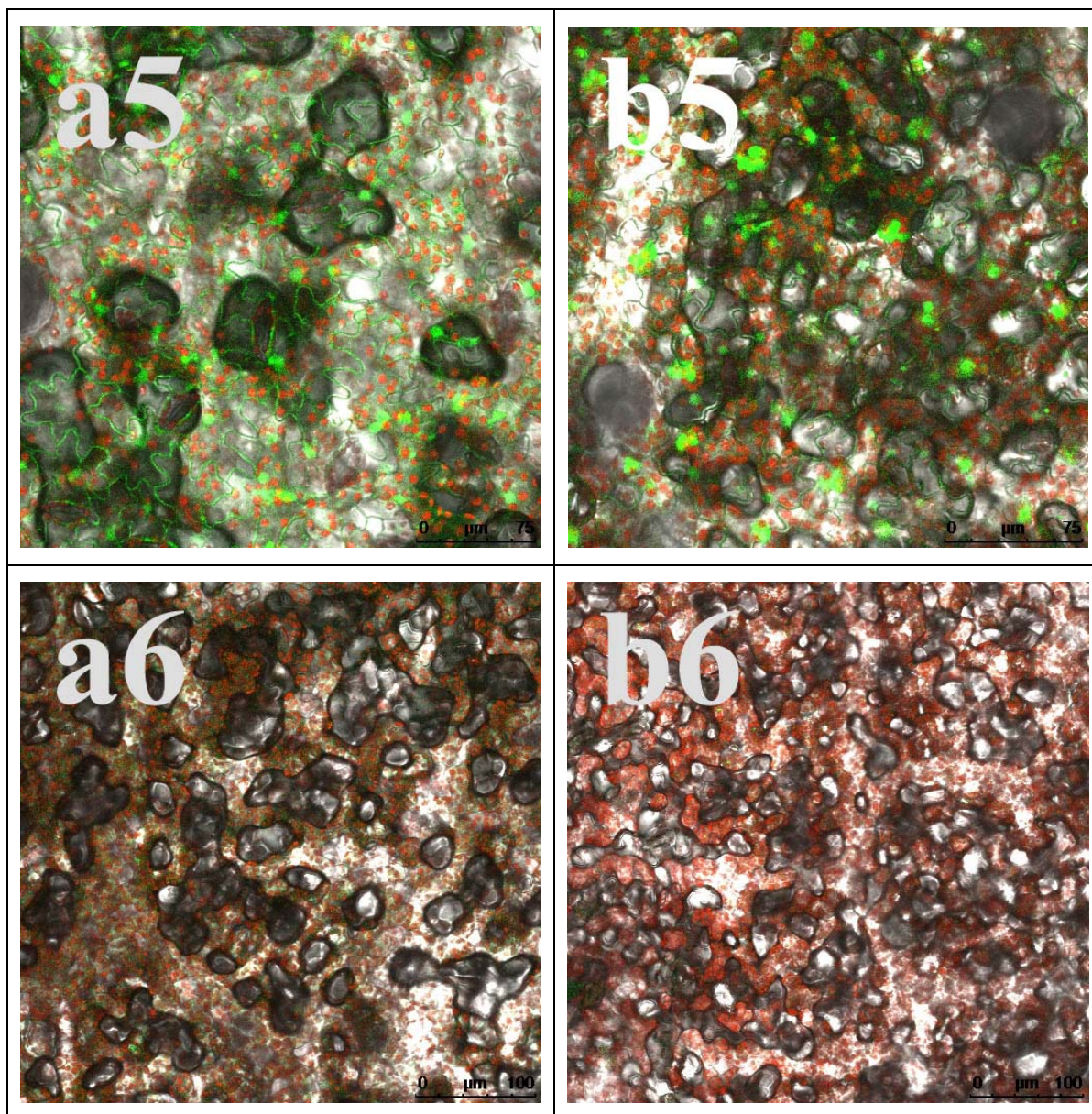
Slika 21: Prisotnost virusa PVY v listih divjih sorodnikov krompirja *S. venturii* 283-1 in *S. venturii* 366-2, slikanih s konfokalnim mikroskopom.

Zelena fluorescenca je posledica prisotnosti zelenega fluorescentnega proteina GFP, vezanega na virus PVY. S črko a) so označeni spodnji inokulirani listi, s črko b) zgornji neinokulirani listi. Številke označujejo različne divje sorodnike krompirja: 1) *S. venturii* 283-1, 2) *S. venturii* 366-2.



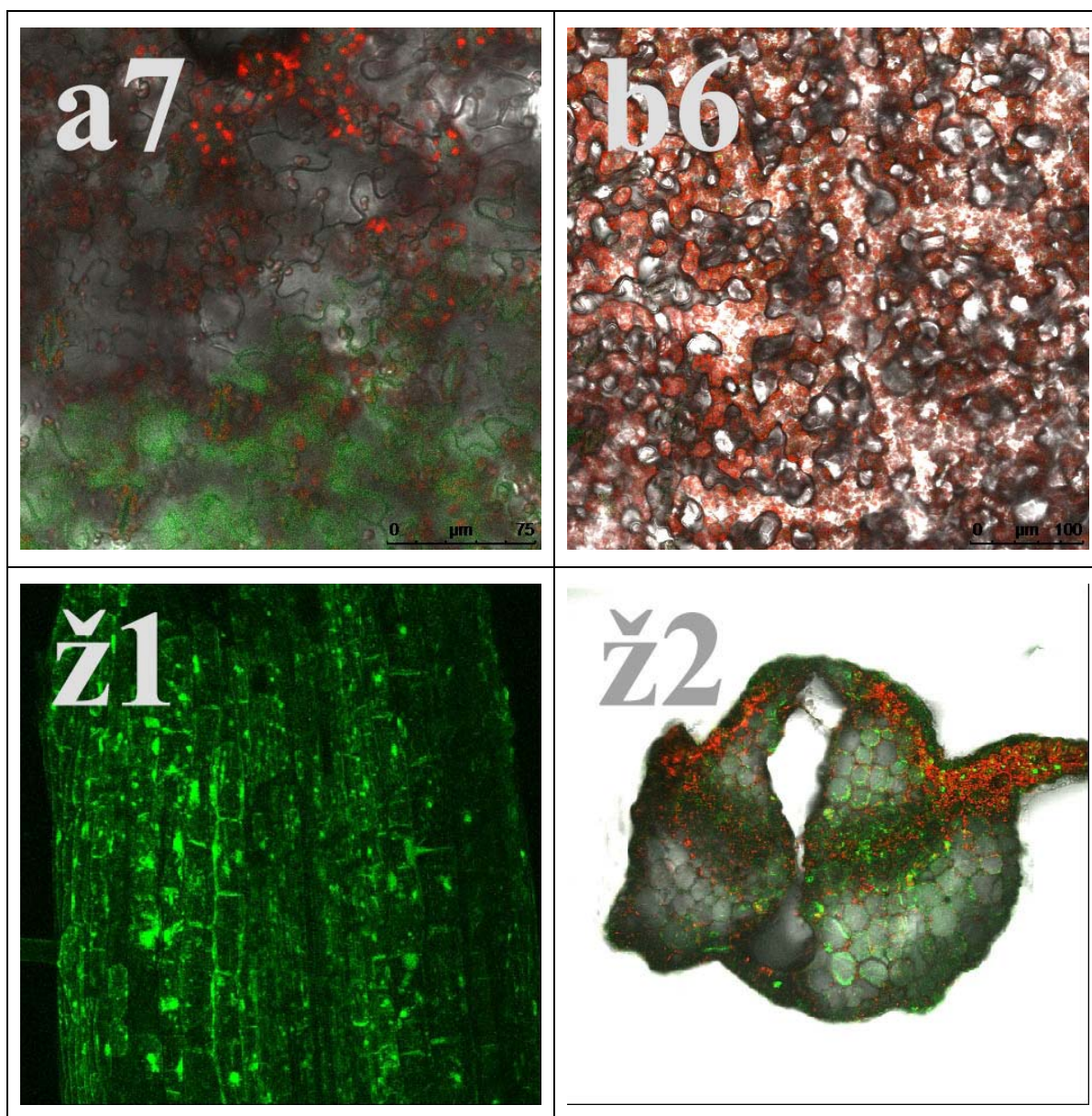
Slika 22: Prisotnost virusa PVY v listih divjih sorodnikov krompirja *S. venturii* 365-1 in *S. mochiquense*, slikanih s konfokalnim mikroskopom.

