

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Anže ŠVARA

**IZRAŽANJE ODPORNOSTNIH GENOV PRI HMELJU
(*Humulus lupulus L.*) PO OKUŽBI Z GLIVO
*Verticillium albo-atrum***

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja

Ljubljana, 2015

UNIVERZAV LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

ANŽE ŠVARA

IZRAŽANJE ODPORNOSTNIH GENOV PRI HMELJU (*Humulus lupulus L.*) PO OKUŽBI Z GLIVO *Verticillium albo-atrum*

MAGISTRSKO DELO
Univerzitetni študij - 2. stopnja

**DIFFERENTIAL EXPRESSION OF VERTICILLIUM WILT
RESISTANCE RELATED GENES IN HOP (*Humulus lupulus L.*)**

M. SC. THESIS
Master Study Programmes

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa 2. stopnje Biotehnologija.
Delo je bilo opravljeno na Univerzi v Ljubljani, Biotehniški fakulteti, Oddelku za
agronomijo, Katedri za genetiko, biotehnologijo, statistiko in žlahtnjenje rastlin.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorico magistrskega dela imenovala doc. dr.
Natašo Štajner in za recenzenta dr. Sebastjana Radiška.

Komisija za oceno in zagovor:

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

Član: doc. dr. Nataša Štajner
 Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: dr. Sebastjan Radišek
 Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije

Datum zagovora: 31. 8. 2015

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

Anže Švara

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du2
DK	UDK 633.791:577.2(043.2)
KG	molekularna genetika/hmelj/ <i>Verticillium</i> /diferencialno izražanje/obrambni geni/PCR/qPCR/BLAST
AV	ŠVARA, Anže, dipl. bioteh. (UN)
SA	ŠTAJNER, Nataša (mentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Biotehnologija MSc
LI	2015
IN	IZRAŽANJE ODPORNOSTNIH GENOV PRI HMELJU (<i>Humulus lupulus L.</i>) PO OKUŽBI Z GLIVO <i>Verticillium albo-atrum</i>
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja)
OP	XIV, 94 str., 10 pregl., 28 sl., 6 pril., 199 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Hmelj (<i>Humulus lupulus L.</i>) je dvodomna kmetijska rastlina, ki se v največji meri uporablja pri proizvodnji piva. Pridelavo hmelja od leta 1997 v Sloveniji ogroža bolezen verticilijske uvelosti pri hmelju, ki jo povzroča patogena gliva <i>Verticillium albo-atrum</i> . Namen naloge je bil identificirati obrambno vlogo tarčnih genov v interakciji <i>H. lupulus L.</i> - <i>V. albo-atrum</i> z metodo PCR v realnem času. Analizirali smo izražanje v koreninah in steblih občutljive sorte Celeia ter odporne sorte Wye Target v treh časovnih točkah po okuževanju. Preverili smo pomnoževanje 24 tarčnih zaporedji, ki predstavljajo domene potencialnih obrambnih genov. Nadalje smo uspešno pomnožili in analizirali 17 tarčnih transkriptov, ki smo jim pripisali in potrdili vlogo na proteinskem nivoju s pomočjo spletnega algoritma BLASTX. Kolonizacijo glive v koreninah in v steblih dveh kultivarjev hmelja smo analizirali z metodo qPCR na nivoju DNA in s tem določili količino glive v posameznih obravnavanjih. V povprečju je bila količina glive pri odpornem kultivarju manjša kot pri občutljivem. Z delta-delta Ct metodo, smo določili relativno diferencialno izražanje tarčnih genov med okuženimi in neokuženimi vzorci ter analizirali izražanje v posameznih organih in v dveh kultivarjih. Izražanje tarčnih genov smo normalizirali na osnovi referenčnih genov, ki so bili validirani s pomočjo javno dostopnih algoritmov RefFinder (geNorm, Normfinder, BestKeeper, in delta-delta Ct method) za izračun stabilnosti izražanja ter izbrali dva najbolj stabilno izražena housekeeping gena <i>CAC</i> in <i>YLS-8</i> . Izražanje večine tarčnih genov je bilo povečano v steblih okuženih rastlin v časovni točki 6 dpi, ekspresija je bila večja pri odpornem kultivarju, medtem ko je v koreninah pri večini analiziranih genov prišlo do utišanja.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du2
DC UDC 633.791:577.2(043.2)
CX molecular genetics/hops/*Verticillium*/pcr/differential gene expression/defence genes/qPCR/BLAST
AU ŠVARA, Anže
AA ŠTAJNER, Nataša (supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Biotechnology
PY 2015
TY DIFFERENTIAL EXPRESSION OF VERTICILLIUM WILT RESISTANCE RELATED GENES IN HOP (*Humulus lupulus L.*)
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)
NO XIV, 94 p., 10 tab., 28 fig., 6 ann., 199 ref.
LA sl
Al sl/en
AB Hop (*Humulus lupulus L.*) is dioecious crop, economically important for brewing industry. Female plant production in Slovenia has been threatened by the first major outbreak of lethal disease of Verticillium wilt in 1997, caused by *Verticillium albo-atrum*. The central objective of the research project was to obtain and identify defence role of target genes in *H. lupulus L.* - *V. albo-atrum* interaction, using method of RT-qPCR. Analysis included roots and stems of two hop varieties, susceptible (Celeia) and resistant (Wye Target) obtained from different time points after inoculation. Amplification of 24 targeted transcripts has been tested. However, 17 targeted transcripts coding protein domains were chosen and studied for their role in defence mechanisms and plant response upon infection by *V. albo-atrum*. Molecular cell function of target sequences has been confirmed using BLASTX internet search tool. Sequences have been aligned to nucleotide protein database sequences of related plant species and also hop. Analyses of colonisation pattern has been studied, using stem and root compartments. The colonization revealed on average lower amount of fungi in samples of resistant cultivar. Using delta-delta Ct analysis of target gene amplification, relative differences in expression levels between infected and non-infected plants were determined. We normalized the amplification results of target transcripts with validated reference genes, *CAC* and *YLS-8*, which proved to be the most stable. Validation was performed using RefFinder algorithms (geNorm, Normfinder, BestKeeper, in delta-delta Ct method). Finally, relative expression of target genes was in most cases up-regulated in infected stems in time point 6 dpi and increased in resistant variety, and down-regulated in roots for most target genes.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	V
KAZALO VSEBINE	VI
KAZALO PREGLEDNIC	IX
KAZALO PRILOG	XIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XIV
1 UVOD	1
1.1 NAMEN IN CILJI NALOGE	2
1.2 HIPOTEZE	3
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 HMELJ (<i>Humulus lupulus L.</i>)	4
2.2 VERTICILIJSKA UVELOST HMELJA	6
2.2.1 Taksonomija glice <i>Verticillium albo-atrum</i>	6
2.2.2 Verticilijska uvelost pri hmelju	9
2.2.3 Cikel bolezni	11
2.3 OBRAMBNI MEHANIZMI RASTLINE	13
2.3.1 Gen <i>Vel</i> podaja odpornost na verticilij pri paradižniku	15
2.3.2 Z mikrobi povezani molekularni vzorci in receptorji za prepoznavo MAMP	15
2.3.3 S strani patogenov pridobljena odpornost	16
2.3.4 Reaktivne kisikove zvrsti (ROS)	17
2.3.5 Obrambni proteini	17
2.3.5.1 S patogenezo povezani proteini (PR)	18
2.3.5.2 R proteini	18
2.3.6 Prepoznavna efektorjev patogena	19
2.3.7 Aktivacija R proteinov	19
2.3.8 Signalizacija R proteinov	20