Zelena fluorescenca je posledica prisotnosti zelenega fluorescentnega proteina GFP, vezanega na virus PVY. S črko a) so označeni spodnji inokulirani listi, s črko b) zgornji neinokulirani listi. Številke označujejo različne divje sorodnike krompirja: 3) *S. venturii* 365-1, 4) *S. mochiquense*.



Slika 23: Prisotnost virusa PVY v listih divjih sorodnikov krompirja *S. papita* in *S. jamesii*, slikanih s konfokalnim mikroskopom.

Zelena fluorescenca je posledica prisotnosti zelenega fluorescentnega proteina GFP, vezanega na virus PVY. S črko a) so označeni spodnji inokulirani listi, s črko b) zgornji neinokulirani listi. Številke označujejo različne divje sorodnike krompirja: 5) *S. papita*, 6) *S. jamesii*.



Slika 24: Prisotnost virusa PVY v listih divjih sorodnikov krompirja *S. hjertingii* in žilnih prerezih, slikanih s konfokalnim mikroskopom.

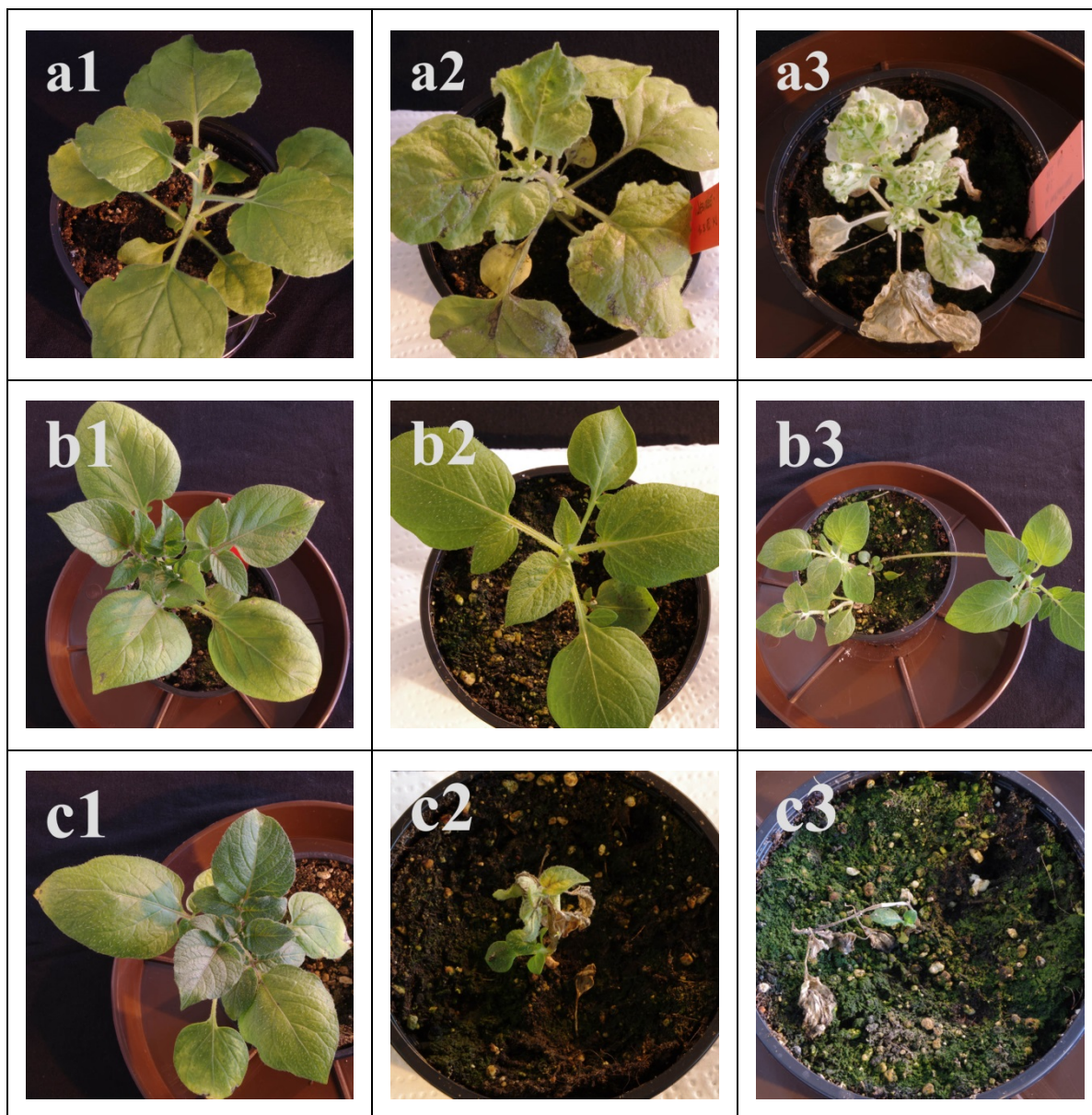
Zelena fluorescenca je posledica prisotnosti zelenega fluorescentnega proteina GFP, vezanega na virus PVY. S črko a) so označeni spodnji inokulirani listi, s črko b) zgornji neinokulirani listi. Številke označujejo različne divje sorodnike krompirja: 7) *S. hjertingii*. Spodnji sliki predstavljata ž1) vzdolžni in z ž2) prečni prerez žile.

4.4 REZULTATI METODE VIGS

Želeli smo preveriti, če metoda VIGS deluje na izbranih krompirjevih sortah: Désirée, Désirée NahG D2, Désirée J3, Igor, PW363, Rywal, Rywal NahG 16 in Sante. Ugotovili smo, da je bilo utišanje gena za fitoen desaturazo uspešno le pri obeh pozitivnih kontrolah pri tobaku in divjem sorodniku krompirja *S. venturii* 896-4.

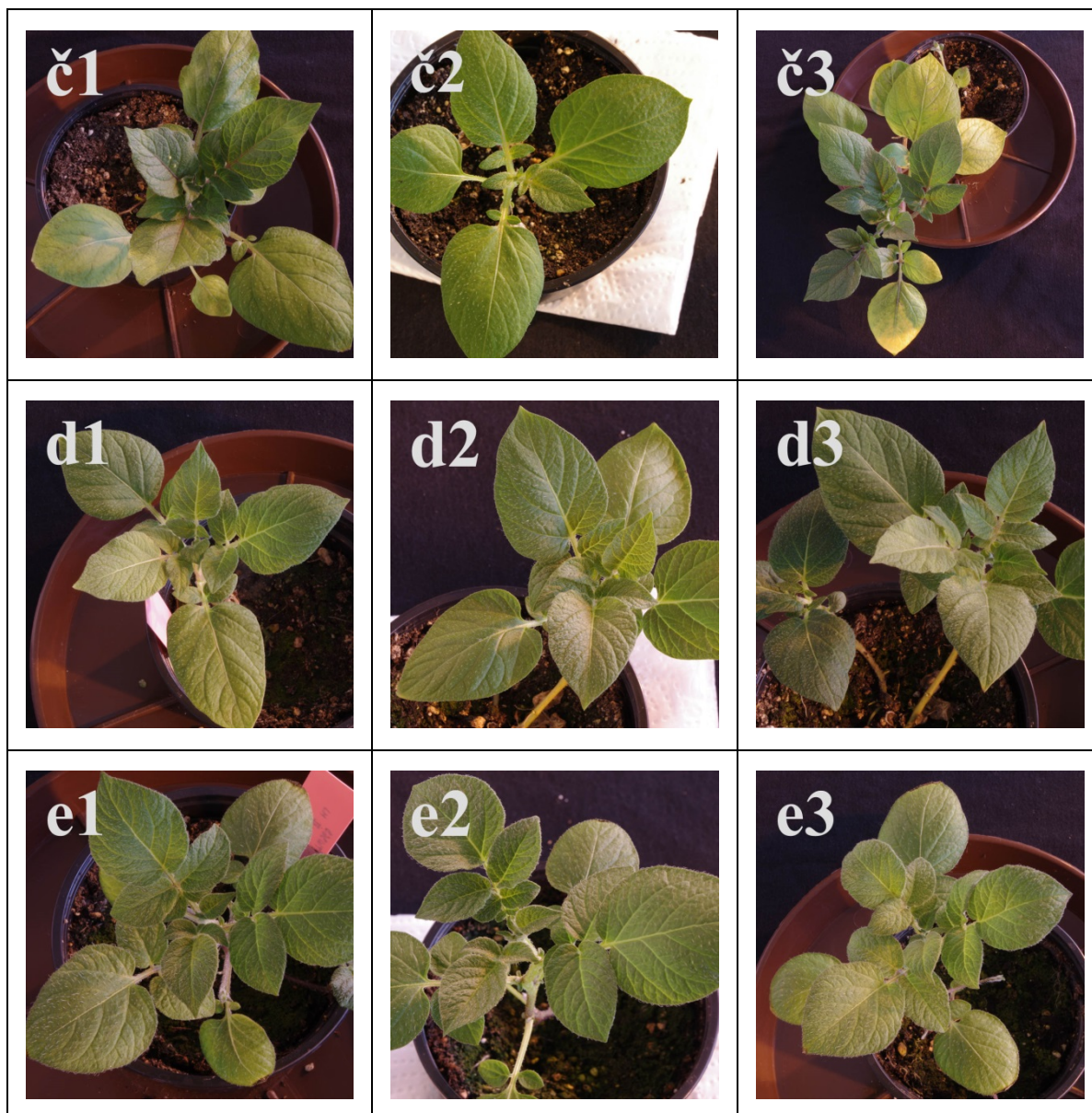
Po agroinfiltraciji različnih sort krompirja s konstruktoma pTRV1 in pTRV2-PDS smo redno opazovali spremembe v morfologiji infiltriranih rastlin. Znake smo primerjali s pozitivno kontrolo tobaka in negativno kontrolo, ki so jo predstavljale rastline, infiltrirane s praznim TRV-vektorjem (pTRV1 in pTRV2), ter spremembe fotografirali (Slike 25-27).

Zaradi utišanja gena za fitoen desaturazo se razvije bel fenotip, ki smo ga opazili samo pri tobaku (Slika 25 a1-a3). Rastline so bile ob koncu opazovanja bele z rahlim zelenim mozaikom, občutno so tudi zaostajale v rasti za kontrolnimi rastlinami (Slika 25 a3). Agroinfiltrirane rastline Rywal NahG 16 (Slika 27 g1-g3) in Désirée NahG D2 (Slika 25 c1-c3) so povsem propadle že 10 dni po agroinfiltraciji, kontrole pa so ostale nespremenjene. Pri sorti Igor (Slika 26 d1-d3) smo pričakovali znake utišanja, ampak se ti niso pokazali na nobeni izmed rastlin. Sklepamo, da so infiltrirani listi odpadli, še preden se je virus namnožil in razširil po rastlini. Pri sorti Rywal (Slika 27 f1-f3) so se po treh tednih po infiltraciji pojavili kalusi in nekroze na listih. Prisotni so bili tudi pri vseh kontrolnih rastlinah, zato sklepamo, da niso posledica virusne okužbe ali utišanja gena *pds*, ampak najverjetneje za sorto neugodnih rastnih razmer. Pri sorti PW363 (Slika 26 e1-e3) so se po desetih dneh pojavile nekroze na konicah starejših listov, ki smo jih čez 14 dni opazili tudi pri kontrolnih rastlinah. Pri ostalih sortah nismo opazili morfoloških sprememb.



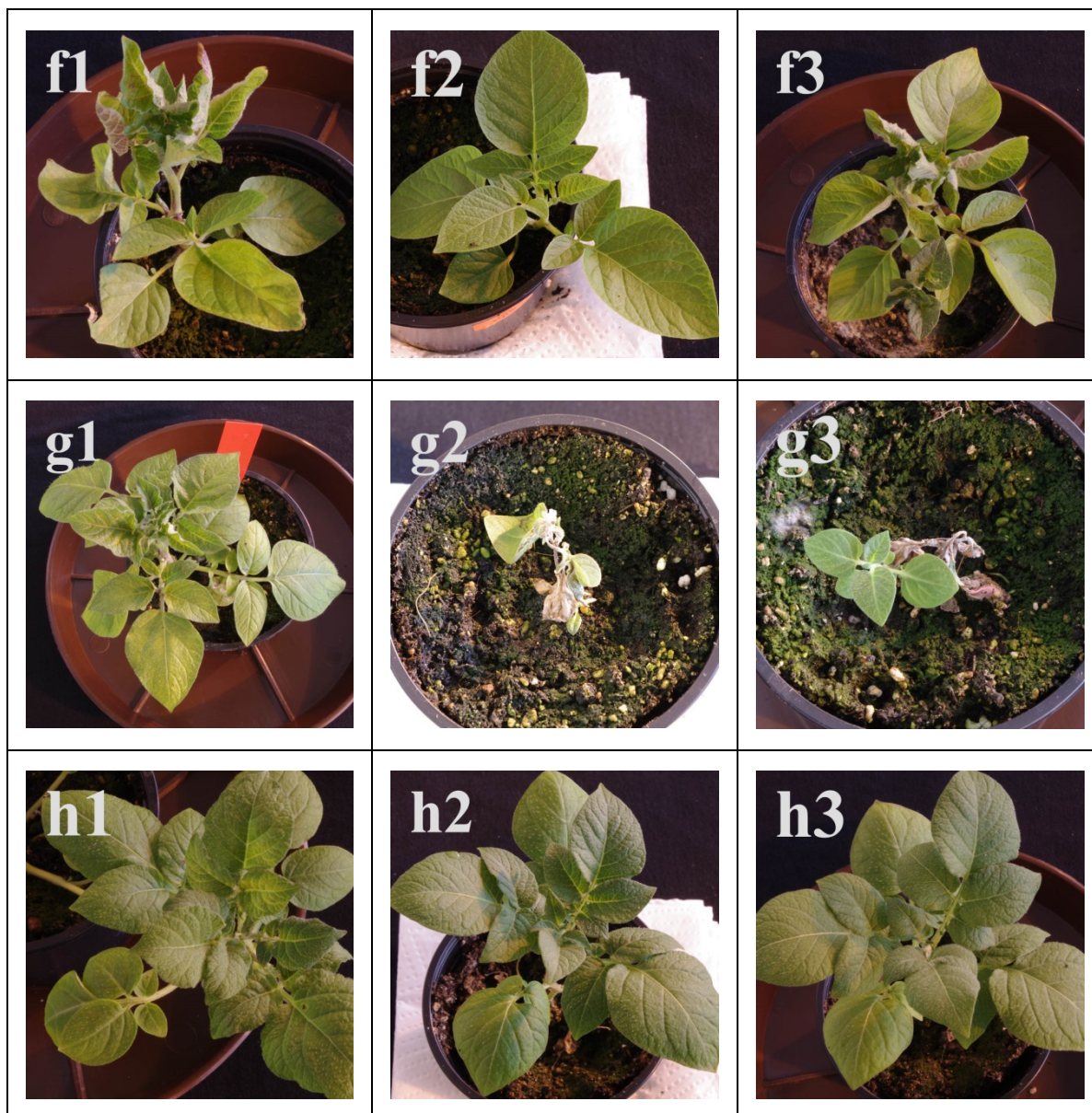
Slika 25: Morfološki znaki kontrolnih in agroinfiltriranih rastlin *N. benthamiana*, Désirée in Désirée NahG D2 .

V levem stolpcu je z oznako 1) predstavljena kontrola 28 dni po iniltraciji, v srednjem stolpcu z oznako 2) agronifiltrirane rastline 12 dni po infiltraciji in v desnem stolpcu z oznako 3 rastline 28 dneh po infiltraciji. Sorte krompirja in konrola so označene s črkami: a) *N. benthamiana*, b) Désirée, c) Désirée NahG D2.



Slika 26: Morfološki znaki kontrolnih in agrofiltriranih rastlin Désirée J3, Igor in PW363.