2.4 KVANTITATIVNI PCR V REALNEM ČASU (QPCR)	21
3 MATERIALI IN METODE	23
3.1 RASTLINSKI MATERIAL	23
3.1.1 Izolacija DNA	24
3.1.2 Izolacija RNA	24
3.1.3 Preverjanje integritete RNA z gelsko elektroforezo in RIN testom	26
3.2 ANALIZA USPEŠNOSTI INOKULACIJE Z GLIVO <i>Verticillium albo-atrum</i> ..	26
3.2.1 Pomnoževanje DNA fregmentov z oligonukleotidnimi začetniki, specifičnimi za <i>Verticillium albo-atrum</i>	26
3.2.2 Gelska elektroforeza in ločevanje pomnoženih fragmentov	26
3.3 ANALIZA DIFERENCIALNE EKSPRESIJE GENOV.....	27
3.3.1 Izdelava oligonukleotidnih začetnikov specifičnih za tarčne gene	27
3.3.2 Postopek prepisovanja RNA v cDNA	28
3.4 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO V REALNEM ČASU (qPCR)	28
3.4.1 Analiza pomnoženih regij	29
3.4.2 Analiza pomnoženih sekvenc s pomočjo spletnega orodja BLAST	29
3.4.3 Validacija housekeeping genov s spletnimi algoritmi	30
4 REZULTATI Z RAZPRAVO	31
4.1 BLAST NA HMELJNI GENOM	31
4.2 BLAST NA VERTICILIJEV GENOM	31
4.3 BLAST V ZBIRKI NCBI	31
4.4 GLIVNA DNA	37
4.4.1 Test uspešnosti inokulacije	37
4.4.2 Kvantifikacija glivne DNA v okuženih rastlinah	39
4.4.3 Analiza učinkovitosti pomnoževanja tarčnih produktov z RT-qPCR	41
4.5 IZBOR IN VALIDACIJA REFERENČNIH GENOV	41
4.6 ANALIZA DIFERENCIALNO IZRAŽENIH GENOV	43
4.6.1 Proteinska fosfataza 2c 57	45
4.6.2 G-tip lektinski S-receptor, serin/treonin proteinska kinaza 120	46
4.6.3 E3 ubikvitin proteinska ligaza	47

4.6.4 Z glicini bogat RNA vezni protein	49
4.6.5 Protein 40, ki vsebuje ccch domeno cinkovega prsta.....	50
4.6.6 Cinamat-4-hidroksilaza	52
4.6.7 Proteinska fosfataza GPCR.....	53
4.6.8 Cikloartenol sintaza	54
4.6.9 Giberelinski receptor gid1	55
4.6.10 Feronija receptor podobna kinaza	57
4.6.11 PAL1_ARATH	59
4.6.12 Peroksidaza 52	60
4.6.13 Peroksidaza razreda III	61
4.6.14 Germin podoben protein 3	63
4.6.15 Z mitogenom aktivirani proteinski kinazi 1 in 2	64
4.6.16 Peroxiredoksin IIF	66
4.7 KOMENTAR REZULTATOV	68
5 SKLEPI	73
6 POVZETEK	76
7 VIRI	79
ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Število vzorčenih rastlin v posameznih časovnih točkah po inokulaciji z glivo	23
Preglednica 2: Začetni oligonukleotidni začetniki specifični za pomnoževanje glivne DNA (<i>V. albo-atrum</i>)	26
Preglednica 3: Poravnava tarčnih zaporedij genov z NCBI podatkovno zbirko na proteinskem nivoju s spletnim orodjem BLASTX	32
Preglednica 4: Seznam izdelanih 22-ih parov oligonukleotidnih začetnikov za pomnoževanje z metodo kvantitativne PCR reakcije	36
Preglednica 5: Okuženi vzorci v testu uspešnosti okuževanja hmelja sorte Celeia in Wye Target z metodo PCR s specifičnimi oligonukleotidnimi začetniki za <i>V. albo-atrum</i> po končnem ločevanju na agaroznem gelu (Ime združenih vzorcev pove: Število dni po inokulaciji (6, 12 in 18). Kultivar hmelja (CE - Celeia; WT - Wye Target), okužen ali neokužen vzorec (+ okužen; - neokužen), del rastline (R - korenine; S - steblo). Stolpec "Test": Levi stolpec predvidena okužba, desno dejanska okužba po testu na elektroforezi: 1 - zaznali glivno DNA; 0 - glivne DNA nismo zaznali; ? - ni znano ali je prišlo do okužbe ali ne).....	38
Preglednica 6: Neokuženi vzorci v testu uspešnosti okuževanja hmelja sorte Celeia in Wye Target z metodo PCR s specifičnimi oligonukleotidnimi začetniki za <i>V. albo-atrum</i> po končnem ločevanju na agaroznem gelu (Ime združenih vzorcev pove: Število dni po inokulaciji (6, 12 in 18). Kultivar hmelja (CE - Celeia; WT - Wye Target), okužen ali neokužen vzorec (+ okužen; - neokužen), del rastline (R - korenine; S - steblo). Stolpec "Test": Levi stolpec predvidena okužba, desno dejanska okužba po testu na elektroforezi: 1 - zaznali glivno DNA; 0 - glivne DNA nismo zaznali; ? - ni znano ali je prišlo do okužbe ali ne).....	39
Preglednica 7: Prikaz relativne količine DNA glive, izolirane iz koreninskih (R) in stebelnih (S) vzorcev hmelja sorte Celeia (CE) in Wye Target (WT), v časovnih točkah 6, 12 in 18 dpi (dni po okuževanju)	39
Preglednica 8: Prikaz učinkovitosti pomnoževanja tarčnih sekvenc pri združenih vzorcih posebej korenin (S) in stebel (R) z metodo qPCR.....	41
Preglednica 9: Vrednosti normalizacije izražanaja referenčnih genov z algoritmi Delta CT, Bestkeeper, Normfinder, Genorm ter skupna validacija pri steblih. Geni z nižjo vrednostjo se bolj stabilno izražajo	42
Preglednica 10: Vrednosti normalizacije izražanaja referenčnih genov z algoritmi Delta CT, Bestkeeper, Normfinder, Genorm ter skupna validacija pri koreninah. Geni z nižjo vrednostjo se bolj stabilno izražajo	42

KAZALO SLIK

Slika 1: Nasad trt hmelja	5
Slika 2: Skupki konidijev glive <i>Verticillium</i> na fialidah, nastali vretenasto okoli konidiofora (Berlanger in Powelson, 2005)	7
Slika 3: Konidiofor glive <i>V. albo-atrum</i> (400-kratna povečava, Foto: T. Svetek, 2010).....	8
Slika 4: Blaga oblika verticilijske uvelosti: odebelenja okužena rastlina in ovijajoča neokužena (Down in sod., 2007)	10
Slika 5: Letalna oblika verticilijske uvelosti: ekstenzivno in hitro razbarvanje ter venenje listov in stranskih poganjkov (Down in sod., 2007).....	10
Slika 6: Vzdolžni presek hmeljnega steba, okuženega z <i>V. albo-atrum</i> (levo): rjavo razbarvanje celotnega žilnega sistema je značilno za letalni patotip glive; vzdolžni prerez zdrave rastline hmelja (desno) (Down in sod., 2007).....	11
Slika 7: Bolezenski cikel bolezni verticilijske uvelosti (Berlanger in Powelson, 2005)....	12
Slika 8: Shematični prikaz gostiteljeve obrambne signalizacije ob napadu glive <i>V. albo-atrum</i> . Specifične kaskade vodijo do različnih izidov v interakciji rastlina patogen, ki segajo od bolezenskega fenotipa rastline brez simptomov (R - resistant) do milih bolezenskih simptomov (T - tolerant) in letalne oblike (S - susceptible). Toleranca (T) rastline prikazuje fenotip delne odpornosti rastline na patogena (Fradin in Thomma, 2006).....	14
Slika 9: Signalni dogodki, ki so vpleteni v imunost rastline. a) Pri odpornih rastlinah citoplazmatski odpornostni (R) proteini in z membrano povezani odpornostni (R) proteini direktno ali indirektno sprožijo imunski odziv (zaradi efektorjev sprožen imunski odziv), s pomočjo nadziranja določenih rastlinskih proteinov. Aktivirani R proteini posledično sprožijo genetsko reprogramiranje in izvedejo fiziološke spremembe v okuženi celici, kar se kaže v odpornosti. b) Prikaz nekaterih ključnih komponent, ki so aktivirane ob CC- in TIR-NB-LRR R proteinsko posredovani odpornosti (Monaghan in sod., 2009).....	21
Slika 10: Prikaz povprečja treh ponovitev in standardnih odklonov od povprečja relativne količine DNA glive, izolirane iz koreninskih (R) in stebelnih (S) vzorcev hmelja sorte Celeia (CE) in Wye Target (WT), v časovnih točkah 6, 12 in 18 dpi (dni po okuževanju).	40
Slika 11: Talilna krivulja disociacijske qPCR analize za tarčni gen cinnamate 4-hydroxylase prikazuje en vrh disociacije pri temperaturi 77,4 °C za vse analizirane vzorce.....	44