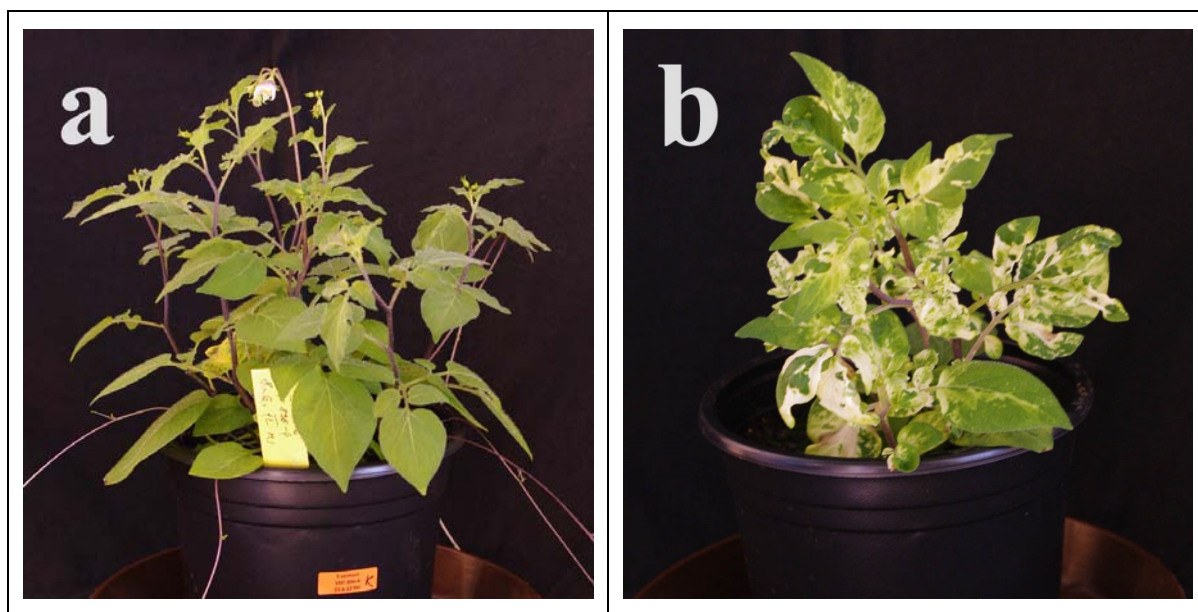
V levem stolpcu je z oznako 1) predstavljena kontrola 28 dni po iniltraciji, v srednjem stolpcu z oznako 2) agronifiltrirane rastline 12 dni po infiltraciji in v desnem stolpcu z oznako 3 rastline 28 dnev po infiltraciji. Sorte krompirja so označene s črkami: č) Désirée J3, d) Igor, e) PW363.



Slika 27: Morfološki znaki kontrolnih in agroinfiltriranih rastlin Rywal, Rywal NahG 16 in Sante.

V levem stolpcu je z oznako 1) predstavljena kontrola 28 dni po iniltraciji, v srednjem stolpcu z oznako 2) agronifiltrirane rastline 12 dni po infiltraciji in v desnem stolpcu z oznako 3 rastline 28 dneh po infiltraciji. Sorte krompirja so označene s črkami: f) Rywal, g) Rywal NahG 16 in h) Sante.

Kot dodatni kontrolni vzorec smo uporabili rastline divjega sorodnika krompirja *S. venturii* 896-4, za katerega so predhodni testi pokazali, da ob hkratni okužbi s TRV in utišanju gena *pds* razvije bel fenotip. Poskus je bil uspešen, saj so vse testne rastline kazale bel fenotip listov (Slika 28b), kontrolne pa so ostale nespremenjene (Slika 28a). Tako smo dokazali, da metoda deluje tudi na vrstah rodu *Solanum*, čeprav pri sortah krompirja, ki smo jih izbrali za poskus, ni imela pričakovanega učinka.



Slika 28: Kontrolni in agroinfiltrirani divji sorodnik krompirja *S. venturii* 896-4.

a) Kontrolna rastlina, infiltrirana s praznim vektorjem brez vidnih morfoloških sprememb. b) Z virusnim vektorjem za utišanje agroinfiltrirana rastlina z dobro vidnim belim fenotipom.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Krompir je eden izmed ekonomsko najbolj pomembnih pridelkov na svetu takoj za koruzo, pšenico in rižem (Hawkes, 1994). Kot mnoge druge kulturne rastline je tudi krompir žrtev delovanja različnih škodljivcev. Eden izmed najbolj vidnih je krompirjev virus Y, ki je razširjen po celem svetu in z okužbo kulturnih rastlin povzroča visoko ekonomsko škodo (Delgado-Sanches in Grogan, 1970). Najbolj agresivna različica virusa je PVY^{NTN}, ki povzroča bolezen imenovano obročkasta nekroza gomoljev in s tem povzroči precejšnje kvalitativno in kvantitativno zmanjšanje pridelka (Kus, 1994).

Namen magistrske naloge je bil določiti odziv 15 različnih divjih sorodnikov krompirja na okužbo z virusom PVY^{NTN}. Spremljali smo morfološke spremembe okuženih rastlin in prisotnost virusne RNA, ki smo jo določili z metodo qPCR. Pričakovali smo pojav simptomov, ki so značilni za virusno okužbo s PVY^{NTN}. Pogoste so mozaične kloroze, nekroze listov in stebel, ob napredovanju okužbe listi odpadejo in rastlina odmre (Kus, 1994). V predhodnih raziskavah so ob okužbi z virusom PVY^{NTN} pri vrstah družine *Solanaceae* opazili počasnejšo rast rastlin, manjše število listov z manjšo površino glede na kontrolne rastline (Dolenc in sod., 1999), rumenenje, ki je sprva opazno le v obliki zelenih peg in odpadanje inokuliranih listov ter lokalne lezije (Mehle in sod., 2004).

V našem primeru smo morfološke spremembe, ki so se razlikovale od morfoloških znakov kontrolnih rastlin, opazili le pri dveh divjih sorodnikih krompirja. Pri vrstah *S. lesteri* in *S. bulbocastanum* so se pojavile kloroze. Drugih znakov, ki se ob okužbi običajno pojavljajo, pri izbranih divjih sorodnikih krompirja nismo opazili.

Morfološke spremembe ob okužbi niso vedno dober pokazatelj dejanske prisotnosti virusnih delcev v proučevani rastlini. Pri tolerantnih rastlinah se virus uspešno razmnožuje brez vidnih vplivov na gostiteljsko rastlino (Goldbach in sod., 2002). Zato smo želeli preveriti prisotnost virusne RNA z uporabo metode qPCR. Vsebnost virusne RNA smo preverili tudi pri kontrolnih rastlinah, ki so sicer vse pokazale pozitivni signal za prisotnost

virusa, vendar bistveno manjši kakor pri okuženih rastlinah. To je najverjetneje posledica kontaminacije tekom dela. Ker je metoda qPCR zelo občutljiva, zazna že minimalne količine RNA, ki so lahko prisotne že v samem laboratoriju, v katerem se pogosto dela z virusno RNA. Do okužbe bi lahko prišlo tudi med redčenjem izolirane RNA po končani obratni transkripciji. Delali smo na ploščah s 96 jamicami, v katere smo pipetirali vzorce MOCK in PVY^{NTN}. Plošče smo do nadaljnje uporabe zalepili s folijo in shranili v hladilniku. Kontaminacija MOCK-vzorcev s PVY^{NTN} bi se lahko zgodila ob odstranjevanju folije.

Kljub temu, da je bila virusna RNA prisotna v vseh kontrolnih vzorcih, je dobro razvidno, da med posameznimi vzorci ni statistično značilnih razlik. Kontrolni signal predstavlja ozadje, na podlagi katerega smo določili prag za pozitiven signal pri okuženih vzorcih pri C_q 33.

S Studentovim t-testom smo primerjali količino virusne RNA v kontrolnih in inokuliranih rastlinah. Ugotovili smo statistično značilno ($p \leq 0,05$) razliko v izražanju pri vseh divjih sorodnikih razen pri vzorcih *Solanum* sp. in *S. bulbocastanum*. Rezultat lahko pripišemo zelo veliki variabilnosti med vzorci. Ta je lahko posledica neuspešne okužbe testnih rastlin. Pri divjem sorodniku krompirja *S. bulbocastanum* ne moremo zagotoviti, da je bila virusna okužba uspešna, ker je bilo v rastlinah MOCK s qPCR izmerjene več virusne RNA kot pri okuženih rastlinah in je bila virusna okužba prisotna le pri eni izmed treh poskusnih rastlin pri kateri bi lahko prišlo tudi do kontaminacije med delom. Nekoliko nenavadna in zanimiva je ugotovitev, da so bili spremenjeni morfološki znaki opazni le pri divjih sorodnikih *S. lesteri* in *S. bulbocastanum*, pri katerih smo s pomočjo qPCR zaznali skoraj najmanjšo količino virusne RNA. Glede na opažene simptome lahko previdno rečemo, da je *S. lesteri* manj tolerantna za okužbo z virusom PVY^{NTN}.

Divji sorodniki, ki smo jih uporabili v raziskavi, predhodno še niso bili vključeni v testiranja občutljivosti za virus PVY^{NTN}. Na njih so potekale raziskave odpornosti proti glivi *Phytophthora infestans*. Ugotovili so, da so divji sorodniki krompirja na okužbo s to glivo različno občutljivi. Predstavnik *S. lesteri* in *S. bulbocastanum*, ki sta se v naši raziskavi izkazala kot bolj občutljiva za okužbo z virusom PVY^{NTN}, sta za okužbo z glivo

različno občutljiva. *S. lesteri* je zelo občutljiv (stopnja odpornosti je 1), *S. bulbocastanum* pa odporen (stopnja odpornosti je 9) (Vleeshouwers in sod., 2011).

V okviru magistrske naloge smo želeli preveriti tudi vpliv predhodne agroinfiltracije z virusnim vektorjem TRV na kasnejše širjenje virusa PVY^{NTN} po rastlini. Rezultati, ki smo jih pridobili s pomočjo metode qPCR so pokazali, da je bila virusna RNA prisotna v skoraj vseh vzorcih, ki smo jih pridobili iz divjih sorodnikov, okuženih s PVY^{NTN} in predhodno agroinfiltriranih z virusnim vektorjem TRV. Po statistični analizi rezultatov značilne razlike med okuženimi in neokuženimi rastlinami nismo zaznali pri *S. jamesii*, *S. bulbocastanum*, *S. species* in *S. venturii* 741-1. Pri teh predstavnikih divjih sorodnikov ne moremo trditi, da je bila virusna okužba uspešna. O uspešnosti okužbe priča tudi število okuženih rastlin, ki je bilo najmanjše pri *S. hjertingii* in *S. mochiquense*. Sklepamo, da je imela pri teh dveh divjih sorodnikih krompirja predhodna infiltracija največji vpliv na razmnoževanje in širjenje virusa PVY^{NTN}.

Prehod virusa v zgornje neinokulirane liste divjih sorodnikov krompirja in razširitev po testni rastlini smo spremljali tudi s pomočjo konfokalnega mikroskopa. Za okuževanje rastlinskega materiala smo uporabili različek virusa PVY^N, ki se nekoliko razlikuje od različka PVY^{NTN}. Ugotovili smo, da se virus ni uspel razširiti v zgornje neinokulirane liste pri vseh divjih sorodnikih krompirja. Sklepamo lahko, da je različica PVY^N manj infektivna od različice PVY^{NTN}, saj smo ob uporabi slednje s pomočjo qPCR zaznali virusne delce tudi v zgornjih listih, ob uporabi PVY^N pa le ta ni bil sistemsko razširjen po rastlini, kljub temu, da se je pri večini predstavnikov uspešno razmnoževal v inokuliranih listih.

Različek PVY^{NTN} se serološko bistveno ne razlikuje od različice PVY^N (Le Romancer in sod., 1994). Tudi prejšnje raziskave pa potrjujejo naše rezultate, da se različek PVY^{NTN} v okuženih rastlinah uspešneje širi. Gre za agresivnejšo različico, ki povzroča hujše bolezenske znake, zanj značilna je obročkasta nekroza gomoljev (Kus, 1994). Različek PVY^N povzroča nekroze listov okuženih rastlin, a so bolezenski znaki v prvem letu okužbe zelo blagi (Bokx in Huttinga, 1981).

Po pregledu vzorcev s konfokalnim mikroskopom smo pokazali, da se je virus sistemsko razširil po rastlinah *S. venturii* 283-1 in *S. venturii* 366-2. Fluorescenca je bila opazna ob robu celic povrhnjice in v žilah. Predvidevamo, da je virus po pomnoževanju potoval po rastlini v neinokulirane dele po žilnem sistemu, saj je bila fluorescenca tam dobro opazna. Podatki iz literature potrjujejo, da se virusi med deli okužene rastline sistemsko širijo preko žilnega sistema in plazmodezm, ki povezujejo sosednje celice. S tem je omogočeno širjenje virusnih delcev po celotni rastlini brez težavnega prečkanja celičnih membran (Carrington in sod., 1996).

Z namenom, da bi v nadaljnjih raiskavah lahko enostavneje proučevali vlogo posameznih rastlinskih genov, smo želeli preveriti ali metoda VIGS deluje na izbranih sortah krompirja. Z virusom posredovano utišanje genov (VIGS) je zelo uporabna metoda pri kateri uporabimo rekombinantni virusni vektor za posttranskripcijsko utišanje endogena (Ruiz in sod., 1998). Za poskus smo izbrali 8 različnih sort krompirja. Tobak (*N. Benthamiana*) in divji sorodnik krompirja *S. venturii* 896-4 sta nam služila kot pozitivni kontroli. Rastline smo agroinfiltrirali z bakterijami, ki so vsebovale konstrukte pTRV1, pTRV2 in pTRV2-PDS ter opazovali morebitne morfološke spremembe.

Pričakovali smo pojav belega fenotipa pri agroinfiltriranih rastlinah, ker je virusni vektor vseboval del cDNA, ki kodira gen za fitoen desaturazo (*pds*) (Kumagai M. H. in sod., 1995). Po prepisu virusnega genoma v gostiteljski celici pride do tvorbe dsRNA, ki sproži zaporedje celičnih odzivov, imenovanih RNA interferenca (RNAi) (Taiz in Zeiger, 2010). Sledi razgradnja mRNA za PDS in posledična inhibicija sinteze karotenoidov (Kumagai M. H. in sod., 1995).

Bel fenotip se je pojavil samo pri kontrolnih rastlinah *N. benthamiana* in *S. venturii* 896-4. Listi teh rastlin so postali bele barve z zelenim mozaikom. Agroinfiltrirane rastline so tudi občutno zaostajale v rasti za negativnimi kontrolnimi. Pri proučevanih sortah krompirja utišanje *pds* ni bilo opazno. Rastline sorte Rywal NahG 16 in Désirée NahG D2 so zelo kmalu po agroinfiltraciji povsem propadle. Oznaka NahG pomeni, da je bila pri teh sortah okvarjena pretvorba salicilne kisline, ki je pomembna komponenta signalne poti, ki aktivira odziv rastline na virusno okužbo. Predhodne raziskave so pokazale občutno

povišanje koncentracije salicilne kisline v bližini mesta infekcije (Durner in sod., 1997). Sklepamo, da so predstavniki sort Rywal NahG 16 in Désirée NahG D2 zaradi okvarjene poti salicilne kisline propadli kmalu po agroinfiltraciji, ker rastline niso bile sposobne sprožiti ustreznega odziva na virusno okužbo. Pri ostalih sortah smo opazili nekatere morfološke spremembe, ki pa so bile prisotne tudi pri kontrolnih rastlinah in so bile najverjetneje posledica rastnih razmer.

5.2 SKLEPI

V magistrski nalogi smo uspešno ugotovili odziv različnih divjih sorodnikov krompirja na okužbo z virusom PVY^{NTN}. Ugotovili smo, da se različni divji sorodniki krompirja različno odzivajo na okužbo z virusom PVY^{NTN}. Z metodo PCR v realnem času smo potrdili, da se je virus uspešno razmnoževal in razširil v vseh divjih sorodnikih krompirja razen pri vzorcih *Solanum* sp. in *S. bulbocastanum*, a so bili pričakovani simptomi okužbe prisotni le pri rastlinah *S. lesteri* in *S. bulbocastanum*. Razen pri teh dveh predstavnikih tudi ni bilo razlik v morfologiji med kontrolnimi in okuženimi rastlinami. Iz rezultatov lahko zaključimo, da so divji sorodniki krompirja različno občutljivi za okužbo z virusom PVY^{NTN}, ki pa se pri vseh, razen pri dveh proučevanih predstavnikih, uspešno razmnožuje in širi. Divje sorodnike krompirja, ki ob okužbi z virusom ne kažejo morfoloških sprememb, bi lahko v nadaljnjih raziskavah uporabili za proučevanje virusne odpornosti.