Slika 12: Prikaz diferencialno izraženega zaporedja HO059224 v primerjavi med neokuženo in okuženo rastlino hmelja pri sorti Celeia (CE) in Wye Target (WT) v časovnih točkah 6, 12 in 18 dpi v koreninah (R) in steblih (S)	45
Slika 13: Prikaz diferencialno izraženega zaporedja HO059063 v primerjavi med neokuženo in okuženo rastlino hmelja pri sorti Celeia (CE) in Wye Target (WT) v časovnih točkah 6, 12 in 18 dpi v koreninah (R) in steblih (S)	46
Slika 14: Prikaz diferencialno izraženega zaporedja HO059122 v primerjavi med neokuženo in okuženo rastlino hmelja pri sorti Celeia (CE) in Wye Target (WT) v časovnih točkah 6, 12 in 18 dpi v koreninah (R) in steblih (S)	48
Slika 15: Prikaz diferencialno izraženega zaporedja HO059225 v primerjavi med neokuženo in okuženo rastlino hmelja pri sorti Celeia (CE) in Wye Target (WT) v časovnih točkah 6, 12 in 18 dpi v koreninah (R) in steblih (S)	49
Slika 16: Prikaz diferencialno izraženega zaporedja HO059229 v primerjavi med neokuženo in okuženo rastlino hmelja pri sorti Celeia (CE) in Wye Target (WT) v časovnih točkah 6, 12 in 18 dpi v koreninah (R) in steblih (S)	51
Slika 17: Prikaz diferencialno izraženega zaporedja HO059238 v primerjavi med neokuženo in okuženo rastlino hmelja pri sorti Celeia (CE) in Wye Target (WT) v časovnih točkah 6, 12 in 18 dpi v koreninah (R) in steblih (S)	52
Slika 18: Prikaz diferencialno izraženega zaporedja HO059256 v primerjavi med neokuženo in okuženo rastlino hmelja pri sorti Celeia (CE) in Wye Target (WT) v časovnih točkah 6, 12 in 18 dpi v steblih (S)	53
Slika 19: Prikaz diferencialno izraženega zaporedja HO059263 v primerjavi med neokuženo in okuženo rastlino hmelja pri sorti Celeia (CE) in Wye Target (WT) v časovnih točkah 6, 12 in 18 dpi v koreninah (R) in steblih (S)	55
Slika 20: Prikaz diferencialno izraženega zaporedja HO059234 v primerjavi med neokuženo in okuženo rastlino hmelja pri sorti Celeia (CE) in Wye Target (WT) v časovnih točkah 6, 12 in 18 dpi v koreninah (R) in steblih (S)	56
Slika 21: Prikaz diferencialno izraženega zaporedja HO059267 v primerjavi med neokuženo in okuženo rastlino hmelja pri sorti Celeia (CE) in Wye Target (WT) v časovnih točkah 6, 12 in 18 dpi v koreninah (R) in steblih (S)	58
Slika 22: Prikaz diferencialno izraženega zaporedja PAL1 ARATH v primerjavi med neokuženo in okuženo rastlino hmelja pri sorti Celeia (CE) in Wye Target (WT) v časovnih točkah 6, 12 in 18 dpi v koreninah (R) in steblih (S)	59
Slika 23: Prikaz diferencialno izraženega zaporedja PRX5217103 v primerjavi med neokuženo in okuženo rastlino hmelja pri sorti Celeia (CE) in Wye Target (WT) v časovnih točkah 6, 12 in 18 dpi v koreninah (R) in steblih (S)	61

Slika 24: Prikaz diferencialno izraženega zaporedja PRX346815 v primerjavi med neokuženo in okuženo rastlino hmelja pri sorti Celeia (CE) in Wye Target (WT) v časovnih točkah 6, 12 in 18 dpi v koreninah (R) in steblih (S)	62
Slika 25: Prikaz diferencialno izraženega zaporedja GER34511 v primerjavi med neokuženo in okuženo rastlino hmelja pri sorti Celeia (CE) in Wye Target (WT) v časovnih točkah 6, 12 in 18 dpi v steblih (S)	63
Slika 26: Prikaz diferencialno izraženega zaporedja MPK116136 v primerjavi med neokuženo in okuženo rastlino hmelja pri sorti Celeia (CE) in Wye Target (WT) v časovnih točkah 6, 12 in 18 dpi v koreninah (R) in steblih (S)	65
Slika 27: Prikaz diferencialno izraženega zaporedja MPK17621 v primerjavi med neokuženo in okuženo rastlino hmelja pri sorti Celeia (CE) in Wye Target (WT) v časovnih točkah 6, 12 in 18 dpi v koreninah (R) in steblih (S)	65
Slika 28: Prikaz diferencialno izraženega zaporedja PRXIIF8556 v primerjavi med neokuženo in okuženo rastlino hmelja pri sorti Celeia (CE) in Wye Target (WT) v časovnih točkah 6, 12 in 18 dpi v koreninah (R) in steblih (S)	67

KAZALO PRILOG

PRILOGA A Test uspešnosti okuževanja hmelja z glivo *V. albo-atrum*

PRILOGA B Seznam vzorcev izolirane DNA s pripadajočimi koncentracijami ter redčitvami za nadaljno analizo glivne kolonizacije

PRILOGA C RIN test za izolirane RNA vzorce 2-76

PRILOGA D Podatki za združene vzorce hmelja

PRILOGA E Prikaz vrednosti povprečij diferencialnega izražanja tarčnih genov

PRILOGA F Vrednosti relativne količine glivne DNA za posamezne vzorce v koreninah (R) in steblih (S) sorte Wye Target (WT) in Celeia (CE) v treh časovnih točkah (6, 12 in 18 dpi)

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

2-ME	2-merkaptetoanol
ABA	Abscizinska kislina (ang. Abscizic acid)
AFLP	Dolžinski polimorfizem pomnoženih fragmentov (ang. Amplified fragment lenght polymorfism)
ATP	Adenozin trifosfat (ang. Adenosine triphosphate)
BLAST	Bioinformacijsko orodje za lokalno primerjavo nukleotidnih ali proteinskih zaporedij s podatkovno zbirkom (ang. Basic Local Alignment Search Tool)
BLASTN	Nukleotidni BLAST
bp	Baznih parov
CE	Celeia
CC	Ovita vijačnica (ang. Coiled coil)
CSD	Cold-Shock domena (ang. Cold-Shock domain)
Ct	Pražni cikel (ang. Cycle threshold)
DArTs	Raznolike tehnologije mrež (ang. Diversity Arrays Technologies)
DNA	Deoksiribonukleinska kislina (ang. Deoxyribonucleic acid)
dpi	Dnevi po inokulaciji (days post inoculation)
dsRNA	Dvostranska RNA (doublestranded RNA)
EST	Oznaka izraženega zaporedja (ang. Expressed sequence tags)
ET	Etilen
GA	Giberelinska kislina (ang. Gibberellic acid)
GPCR	G protein-coupled receptor-like protein
GRP	Z glicinom bogat protein (ang. Glycine Rich Protein)
H ₂ O ₂	Vodikov peroksid
HK	Hišni gen (ang. Housekeeping gene)
HR	Hiperobčutljivostni odziv (ang. Hypersensitive response)
JA	Jasmonska kislina (ang. Jasmonic acid)
LRR	Z leucini bogata ponovitev (Leucine rich repeat)
MAS	Z označevalci posredovana selekcija (ang. Marker assisted selection)
MAMP	Z mikrobi povezani molekularni vzorci (ang. Microbe Associated Molecular Pattern)
MAPK	Z mitogenom-aktivirana protein kinaza (ang. Mitogene Activated Protein Kinase)
MO	Molekularni označevalec
mRNA	Sporočilna ribonukleinska kislina (ang. Messenger ribonucleic acid)
NB	Nukleotid-vezna domena (ang. nucleotide-binding domain)
PAMP	Za patogene značilni molekularni vzorci (ang. Pathogen-associated molecular pattern)
PDR	Z zajedalcem pogojena odpornost (ang. Parasite derived resistance)

PRR	Receptor za prepoznavo patogena (ang. Pathogene Recognition Receptor)
PTGS	Post translacijsko utišanje genov (ang. Post translational gene supression)
QTL	lokus(i) kvantitativne lastnosti (ang. Quantitative Trait Loci)
RAPD	Naključno pomnožena polimorfna DNA (ang. Randomly amplified polymorfic DNA)
RIN	Integritetno število RNA (ang. RNA Integrity Number)
RISC	Z RNA inducirani kompleks utišanja (RNA-induced silencing complex)
RLK	Receptorjem podobne kinaze (ang. Receptor like kinase)
RLP	Receptorjem podobni proteini (ang. Receptor like proteins)
RNA	Ribonukleinska kislina (ang. Ribonucleic acid)
ROS	Reaktivne kisikove zvrsti (Reactive oxigen species)
RRM	RNA prepoznavni motiv (ang. RNA-recognition motif)
SA	Salicilna kislina (ang. Salicylic acid)
SAR	Sistemsko pridobljena odpornost (ang. Systemic acquired resistance)
SCAR	S sekvenco okarakterizirana pomnožena regija (ang. Sequence characterized amplified region)
Ser	Serin
SSR	Kratka ponovitev zaporedja (ang. Simple sequence repeats)
TIR	Toll in interleukinu 1 regijsko podoben receptor (ang. Toll and Interleukin 1 like receptor)
TF	Transkripcijski faktor (ang. Trancription factor)
Thr	Treonin (ang. Threonin)
WT	Wye Target

1 UVOD

Hmelj (*Humulus lupulus* L.) je kmetijsko in ekonomsko pomembna rastlina, ki se v veliki večini goji za uporabo v pivovarski industriji, v manjši meri pa se uporablja v farmacevtski industriji. Pridelava hmelja je ekonomsko najpomembnejša v državah Nemčije, ZDA, Češke, Poljske, Anglije in Slovenije. Uspešno pridelavo hmelja otežujejo rastlinske patogene glive in plesnivke, ki so stalna in poglavitna grožnja svetovni varnosti hrane ter predstavljajo največjo skupino povzročiteljev bolezni pri rastlinah na svetu. Najbolj pogosti primeri teh so hmeljeva pepelovka (*Podosphaera macularis*), hmeljeva peronospora (*Pseudoperonospora humuli*) in verticilijska uvelost (*Verticillium albo-atrum*) (Mahaffee in sod., 2009). Pridelovalci hmelja se soočajo z agresivno vaskularno boleznijo, imenovano verticilijska uvelost, ki jo povzroča gliva *Verticillium albo-atrum*, proti kateri zaenkrat ne poznamo učinkovite zaštite. Edina poznana in najučinkovitejša obramba proti tej glivi so naravna odpornost gostitelja ter fitosanitarni ukrepi in kolobar z negostitelskimi rastlinami.

Študije obrambnih sistemov pri rastlinah pridobivajo na pomenu v zadnjih letih. Mnogo tovrstnih raziskav temelji na osnovi analize genske ekspresije, saj tako pridobimo vpogled v obrambne mehanizme rastline v različnih fazah stresa. Merjenje presežnosti izražanja genskih transkriptov pri genih, ki so vpleteni v obrambo rastline z metodo kvantitativne verižne reakcije s polimerazo v realnem času, je mogoče pri različnih vzorcih pri celi vrsti tarčnih genov. Metoda ima visoko občutljivost za zaznavanje razlik v količini mRNA, posledično pa se prav vse variacije pri vzorčenju, laboratorijskem delu, standardnih postopkih, kvaliteti rastlinskega materiala, učinkovitosti pomnoževanja in bioloških vzorcih odrazijo na končnem rezultatu. Zavoljo tega smo v magistrski nalogi uporabili metodo normalizacije diferencialno izraženih tarčnih genov s pomočjo referenčnih genov, katerih izražanje naj bi bilo v različnih eksperimentalnih bioloških pogojih skozi čas konstantno.

Analiza rastlinskih obrambnih mehanizmov na osnovi diferencialno izraženih genov je pomemben korak na poti razumevanja odpornosti rastlin na bolezni. V magistrski nalogi smo ovrednotili pomnoževanje 24 tarčnih zaporedij, ki predstavljajo domene 18 genov, potencialno odgovornih za obrambni odgovor in odpornost na verticilijsko uvelost hmelja. V končni fazi smo analizirali 17 transkriptov tarčnih genov. Pri tem smo ovrednotili izražanje 4 referenčnih genov (*CAC*, *DRHI*, *SAND*, *YLS8*), ki so se v preliminarnih študjah diferencialne ekspresije genov pri hmelju izkazali za potencialno najboljše referenčne gene ob biotskem stresu (Štajner in sod., 2013). Geni so bili analizirani v koreninah in steblih pri odporni sorti hmelja Wye Target ter pri občutljivi sorti Celeia v treh časovnih točkah. Izmerili smo relativno količino DNA glive v rastlinah v vseh rastlinskih delih in časovnih točkah.

1.1 NAMEN IN CILJI NALOGE

Osnovni namen raziskovalnega projekta je pridobiti boljši vpogled v mehanizme odgovora hmelja na okužbo z glivo *Verticillium albo-atrum* ter z metodo kvantitativne verižne reakcije s polimerazo v realnem času identificirati in potrditi vlogo izbranih genov, ki so potencialno vključeni v mehanizme odpornosti in obrambe rastline. Identifikacija takšnih genov bi lahko:

- razkrila potencialne tarčne gene, ki bi lahko v prihodnosti bili uporabljeni kot markerski geni v žlahtnjenju hmelja z namenom razvoja odpornosti ter pri razvoju trajno odpornih sort hmelja,
- pridobila nov, splošen vpogled v rastlinske mehanizme odpornosti in obrambe, ki bi lahko bili osnova za nadaljne podobne študije pri ostalih sortah, vrstah v interakciji rastlina-patogen ter razvoj ostalih pristopov za zatiranje.

Cilji naloge:

- Kvantitativno ovrednotenje diferencialnega izražanja tarčnih genov, ki so potencialno vpleteni v obrambne mehanizme hmelja po okužbi s patogeno glivo *V. albo-atrum*.
- Ovrednoteje in validacija referenčnih genov z namenom identifikacije najstabilnejših, ki smo jih uporabili pri procesu normalizacije rezultata kvantitativnega pomnoževanja tarčnih genov
- Preverjanje tarčnih zaporedij z uporabo spletnega orodja BLAST, z namenom pridobitve in potrditve informacije o molekularni vlogi pomnoženega fragmenta v hmelju in sorodnih vrstah
- Kvantifikacija glivne DNA v koreninah in steblu dveh genotipov hmelja v treh časovnih točkah, s pomočjo kvantitativne reakcije s polimerazo v realnem času.

Za dosego osnovnih ciljev smo analizirali izražanje tarčnih genov pri dveh kultivarjih hmelja z različno stopnjo odpornosti na verticilijsko hmeljevo uvelost (odporen genotip Wye Target in občutljiv genotip Celeia) ter v treh različnih časovnih točkah po inokulaciji (6, 12 in 18 dpi). Poleg tega smo ovrednotili izražanje genov tudi v posameznih rastlinskih organih, in sicer v koreninah ter v steblih, saj se gliva primarno iz prsti razširja skozi korenine in preko žilnega sistema stebel (ksilema) po rastlini navzgor.

1.2 HIPOTEZE

Pričakujemo višjo izražanje tarčnih genov, ki so odgovorni za odpornost hmelja na glivo *V. albo-atrum*. Pri neokuženih rastlinah pričakujemo znatno nižjo ekspresijo tarčnih genov za odpornost hmelja na glivo *V. albo-atrum*, kot pri okuženih rastlinah.

Ekspresija tarčnih genov, ki niso odgovorni za odpornost hmelja na glivo *V. albo-atrum*, bo ostala na osnovni ravni in ne bo povečana.

Ekspresija tarčnih genov, ki so odgovorni za odpornost hmelja na glivo *V. albo-atrum*, bo nižja pri neodporni sorti Celeia ter višja pri odporni sorti Wye Target.

Količina glive bo s časom po inokulaciji hitro naraščala in že zgodaj upadla v koreninah ter naraščala v stebelnih vzorcih. Vzorec kolonizacije bo različen pri odporni sorti Wye Target in občutljivi sorti Celeia in sicer bo količina glivne DNA pričakovano nižja v koreninah in steblu pri odporni sorti Wye Target.