Ugotovili smo tudi, da ima pri divjih sorodnikih krompirja *S. hjertingii* in *S. mochiquense* predhodna agroinfiltracija z vektorjem TRV vpliv na kasnejše razmnoževanje in širjenje virusa PVY^{NTN}. Ta rezultat je pomemben za nadaljnje delo, ker nakazuje, da bi lahko rastline s pomočjo agroinfiltracije z vektorjem, ki povzroča minimalne morfološke spremembe, zaščitili pred okužbo z virusom, ki povzroča velike izgube pridelka.

Naša hipoteza ob začetku dela je bila tudi, da bo metoda z virusom posredovanega utišanja genov (VIGS) delovala tudi na izbranih sortah krompirja, ki pa niso pokazale pričakovanega belega fenotipa. Metoda je bila uspešna pri kontrolni rastlini *N. benthamiana* in divjemu sorodniku krompirja *S. venturii* 896-4. Sklepamo lahko, da metoda VIGS deluje, a bi jo bilo potrebno za uporabo pri naših izbranih predstavnikih

krompirja še prilagoditi. Menimo, da metoda morda ni bila uspešna, ker je gen *pds* izviral iz paprike in se je njegova sekvenca zaporedje preveč razlikovala od sekvence gena *pds* iz krompirja. Ta hipoteza se vseeno zdi precej malo verjetna, ker je gen uspešno deloval v tobaku in divjem sorodniku krompirja. Težava je bila morda v vektorju, ki smo ga uporabili za vnos gena v rastlino. Vektor TRV je bil morda preveč agresiven in je povzročil propad nekaterih sort krompirja še preden bi se gen *pds* uspel utišati. Konkretno se je to morda zgodilo pri sorti Igor in pri vzrocih Rywal NahG 16 in Désirée NahG D2, pri katerih smo zelo hitro opazili odpad agroinfiltriranih listov. V prihodnje bi lahko poskusili z uporabo gena *pds* iz krompirja in z uporabo drugačnega vektorja za utišanje genov. Uspešen sistem VIGS bi v prihodnjih raziskavah omogočal mnogo enostavnejše proučevanje funkcije genov izbranih sort krompirja.

6 POVZETEK

Krompir je zelnata trajnica z užitnimi gomolji, ki izhaja iz Južne Amerike in danes uspeva po celem svetu. Je ena izmed ključnih kulturnih rastlin za preživetje prebivalcev številnih držav v razvoju. Njegova prednost pred ostalimi kulturnimi rastlinami je hitra rast, visok doprinos, prilagodljivost spremembam v rastnem okolju in nizki stroški pridelave. Kot vse kulturne rastline tudi krompir napadajo različni škodljivci, ki zmanjšajo doprinos in kvaliteto pridelka. Eden izmed bolj ekonomsko pomembnih je krompirjev virus Y, predvsem njegova agresivnejša različica PVY^{NTN}. Na okuženih rastlinah povzroča mozaične kloroze listov, nekroze listov in stebel, obročkasto nekrozo gomoljev in ob napredovanju okužbe propad rastline.

Zanimal nas je odziv različnih divjih sorodnikov krompirja na okužbo z virusom PVY^{NTN}. Opazili smo različne morfološke spremembe, ki pa se razen pri predstavnikih *S. lesteri* in *S. bulbocastanum* niso razlikovale od kontrolnih rastlin. Z metodo qPCR smo potrdili prisotnost virusne RNA v sistemsko okuženih listih pri skoraj vseh divjih sorodnikih. Pri divjem sorodniku krompirja *S. bulbocastanum* ne moremo trditi, da je bila virusna okužba uspešna, ker med okuženimi in neokuženimi rastlinami ni bilo statistično značilne razlike, poleg tega je bil virus uspešno določen le v eni izmed treh poskusnih rastlin. Statistično značilne razlike med okuženimi in neokuženimi rastlinami ni bilo tudi pri predstavnikih *S. lesteri*. Virus se je pri ostalih rastlinah uspešno razmnoževal in širil v zgornje neinokulirane liste, rastline pa, razen predstavnikov *S. lesteri* in *S. bulbocastanum*, niso kazale značilnih bolezenskih znakov, na podlagi česar lahko sklepamo, da so za okužbo z virusom PVY^{NTN} bolj ali manj tolerantne.

Medsebojni vpliv različnih virusov znotraj ene rastline smo preverili z agroinfiltracijo vektorja TRV v različne divje sorodnike krompirja in naknadno okužbo z virusom PVY^{NTN}. Rezultati so pokazali, da prisotnost virusnega vektorja TRV vpliva na razmnoževanje in širitev PVY^{NTN} znotraj nekaterih divjih sorodnikov krompirja. Vpliv smo opazili pri predstavnikih *S. hjertingii* in *S. mochiquense*.

Širjenje virusa po okuženi rastlini smo opazovali s konfokalnim mikroskopom. Rastline smo inokulirali z virusom PVY^N, ki je bil označen z GFP. Ugotovili smo, da se je virus sistemsko razširil po rastlinah predstavnikov divjega krompirja *S. venturii* 283-1 in *S. venturii* 366-2 in delno razširil pri rastlinah *S. papita* in *S. mochiquense*. Rezultatov ne moremo neposredno primerjati z ostalimi v raziskavi, ker je virus PVY^N manj agresiven od različice PVY^{NTN}. Razvidno je bilo, da je virus v neinokulirane dele potoval po žilnem sistemu.

Na različnih sortah krompirja smo preskusili metodo z virusom posredovanega utišanja genov (VIGS), ki je pri nekaterih drugih vrstah že uveljavljena za proučevanje genske funkcije. Rastline smo agroinfiltrirali z virusnimi konstrukti pTRV1, pTRV2 in PDS. Pričakovan bel fenotip smo opazili le pri kontrolnih rastlinah tobaka *N. benthamiani* in divjega sorodnika krompirja *S. venturii* 896-4. Zato bi morali metodo za ostale vzorce v prihodnje optimizirati.

7 VIRI

Andean heritage. International year of the potato 2008.

<http://www.potato2008.org/en/potato/origins.html> (16. jul 2013)

Bartley G. E., Scolnik P. A. 1995. Plant carotenoids: Pigments for photoprotection, visual attraction and human health. *The plant cell*, 7: 1027-1038

Becker A., Lange M. 2010. VIGS-genomics goes functional. *Trends in Plant Science*, 15: 1-4

Beta Carotene-compound summary. PubChem NCBI. ZDA.

<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=5280489#itabs-2d> (19. jul. 2013)

Bokx J. A., Huttinga H. 1981. Potato virus Y. *Description of plant viruses* 242. Velika Britanija.

<http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=242> (22. jul. 2013)

Burch-Smith T. M., Anderson J. C., Martin G. B., Dinesh-Kumar S. P. 2004 Applications and advantages of virus-induced gene silencing for gene function studies in plants. *The Plant Journal*, 39: 734-746

Carrington J. C., Kasschau K. D., Mahajan S. K., Schaad M. C. 1996. Cell-to-cell and long-distance transport of viruses in plants. *The Plant Cell*, 8: 1669-1681

Confocal microscopy. Leica microsystems. Nemčija.

<http://www.leica-microsystems.com/science-lab/topics/confocal-microscopy/> (16. jul. 2013)

- Delgado-Sanchez S., Grogan R. G. 1970. Potato virus Y. Description of plant viruses 37. Velika Britanija.
<http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=37> (22. jul. 2013)
- Dolenc J., Vilhar B., Dermastia M. 1999. Systemic infection with potato virus Y^{NTN} alters the structure of the shoot apical meristem in a susceptible potato cultivar. *Physiological and molecular plant pathology*, 56: 33-38
- Dumer J., Shak J., Klessig D. F. 1997. Salicylic acid and disease resistance in plants. *Trends in plant science*, 2: 266-274
- Finnzymes. 2009. Principles of qPCR. Helsinki. 70 str.
- Food and agriculture organisation. 2008. Potato fact sheets. 17 str.
- Full Report (All Nutrients): 11352, Potato, flesh and skin, raw. 2013. Združene države Amerike. United States Department of Agriculture.
<http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/3127?qlookup=11352&format=Full&max=25&man=&facet=&new=1> (16.sep.2013)
- Goldbach R., Bucher E., Prins M. 2002. Resistance mechanisms to plant viruses: an overview. *Virus research*, 92: 207-212
- Harries P., Ding B. 2011 Cellular factors in plant virus movement: At the leading edge of macromolecular trafficking in plants. *Virology* 411: 237-243
- Hawkes J. G. 1994. Origins of cultivated potatoes and species relationships. *Potato Genetics*. Bradshaw, J. E., Mackay, G. R. CAB International: 3-24
- Hijmans R. J., Spooner D. M. 2001. Geographic distribution of wild potato species. *America Journal of Botany*, 88: 2101-2112

Hollings M., Brunt A. A. 1981 Potyvirus group. Description of plant viruses 245. Velika Britanija.