2 PREGLED OBJAV

2.1 HMELJ (*Humulus lupulus* L.)

Hmelj (*Humulus lupulus* L.) je trajna zelnata kmetijska rastlina, ki raste v regijah zmernega podnebnega pasu po vsem svetu (Neve, 1991). Rod *Humulus* je eden izmed dveh rodov iz družine konpoljevk (Canabaceae) ter združuje tri vrste: *H. lupulus* L., *H. japonicus*, (=*H. scandens* (Lour.) Merr.) in *H. yunnanensis* (Small, 1978). Prav vse vrste rodu *Humulus* so prisotne na kitajskem. Vrsta *H. lupulus* L. (Slika 1) obsega pet podvrst (ameriške, japonska in evropska) (Neve, 1991). Tako *H. lupulus* L. (Evropski navadni hmelj), kot *H. japonicus* (Japonski divji hmelj) sta dvodomni vzpenjajoči se rastlini s spolnimi kromosomi (Winge 1929), pri katerih se spol določa na podlagi ramerja med avtosomnimi in X kromosomi (Parker in Clark, 1991; Shepard, 2000). Sicer rastline glede na spol ločimo po cvetovih. Gre za vetrocvetno rastlino. Z namenom komercialne uporabe se goji le ženske rastline *H. lupulus*, ki jih v glavnem uporablja pivovarska industrija ter v manjši meri farmacevtska industrija. Ženska socvetja, oziroma storžki, vsebujejo grenke hmeljne smole, esencialna olja, polifenolne spojine ter tanine. Poglavitna spojina je lupulin, ki vsebuje veliko število sekundarnih metabolitov in nastaja v lupulinskih žlezah. Glavno vlogo v pivovarstvu imajo tudi hmeljne smole in eterična olja. Hmeljne smole se po tradiciji delijo med mehke (v heksanu topne) in trde smole. Med mehkimi smolami so v pivovarstvu najbolj cenjene alfa-kisline (humulon in analogi). Tekom varjenja piva se izomerizirajo v izo-alfa-kisline, ki dajejo pivu grenak okus. Manjši pomen pripisujemo beta-kislinam, ki delujejo protimikrobeno. Eterična olja sestavljajo spojine, katerih nastanek poteka po terpenoidni metabolni poti in večinoma se uvrščajo med monoterpane in seskviterpene (Neve, 1991). Karakteristike različnih spojin se v sortah hmelja precej razlikujejo. Kombinacija vseh naštetih spojin pa da hmelju, oziroma končnemu produktu piva značilno in raznoliko aromo, ki je odvisna od okoljskih pogojev tekom rasti ter časa rasti in obiranja storškov. Sorte hmelja delimo glede na vsebnost alfa-kislin na aromatične (pod 7 %), grenčične (med 7 % in 13 %) in visoko grenčične kultivarje (več kot 13 %) (Neve, 1991). Aromatični kultivarji imajo najvišje razmerje med eteričnimi olji in beta-kislinami v primerjavi z alfa-kislinami. Na svetu je poznanih okoli 200 sort hmelja, ki jih gojimo na okoli 80000 hektarjih (Patzak in sod., 2006). V letu 2010 je uradno registrirana svetovna pridelava okoli 100000 metričnih ton hmeljevih storškov (Pavlovič, 2014).

Kultivacija hmelja se je začela že leta 869. V srednjem veku se je razvila kompeticija med različnimi rastlinami za varjenje piva, kar pa je v končni fazи rezultiralo v prevladi vrste *H. lupulus* L. v 18. stoletju. Piva so se uporabljala tudi v medicinske namene (Behre, 1999). Popisovanje in žlahtnjenje hmelja sega v leto 1669, ko je Worlidge pisal v svoji *Systema agricultura*, da obstajata dve sorte hmelja, zelena in rjava, izmed katerih zelena nosi lastnost za boljšo barvo, rjava pa raste hitreje. Skoraj 100 let kasneje je J. Mills v New

System of Practical Husbandry pisal, da obstaja več sort hmelja, tudi takšne z visoko vsebnostjo alfa-kislin (Neve, 1986). V 19. stoletju je naraslo zanimanje za selekcijo izboljšanih raslinskih vrst hmelja. Leta 1901 je Percivall opisal 20 različnih angleških sort. V Nemčiji je Wagner opisal 20 bavarskih sort, Braungart pa je našel 60 evropskih sort hmelja. Pred in v 19. stoletju so z odbiro divjih akcесij hmelja nastali klasični aromatični kultivarji, v začetku 20. stoletja pa so bili na Češkem in v Žalcu v Spodnji Savinjski dolini uvedeni žlahtniteljski programi za ciljno žlahtnjenje s križanjem. (Neve, 1986). Izhodiščno je bilo žlahtnjenje usmerjeno v izboljševanje arome hmelja, nato pa v povečevanje odpornosti hmelja na škodljivce in bolezni, še kasneje pa v zviševanje vsebnosti grenčic. V zadnjem času spada med cilje žlahtnenja tudi zniževanje višine hmelja ter vzgoja kultivarjev z različnimi aromami in večjo vsebnostjo določenih spojin s farmakološko vrednostjo (Darby in sod., 2003). Najbolj pomembne sorte v Sloveniji so danes Aurora, Celeia, Bobek, Magnum in Savinjski golding (Kovačevič in Kač, 2002). Ker pridelovalne površine namenjene hmelju v Sloveniji tudi zaradi bolezni upadajo, je pomembno poznavanje obrambnih mehanizmov rastlin pri domačih kultivarjih. Zaradi tega na vrednosti pridobivajo lokalni kultivarji, prilagojeni na lokalno rastišče (Čerenak in sod., 2010). Dolgotrajno žlahtnjenje hmelja s konvencionalnimi metodami je bilo pospešeno z uvedbo modernih biotehnoloških metod. Tako so na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije (IHPS) v Žalcu izvedli številna križanja kultivarjev z zaželeno vsebnostjo alfa-kislin (kultivar 'Hallertauer Magnum'), ter z odpornostmi na pomembne bolezni (kultivar 'Wye Target') in škodljive (hmeljeva listna uš - kultivar 'Cascade') (Čerenak in Javornik, 2001).



Slika 1: Nasad trt hmelja

Pridelavo hmelja močno ovirajo različne bolezni. Najpomembnejše so bolezni gliv in plesnivk, najbolj na primer hmeljeva peronospora (*Pseudoperonospora humuli* Miyabe in Takah), hmeljeva pepelovka (*Podosphaera macularis* Braun) ter verticilijska uvelost (*Verticillium albo-atrum* Reinke & Berthold) (Dolinar in sod., 2002; Mahaffee in sod., 2009). Znanih je tudi nekaj za hmelj patogenih virusov in viroidov (Pethybridge in sod., 2008). Prav hmeljeva uvelost je poznana po zahtevni fitofarmacevtski kontroli, zaradi česar je žlahtnenje in razvoj odpornih sort trenutno najučinkovitejša možnost kontrole bolezni (Darby, 2001). Neve (1991) navaja, da so poznani viri odpornosti za vse tri glivične bolezni. Žlahtnenje kultivarjev hmelja s ciljem izboljšane odpornosti je počasno in delovno zahtevno. Zaradi tega omogoča selekcija z markerji (MAS) učinkovitejši in hitrejši napredok. Takšna selekcija zahteva večje število genskih označevalcev, ali pa izbor markerjev direktno povezanih z določeno lastnostjo (Collard in MacKill, 2008). Obstaja veliko publikacij, ki opisujejo različne markerske sisteme, ki so bili uspešno uporabljeni pri hmelju. Tako je bil objavljen dolžinski polimorfizem pomnoženih fragmentov (AFLP), naključno pomnožena polimorfna DNA (RAPD), kratke sekvenčne ponovitve (SSR), različne tehnologije mrež (DArTs) (Howard in sod., 2011). Poleg markerjev pridobljenih s pomočjo izraženega dela hmeljevega genoma, je pridobljenih nekaj genov iz markerjev STS (Sequence-Tagged Sites) (Patzak in sod., 2007) ter EST sekvence, iz katerih so pridobljeni SSR markerji (Jakše in sod., 2011). Prav tako so Jakše in sod. (2013) določili lokus za kvantitativne lastnosti v povezavi z odpornostjo na verticilijsko uvelostjo. Kljub temu se uporaba z markerji posredovane selekcije še vedno v največji meri uporablja za določanja spola rastlin hmelja (Polley in sod., 1997; Jakše in sod., 2008).

2.2 VERTICILIJSKA UVELOST HMELJA

2.2.1 Taksonomija glive *Verticillium albo-atrum*

Verticillium je rod gliv v deblu zaprtotrosnih gliv (Ascomycota), ki je anamorfna (ni prisotnih spolnih oblik) oblika družine Plectosphaerellaceae. Uvrščamo jo v razred Ascomycetes, podrazred Sordariomycetidae, red Hypocreales in družino Hypocreaceae. Rod vsebuje raznolike skupine saprotrofnih in parazitskih gliv. Takson je definiran s pomočjo širokega spektra različnih karakteristik, ki so preproste, a slabo definirane. Rod po navedeni razdelitvi sestavlja 51 vrst ter je v grobem razdeljen na tri ekološko razdeljene skupine (Kirk in sod., 2008). To so mikopatogeni, entomopatogeni ter rastlinski patogeni. Kljub temu da se v zadnjem času večina entomopatogenih in mikopatogenih gliv uvršča v nov rod imenovan *Lecanicillium*, spadajo zajedavci nematod v rod *Pochonia* in *Haptocillium*, nekateri rastlinski patogeni pa v rod *Gibellulopsis* in *Musicillium* (Inderbitzin in sod., 2011).

Z izvedbo filogenetskih analiz na petih različnih lokusih, ki so regija ITS, kodirajoči gen za aktin (ACT), elongacijski faktor 1-alfa (EF), gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (GPD) in triptofan sintaza (TS), preučevanjem morfologije, analizami herbarijev 74 izolatov rodu *Verticillium* ter študijo obstoječe literature so Inderbitzin in sod. (2011) določili taksonomijo gliv rodu *Verticillium*, ki sedaj sestoji iz desetih vrst, od katerih je pet vrst na novo določenih in do tedaj še ne poznanih znanosti. Te vrste so: *V. albo-atrum*, *V. alfalfa*, *V. dahliae*, *V. isaacii*, *V. klebahnii*, *V. longisporum*, *V. nonalfalfa*, *V. nubilum*, *V. tricorpus* in *V. zaregamsianum* (Inderbitzin in sod., 2011). Študijo smo izvedli z glivo ki se po starejši taksonomski razporeditvi imenuje *V. albo-atrum* (Kirk in sod., 2008), po novejši pa *V. nonalfalfa* (Inderbitzin in sod., 2011). V nalogi se držimo navajanja po Kirk in sod. (2008).

Najbolj poznane vrste so *V. dahliae*, *V. albo-atrum* in *V. longisporum*, ki povzročajo bolezen rastlin imenovano verticilijska uvelost pri več kot 400 rastlinskih vrstah dvokaličnic. *Verticillium albo-atrum* v rastlini proizvaja temen (temno rjav do črn) trajni melaniziran micelij, kot strukturo za preživetje v tleh (Zare in Gams, 2001). Gliva tvori bel in puhast micelij, ki ga tvorijo hialine ali steklasto obarvane hife, kjer se vretenasto nameščajo konidiofori (Slika 2) s fialidami, na katerih se v sluzastih sferičnih glavicah nahajajo konidiji (Slika 3) ali trosi. Slednji so ovalni do elipsoidni ter so enocelični in so lahko septirani (Radišek, 2001).



Slika 2: Skupki konidijev glive *Verticillium* na fialidah, nastali vretenasto okoli konidiofora (Berlanguer in Powelson, 2005)

V. albo-atrum okužuje naslednje poljščine, ki veljajo za ekonomsko pomembnejše: hmelj, krompir, paradižnik, kumare in lucerno. V nekaterih rastlinah encimi (poligalakturonaze, pektat-liaze in celulaze), ki jih izloča glivna celična stena, povzročijo zamašitev prevodnih sistemov z nastankom vaskularnih gelov, ki se tvorijo iz komponent rastlinske celične stene (Vander Molen in sod., 1983). V ostalih interakcijah rastlina aktivno zajezi rast in napredovanje glive po ksilemu s pomočjo tvorbe til, ko rastlina uviha osrednjo lamelo med sosednjimi celicami parenhima (Agrios, 1997). Poznana in opisana je vrsta glivnih toksinov, ki povzročajo venenje rastlin (Wang in sod., 2004; Palmer in sod., 2005). Rastline se pred zmanjšano transpiracijo branijo na dva načina. Sorte hmelja, odporne na okužbo z glivo *V. albo-atrum* imajo lahko podaljšano ali obnovljeno aktivnost sekundarnega kambija. Slednje pripelje do dodatnega formiranja celičnih ksilema, kar imenujemo hiperplazija (Talboys, 1958a). Pri drugi strategiji obrambe proti glivi, poskuša rastlina na različne načine zamenjati okužen, nefunkcionalen ksilem. Takšen način je bil opisan pri nageljnih (*Dianthus caryophyllus*). Gre za proces celične dediferenciacije, ki ji sledi celična diferenciacija v celice s specifičnimi nalogami, ki so drugačne prvotnim nalogam. Proses se imenuje transdiferenciacija. Kljub temu pa moramo molekularni mehanizem pri rastlinah še natančneje razumeti (Sugimoto in sod., 2011).



Slika 3: Konidiofor glive *V. albo-atrum* (400-kratna povečava, Foto: T. Svetek, 2010)

2.2.2 Verticilijska uvelost pri hmelju

Reinke in Berthold sta jo leta 1870 prvič opazila in opisala pri krompirju v Nemčiji (Reinke in Berthold, 1879). Povzročitejica gliva *V. albo-atrum* napada več kot 300 različnih rastlin ter se več let ohranja v prsti v obliki trajnega micelija. V primeru infekcije okrasnih rastlin in dreves, kot so javor, vrbe, brest, jesen, bukev, hrast ter druge se prvi simptomi pojavijo sredi sezone kot uvelost na različnih delih debla ali vej. Obolenje pri hmeljnih rastlinah so v začetku pripisovali angleškim hmeljarskim področjem. Prvi pojav blage oblike bolezni je bil opisan l. 1924 pri kraju Tonbridge (Harris, 1927, cit. po Radišek in sod., 2006), v pokrajini Kent pa je bila leta 1942 že zaznana bolj resna, t.i. napredujoča oz. letalna oblika bolezni (Keyworth 1942, cit. po Talboys, 1958b). V Sloveniji smo prvič zasledili izbruh letalne oblike te bolezni leta 1997 (Dolinar in Simončič, 1999; Radišek in sod., 2004). Do leta 2005 je bilo za to boleznijo obolelih že 180 ha hmeljišč (Radišek in sod., 2006). Patotipe glive *V. albo-atrum* razvrščamo v skupine virulence M (mila ali blaga) in PV1 (izolat, ki povzroča letalno uvelost na občutljivem kultivarju), PV2 (izolat, ki povzroča letalno uvelost na zmerno občutljivem kultivarju) in PV3 (izolat, ki povzroča letalno uvelost na tolerantnem kultivarju) (Brady in Pegg, 2000). V Sloveniji prepoznamo genotip PG1 (blagi genotip) ter PG2 (nov letalni genotip PV1) (Radišek in sod., 2006). Na podlagi diferencialnih AFLP fragmentov (Radišek in sod., 2003) je bil razvit MO (molekularni označevalec) tipa SCAR (S sekvenco okarakterizirana pomnožena regija), ki omogoča nedvoumno ločevanje obeh virulentnih skupin (Radišek in sod., 2004).

Gliva se značilno pomika navzgor po rastlini po vaskularnem sistemu, oziroma po ksilemu. V drevesih je bolezen poznana kot "Black heart" ("črno srce") in je pogosta v sadnih vrstah, ornamentalnih rastlinah, zelenjadi, kot tudi v zelnatih rastlinah (Maurer in sod., 2014). Zaradi dvofaznega življenjskega cikla je *Verticillium* hemibiotrofni mikroorganizem z biotrofnim življenjskim obdobjem, kadar je v s hranili revnem okolju ter z nekrotrofno fazo v aeriranih rastlinskih tkivih (Reusche in sod., 2012). Do blage oblike bolezni pride ob okužbi odpornih kultivarjev s PG2 (nov genotip PV1) ali občutljivih kultivarjev hmelja s PG1 (Radišek in sod., 2006). Simptomi bolezni so odpadanje listov, debeljenje korenine nad nivojem prsti ter kloroza. Rastlina si navadno opomore od bolezni. Ko se pojavi napredujoča oblika bolezni, ali pri interakciji letalnih (PG2) sevov *V. albo-atrum* in občutljivih hmeljnih rastlin, rastlini hitro odmrejo vsi poganjki. Do debelitve trte ne pride, navadno pa do začetka naslednje sezone odmre še korenika (Dolinar in Simončič, 1999). Razvoj interakcij gostitelj-patogen pri okužbi tipičnega gostitelja s fitopatogenimi glivami *Verticillium* spp., je prikazan na slikah 4, 5 in 6.