<http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=245> (22. jul. 2013)

International year of the potato. 2013. Food and agriculture organisation of the United nations.

<http://www.fao.org/agriculture/crops/core-themes/theme/hort-indust-crops/international-year-of-the-potato/en/> (16. jul. 2013)

Jones R., Kumar S., Mackie A. 2003. Potato virus Y. Avstralija. Department of agriculture factsheet 02/2003.

http://www.agric.wa.gov.au/objtwr/imported_assets/content/pw/ph/dis/fs00203.pdf (24. jul. 2013)

Kogovšek P., Gow L., Pompe-Novak M., Gruden K., Foster G. D., Boonham N., Ravnikar M. 2008. Single-step RT real-time PCR for sensitive detection and discrimination of Potato virus Y isolates. *Journal of Virological Methods*, 149: 1-11

Kerlan C., Nikolaeva O. V., Hu X., Meacham T., Gray S. M., Karasev A. V. 2011. Identification of the molecular make-up of the potato virus Y strain PVY^Z: Genetic typing of the PVY^Z-NTN. *Phytopathology*, 101, 9: 1052-1060

Kumagai M. H., Donson J., Della-Cioppa G., Harvey D., Hanley K., Grill L. K. 1994. Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA. *PNAS USA*, 92: 1679-1683

Kus M. 1994. Krompir. Ljubljana. Kmečki glas. 225 str.

Le Mercier P., Hullo C., Masson P. Potyviridae. 2013. Swiss Institute of Bioinformatics http://viralzone.expasy.org/all_by_species/48.html (19. jul. 2013)

- Le Romancer M., Kerlan C., Nedellec M. 1994. Biological characterisation of various geographic isolates of potato virus Y inducing superficial necrosis on potato tubers. *Plant Pathology*, 43: 138–144
- Liang C. W., Zhao F. Q., Meng C. X., Tan C. P., Qin S. 2006. Molecular cloning, characterization and evolutionary analysis of phytoene desaturase (PDS) gene from *Haematococcus pluvialis*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22: 59-64
- Liu Y., Schiff M., Dinesh-Kumar S. P. 2002. Virus-induced gene silencing in tomato. *The Plant Journal*, 31: 777-786
- Lopez A. B., Yong Yang, Thannhauser T. W., Li Li. 2008. Phytoene desaturase is present in a large protein complex in the plastid membrane. *Physiologia Plantarum*, 133: 190-198
- MacFarlane S. A. 1999. Molecular biology of the tobnaviruses. *Journal of General Virology*, 80: 2799-2807
- Martinčič A. 2007. Solanaceae. V: Martinčič A. in sod. (ur.). *Mala flora Slovenije: ključ za določanje praprotnic in semenk*. 4. izdaja. Ljubljana. Tehniška založba Slovenije. 967 str.
- Mehle N., Kovač M., Petrovič N., Pompe Novak M., Baebler Š., Krečič Stres H., Gruden K., Ravnikar M. 2004. Spread of potato virus YNTN in potato cultivars (*Solanum tuberosum* L.) with different levels of sensitivity. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 64: 293-300
- Pompe Novak M., Gruden K., Baebler Š., Krečič Stres H., Kovač M., Jongsma M., Ravnikar M. 2006. Potato virus Y induced changes in the gene expression of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 67: 237-247

Purkayastha A., Dasgupta I. 2009. Virus-induced gene silencing: A versatile tool for discovery of gene functions in plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47: 967-976

qPCR education. Life Technologies.

<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/PCR/real-time-pcr/qpcr-education.html> (22. jul. 2013)

RNA interference fact sheet. 2013. ZDA. National institute of general medical sciences.

<http://www.nigms.nih.gov/News/Extras/RNAi/factsheet.htm> (12. jun. 2013)

Ratcliff F., Martin-Hernandez A. M., Baulcombe D. C. 2001. Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. *The Plant Journal*, 25: 237-245

Robinson D. J., Harrison B. D. 1989. Tobacco rattle virus. *Description of plant viruses* 346. Velika Britanija.

<http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=346> (19. jul. 2013)

Ruiz T. M., Voinnet O., Baulcombe D. C. 1998. Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. *The Plant Cell*, 10: 937-946

Shukla D. D., Ward C. W., Brunt A. A., Berger P. H. 1998. Potyviridae family.

Description of plant viruses 366. Velika Britanija.

<http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=366> (22. jul. 2013)

Spooner D. M., Bamberg J. B. 1994. Potato genetic resources: Sources of resistance and systematics. *American potato journal*, 71: 325-337

Strgar J. 2007. *Biologija*. Zbirka: tematski leksikon. Tržič. Učila International, založba. 489 str.

Taiz L., Zeiger E. 2010. *Plant Physiology*. 5. izdaja. ZDA. Sinauer Associates, Incorporated. 782 str.

Thain M., Hickman M. 2004. Dictionary of Biology. 11. izdaja. London, Velika Britanija.
Penguin Group. 750 str.

Thomas C. L., Jones L., Baulcombe D. C., Maule A. J. 2001. Size constraints for targeting
post-transcriptional gene silencing and for RNA-directed methylation in *Nicotiana
benthamiana* using a potato virus X vector. *The Plant Journal*, 25: 417-425

Van Kammen A. 1997. Virus-induced gene silencing in infected and transgenic plants.
Trends in Plant Science, 2: 409-411

Ward, C.W., Shukla, D.D. 1991. Taxonomy of potyviruses: current problems and some
solutions. *Intervirology*, 32: 269-296

Wild potato species. International potato center. Peru.
<http://cipotato.org/potato/wild-species> (22. jul. 2013)

Vleeshowers V. G., Finkers R., Budding D., Visser M., Jacobs M. M., Berloo R., Pel M.,
Champouret N., Bakker E., Krenek P., Rietman H., Huigen D., Hoekstra R., Goverse
A., Vosman B., Jacobsen E., Visser R. G. 2011. SolRgene: an online database to
explore disease resistance genes in tuber-bearing *Solanum* species. *BMC Plant biology*
11:116.

Žlahtenje slovenskih sort krompirja. 2013. Ljubljana. Kmetijski inštitut Slovenije.
<http://www.kis.si/pls/kis/!kis.web?m=158&j=SI> (16. jul. 2013)

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Jani Žel, za hiter pregled magistrskega dela, vso prijaznost in omogočitev opravljanja raziskave na Nacionalnem inštitutu za biologijo.

Zahvaljujem se ARRS za financiranje raziskovalnega dela preko projekta J1-4268 in programa P4-0165.

Iskreno se zahvaljujem somentorju dr. Davidu Dobniku za vso pomoč, vodenje, odgovore na vprašanja, spodbudo in ves čas, ki mi ga je namenil tekom raziskovalnega dela.

Zahvala gre tudi vsem ostalim zaposlenim na oddelku za biotehnologijo in sistemsko biologijo Nacionalnega inštituta za biologijo, ki so mi bili vedno pripravljene priskočiti na pomoč.

Zahvaljujem se tudi Kemijskemu inštitutu, ki mi je omogočil uporabo konfokalnega mikroskopa.

Velika zahvala gre moji družini, ki mi je omogočila brezskrben študij in je v splošnem najboljša na svetu.

In seveda hvala tudi Žigu za vse zaupanje, pomoč, oporo in potrpežljivost, ne glede na vse.

PRILOGE

Priloga 1: Tabela z opisom morfoloških znakov kontrolnih divjih sorodnikov krompirja, ki smo jih infiltrirali z neokuženim rastlinskim sokom krompirja sorte Pentland squire.