Slika 4: Blaga oblika verticilijske uvelosti: odebeljena okužena rastlina in ovijajoča neokužena (Down in sod., 2007)



Slika 5: Letalna oblika verticilijske uvelosti: ekstenzivno in hitro razbarvanje ter venenje listov in stranskih poganjkov (Down in sod., 2007)



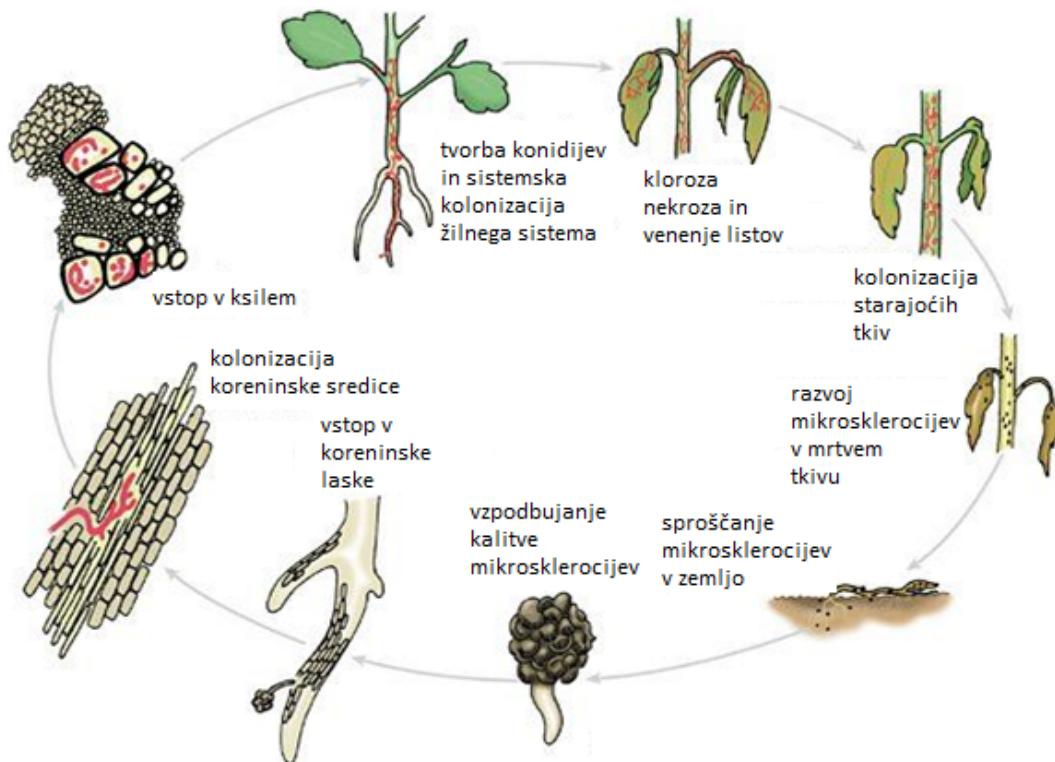
Slika 6: Vzdolžni presek hmeljnega stebla, okuženega z *V. albo-atrum* (levo): rjavo razbarvanje celotnega žilnega sistema je značilno za letalni patotip glive; vzdolžni prerez zdrave rastline hmelja (desno) (Down in sod., 2007)

2.2.3 Cikel bolezni

Osnovni življenski cikel glive *V. albo-atrum* (Slika 7) je podoben kot pri ostalih vrstah gliv iz rodu *Verticillium*. Najbolj se razlikujejo v trajnih strukturah, ki jim omogočajo preživetje v različnih okoliščinah. Tako na primer *V. albo-atrum* tvori trajni micelij, *V. dahliae* tvori mikrosklerocije, *V. nubilum* pa tvori klamidospore, nekatere vrste pa lahko tvorijo vse tri. Na viabilnost in preživetveno sposobnost glive in njenih struktur v tleh vplivajo kemijske lastnosti tal, temperatura, hidracija, mikro-favna, rastlinstvo in poljščine, ki niso gostiteljske rastline (Luck, 1954). Gliva *V. dahliae* se nahaja v prsti v obliki z debelo celično steno, melaniziranim mikrosklerocijem, ki odgovori na prisotnost eksudatov rastlinskih koreninah s kalitvijo (Mol in van Riessen, 1995). Micelij *V. albo-atrum* lahko ostane viabilen vsaj 4 leta, medtem ko lahko miklosklerocij *V. dahliae* preživi v zemljji negostiteljskih rastlin vsaj 10 let (Wilhelm, 1955). Kljub temu, da se s časom viabilnost zmanjšuje, pa je iz vidika kontrole, pomembna dolga doba preživetja glive (Agrios, 1997). Ko se korenine gostiteljske rastline približajo trajnim organom glive (na okoli 2 mm), eksudati rastline začnejo promovirati kalitev glive iz počivajoče strukture proti rastlini. Gliva po pritrdirtvji na koreninske laske napreduje proti osrednji korenini ter raste na površini povrhnjice korenine. Nato vstopi v rastlino ter poskuša doseči žilni sistem, kjer najmočnejšo bariero predstavlja endoderm (Sewell, 1959). Na mestih stikov epidermalnih celic glivne hife direktno prodirajo med celice brez razvoja posebnih infekcijskih struktur

(proizvodnja pektinolitičnih encimov - poligalakturonaza, pektat-liaza in pektinesteraza). Pri tem se pojavljajo nekroze rastlinskega tkiva. Najlažji način vstopa so mesta naravnih poškodb rastlinskega tkiva. Mesto vstopa glive *Verticillium* je mogoče tudi direktno, preko zdravega tkiva, vendar pa je verjetnost, da bo gliva dosegla vaskularni sistem precej manjša, ko je mesto vstopa skozi koreninske laske (Garber, 1973).

Ko patogen vstopi v rastlinsko tkivo, poskuša najti pot do vaskularnega sistema, natančneje do ksilema. Rast nadaljuje inter- in intracelularno skozi sredico (korteks) korenine proti cilindru. V centralnem cilindru *V. albo-atrum* vstopi v celice ksilema, se množi v žilnem sistemu korenine ter v kasnejših fazah naseli ksilem hipokotila, stebla in listov. Gliva se lahko razširi po sistemu s pomočjo hif in spor. *Verticillium* proizvaja konidije na konidioforih, ki se transportirajo navzgor po rastlini s transpiracijskim tokom. Ko gliva prodre do ksilema, se konidiji sprostijo iz konidioforov v ksilem ter s pomočjo ksilemskega toka hitro naselijo rastlino. Transport konidijev po rastlini se ustavi ob žilnih elementih, pregradah, celičnih stenah ter koncih žil, kjer se tvorijo tiloze in ligninski gomoljčki. Preko končnih barier konidiji kalijo in tvorijo kalitveno cev ter zrastejo v sosednjo celico. Konidiji lahko prepotujejo pot do vrha rastline tudi v 24 urah po začetni inokulaciji konidijev v rastlino (Presley in sod., 1966). V primeru močne okužbe rastlina podleže bolezni in propade. Ko rastlina propade *Verticillium* tvori trajne organe, ki se sprostijo v tla in omogočajo po obdobju doramance ponoven začetek infekcijskega cikla.



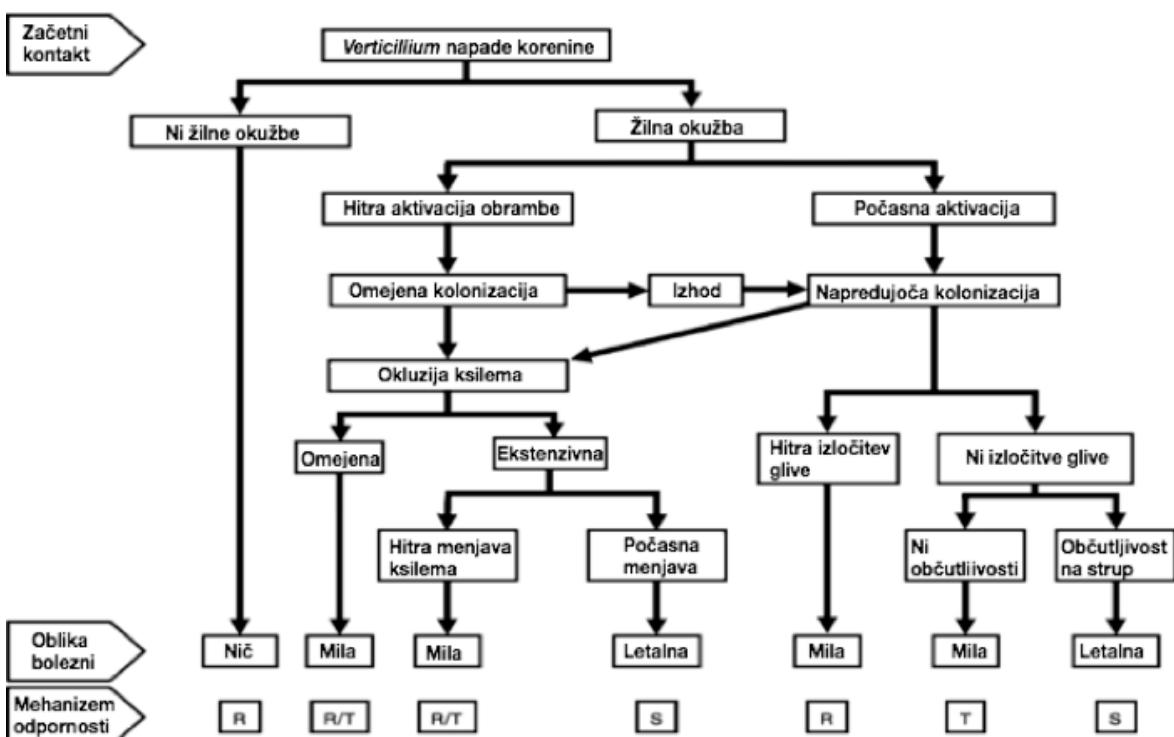
Slika 7: Bolezenski cikel bolezni verticilijske uvelosti (Berlangen in Powelson, 2005)