	MOCK zap. št.	5 dpi	8 dpi	11 dpi	14 dpi
<i>S. papita</i>	1				
	2	zaviti listi	zaviti listi		
	3				
	4	BP	BP	nekroze na konicah listov	nekroze na konicah listov
	5	kalusi	kalusi		
<i>S. lesteri</i>	11	bp			
	12	kalusi			
	13	rumeni spodnji listi	rumeni spodnji listi	rumeni spodnji listi	kloroze, odpadanje spodnjih listov
	14				
	/	/	/	/	/
<i>S. hjertingii</i>	21				
	22	kalusi, nekroze			
	23	BP			
	24			kalusi, nekroze	
	25	kalusi, nekroze	kalusi, nekroze	kalusi, nekroze	kalusi, nekroze
<i>S. polytrichon</i>	31				
	32			kalusi, nekroze, luknje na mestih infiltracije	
	33				
	34				
	35	kalusi, nekroze	kalusi, nekroze, luknje na mestih infiltracije	kalusi, nekroze, luknje na mestih infiltracije	kalusi, nekroze, luknje na mestih infiltracije
<i>S. venturii 283-1</i>	41				
	42				
	43				
	44				
	45	BP	BP	BP	nekroze spodnjih listov

Se nadaljuje

Nadaljevanje

	MOCK zap. št.	5 dpi	8 dpi	11 dpi	14 dpi
<i>S. venturii</i> 250-2	51	starejši listi rumeni, s pikami, odpadajo	starejši listi rumeni, s pikami, odpadajo	starejši listi rumeni, s pikami, odpadajo	nekroze na konicah listov
	52				
	53				
	54				
	55				
<i>S. species</i>	61	kalusi, nekroze, zaviti listi	kalusi, nekroze, zaviti listi	kalusi, nekroze, zaviti listi	kalusi, nekroze, zaviti listi
	62				
	63				
	64				
	65				
<i>S. bulbocastanum</i>	71	BP	BP	BP	BP
	72				
	73				
	74				
	75				
<i>S. okade</i>	81	posamezne pikčaste nekroze na listih	posamezne pikčaste nekroze na listih	rumeni spodnji listi	rumeni spodnji listi
	82				
	83				
	84				
	85				
<i>S. venturii</i> 365-1	91	BP	svetlejši robovi listov	posamezne nekroze	posamezne nekroze
	92				
	93				
	94				
	95				
<i>S. mochiquense</i>	101	BP	BP	BP	BP
	102				
	103				
	104				
	105				

Se nadaljuje

Nadaljevanje

	MOCK zap. št.	5 dpi	8 dpi	11 dpi	14 dpi
<i>S. jamesii</i>	111	zametki kalusov, zaviti listi	zametki kalusov, zaviti listi	kalusi, zviti zgornji listi	kalusi, zviti zgornji listi
	112				
	113				
	114				
	115				
<i>S. venturii 896-4</i>	121	BP	BP	BP	BP
	122				
	123				
	124				
	125				
<i>S. venturii 366-2</i>	131	BP	BP	BP	BP
	132				
	133				
	134				
	135				
<i>S. venturii 741-1</i>	141	nekroze stebel	nekroze stebel	nekroze stebel in listov	nekroze stebel in obsežnejše nekroze listov
	142				
	143				
	144				
	145				

Priloga 2: Tabela z opisom morfoloških znakov divjih sorodnikov krompirja, ki smo jih inokulirali z virusom PVY^{NTN}.

	PVY ^{NTN} zap. št.	5 dpi	8 dpi	11 dpi	14 dpi
<i>S. papita</i>	6	zametki kalusov	zametki kalusov	posamezni kalusi in nekroze	posamezni kalusi in nekroze
	7				
	8				
	9				
	10				
<i>S. lesteri</i>	16	kalusi, rumeni spodnji listi	spodnji listi odpadajo	spodnji listi odpadajo, kalusi, mozaična kloroza	spodnji listi odpadajo, kalusi, mozaična kloroza
	17				
	18				
	19				
	20				
<i>S. hjeritingii</i>	26	kalusi in nekroze	kalusi in nekroze	kalusi, nekroze, kloroze	kalusi, nekroze, kloroze, črne pike na zgornjih listih
	27				
	28				
	29				
	30				
<i>S. polytrichon</i>	36	kalusi, nekroze, odpadajo inokulirani listi	kalusi, nekroze, odpadajo inokulirani listi	kalusi, nekroze, kloroze, luknje pri inokuliranih listih	kalusi, nekroze, kloroze, luknje pri inokuliranih listih
	37				
	38				
	39				
	40				
<i>S. venturii 283-1</i>	46	BP	BP	BP	BP
	47				
	48				
	49				
	50				
<i>S. venturii 250-2</i>	56	rumeni spodnji listi	rumeni spodnji listi	rumeni spodnji listi	nekroze na konicah listov
	57				
	58				
	59				
	60				

Se nadaljuje

Nadaljevanje

	PVY ^{NTN} zap. št.	5 dpi	8 dpi	11 dpi	14 dpi
<i>S. species</i>	66				
	67				
	68				
	69				
	70	kloroze, nekroze, kalusi, zviti listi	kloroze, nekroze, kalusi, zviti listi	kloroze, nekroze, kalusi, zviti listi	kloroze, nekroze, kalusi, zviti listi
<i>S. bulbocastanum</i>	76				
	77				
	78				
	79				
	80	BP	kloroza	kloroza	kloroza
<i>S. okade</i>	86				
	87				
	88				
	89				
	90	pikčasta nekroza	pikčasta nekroza	pikčasta nekroza	pikčasta nekroza
<i>S. venturii 365-1</i>	96				
	97				
	98				
	99				
	100	BP	BP	BP	BP
<i>S. mochiquense</i>	106				
	107				
	108				
	109				
	110	BP	BP	BP	rumeni spodnji listi
<i>S. jamesii</i>	116				
	117				
	118				
	119				
	120	kalusi, zaviti listi	kalusi, zaviti listi	kalusi, zaviti listi	kalusi, zaviti listi, rumeni spodnji listi

Se nadaljuje

Nadaljevanje

	PVY ^{NTN} zap. št.	5 dpi	8 dpi	11 dpi	14 dpi
<i>S. venturii</i> 896-4	126				
	127				
	128				
	129				
	130	BP	BP	BP	BP
<i>S. venturii</i> 366-2	136				
	137				
	138				
	139				
	140	BP	BP	BP	nekroze spodnjih listov
<i>S. venturii</i> 741-1	146				
	147				
	148				
	149				
	150	nekroze na steblih in listih	nekroze na steblih in listih	nekroze na steblih in listih	nekroze na steblih in listih

Priloga 3: Tabela z opisom morfoloških znakov kontrolnih in agroinfiltriranih sort *S. tuberosum* L.

		5 dpi	12 dpi	19 dpi	28 dpi
Igor	kontrola	BP	BP	odpadli spodnji rumeni listi	BP
	VIGS	infiltrirani listi odpadli preden se je virus razširil	infiltrirani listi odpadli preden virus razširil	infiltrirani listi odpadli preden virus razširil	infiltrirani listi odpadli preden virus razširil
Desiree	kontrola	BP	BP	BP	nekroze listi
	VIGS	brez znakov utišanja	brez znakov utišanja	brez znakov utišanja	brez znakov utišanja
Sante	kontrola	BP	BP	BP	BP
	VIGS	brez znakov utišanja	brez znakov utišanja	brez znakov utišanja	brez znakov utišanja
PW363	kontrola	BP	BP	BP	nekroze na konicah starejših listov
	VIGS	brez znakov utišanja	nekroze na konicah starejših listov	nekroze na konicah starejših listov	nekroze na konicah starejših listov
Rywal	kontrola	BP	BP	kalusi, nekroze listov	kalusi, nekroze listov
	VIGS	brez znakov utišanja	brez znakov utišanja	kalusi, nekroze listov	kalusi, nekroze listov
Rywal NahG 16	kontrola	BP	BP	BP	BP
	VIGS	brez znakov utišanja	povsem propadli, nekroze se širijo po žilah	povsem propadli, nekroze se širijo po žilah	povsem propadli

Se nadaljuje

Nadaljevanje

		5 dpi	12 dpi	19 dpi	28 dpi
Desiree J3	kontrola	BP	BP	nekroze listi	nekroze listi
	VIGS	brez znakov utišanja	brez znakov utišanja	brez znakov utišanja	brez znakov utišanja
Desiree NahG D2	kontrola	BP	BP	BP	BP
	VIGS	brez znakov utišanja	povsem propadli, nekroze se širijo po žilah	povsem propadli, nekroze se širijo po žilah	povsem propadli
N. benthamiana	kontrola	BP	BP	BP	BP, cveti
	VIGS	bel fenotip listi	bel fenotip listi	bel fenotip listi	povsem bela rastlina