Poleg zmožnosti dolgega ohranjanja v prsti, se lahko *V. albo-atrum* razširja na več načinov, večinoma preko odprte površine korenine. Na kmetijskih površinah pride do razširjanja z obdelavo tal, okuženimi sadikami in odpadki. V naravi je obseg širjenja počasen in se dodaja lokalno z ostanki okuženih rastlin. Možen je prenos konidijev po zraku, vendar pa je takšen prenos težaven za glivo, saj lahko ima težave pri razvoju nad tlemi ter na zdravih rastlinah. *V. albo-atrum* lahko potuje tudi s tekočo vodo. Kadar semena vrtnin niso tretirana s fungicidom, se lahko naseli na površini semena, kjer lahko preživi tudi 13 mesecev. Tako so lahko okužena semena vir inokuluma na neokuženem polju. Kot zadnja možnost transporta se kažejo žuželke, ki lahko prenesjo konidije glive *V. nonalfafae*, na gostiteljski rastlini pa ustvarijo poškodbo rastlinskega tkiva oziroma odprtino ter tako omogočijo in pripomorejo k lažjemu vstopu glive v rastlinsko tkivo (Easton in sod., 1969).

2.3 OBRAMBNI MEHANIZMI RASTLINE

Rastline so proti patogenim organizmom razvile več nivojev obrambe. Rastlinsko obrambo predstavljajo kutikularni voski, antimikrobní encimi ter ostali sekundarni metaboliti, kot tudi rastlinska celična stena (Thordal-Christensen, 2003). Mikroorganizmi so se prilagodili, da lahko zaobidejo te bariere ter uspešno povzročijo bolezen, na katero se rastlina specifično odzove (Slika 8). Rastlina s tem postane gostitelj patogena, odporne rastline pa so ne-gostiteljske. Posamezne rastline znotraj občutljivega kultivarja lahko postanejo odporne, v primeru, ko razvijejo specifične obrambne gene. Genetska povezava med gostiteljsko rastlino in patogenom je bila prvič podrobno opisana s strani Harolda Flora v 40. in 50. letih 20. stoletja. Flor je skrbno preučil genetski odnos med sevi glive lanene rje in različnimi sortami lana, z ozirom na dovzetnost ali odpornost gostiteljske rastline (Flor, 1971). Na podlagi svojega dela je Flor postavil hipotezo, da je odpornost posledica pravilne kombinacije posameznega genetskega lokusa gostitelja in patogena. Predpostavil je, da ima rastlina odpornostne gene (R gene), ki delujejo vzajemno s patogenimi avirulentnimi geni (Avr geni) v odnosu "gen na gen". Takšni geni patogena se imenujejo avirulentni, saj zaradi odpornosti oziroma R gena v rastlini ne povzročijo bolezni, rastlina pa je odporna. Avr geni pripomorejo k virulenci v neodpornih rastlinah (Jones in Dangl, 2006). Čeprav rastline nimajo prilagodljivega imunskega sistema kot vretenčarji, pa so rastlinske celice opremljene s številnimi extra- in intracelularnimi imunskimi receptorji, ki zaznavajo prisotnost patogenih mikroorganizmov in aktivirajo obrambne odgovore. Rastlinski receptorji zaznavajo močno ohranjene ter počasi razvijajoče se dele skupin mikrobov, kot je na primer flagelin, osrednji protein v bičku bakterij (Gómez-Gómez in Boller, 2002). Aktivacija teh receptorjev inducira izražanje obrambnih genov ter proizvodnjo reaktivnih ogljikovih zvrsti (ROS) v rastlinski celici, kar

omeji rast mikroorganizma. Uspešni patogeni se prilagodijo, da se izognejo rastlinskim obrambnim mehanizmom ali pa utišajo obrambno signalizacijo s pomočjo efektorjev, ki so med infekcijo vnešeni v gostiteljsko celico. Skozi koevolucijo so rastline razvile intracelularne R proteine, katerih naloga je zaznavanje patogenih efektorskih molekul ter aktivacija signalnih kaskad, ki vodijo do močnega reprogramiranja, ki omeji rast patogena (Jones in Dangl, 2006). S konstantnim razvojem tako efektorjev kot patogenov, se cikel razvoja patogena in gostiteljske rastline ne zaključi.



Slika 8: Shematični prikaz gostiteljeve obrambne signalizacije ob napadu glive *V. albo-atrum*. Specifične kaskade vodijo do različnih izidov v interakciji rastlina patogen, ki segajo od bolezenskega fenotipa rastline brez simptomov (R - resistant) do milih bolezenskih simptomov (T - tolerant) in letalne oblike (S - susceptible). Toleranca (T) rastline prikazuje fenotip delne odpornosti rastline na patogena (Fradin in Thomma, 2006).

Talboys (1958b) je na morfološkem nivoju študiral interakcije različno virulentnih hmeljnih izolatov glive *V. albo-atrum* in različno odpornih sort hmelja. Hmeljev odziv je razdelil na dve fazi. Tako za občutljive kot za tolerantne rastline naj bi šlo za nespecifične obrambne reakcije, le da so v slednjih hitrejše in močnejše (Talboys, 1972). Eden izmed najbolj odpornih hmeljnih kultivarjev na hmeljevo uvelost je angleški kultivar 'Wye Target', kultivar 'Wye Challenger' pa je le zmerno odporen (Darby, 2001; Radišek in sod., 2006). 'Wye Target' so pridobili s križanjem ameriške ženske rastline hmelja AA 7, ki je

odportna na hmeljevo uvelost, s kultivarji hmelja, ki so neodpornimi. Tak križanec vsebuje, v primerjavi z evropsko, večinski delež ameriške dednine (Howard in sod., 2011). Darby (2001) je predvideval, da visoko mero odpornosti omenjenega kultivarja, tudi na letalne patotipe hmeljevih izolatov *V. albo-atrum*, lahko pojasni z modelom dveh komplementarnih dominantnih lokusov; prvi lokus naj bi izhajal iz ameriškega, drugi pa iz evropskega prednika (Darby, 2001). Večina rastlin, ki jih gliva okužuje, ima odpornostne vire (Majer in sod., 2014). Pri nekaterih rastlinskih vrstah so bili kartirani QTL (lokus(i) kvantitativne lastnosti) za odpornost na verticilij. Veronese in sod. (2003) so v asociacijski študiji različnih ekotipov na toleranco na *V. dahiae* pri repnjakovcu, določili dominanten lokus *VE1*, ki je povezan s časom cvetenja rastline in je odgovoren za povisano toleranco. F1 potomci križanja hmelja 'Wye Target' x BL2/1 so bili rangirani glede ravni odpornosti na *V. albo-atrum* PG2 (Jakše in sod., 2013), rezultati pa so omogočili določitev potencialnega QTL molekularnega označevalca.

2.3.1 Gen *Ve1* podaja odpornost na verticilij pri paradižniku

Monogenski obrambni mehanizem pri paradižniku se pojavi s prisotnostjo *Ve1* gena. S pomočjo RAPD genetske karte, je bil omenjeni lokus izoliran iz genomske knjižnice paradižnika. Produkt *Ve1* gena, ki posedeje odpornost na *V. dahiae* po primarni beljakovinski strukturi spada med R proteine tipa RLP (receptorju podobni proteini) (Kawchuk in sod., 2001). Vendar pa so se že pojavili sevi verticilija, ki so patogeni za takšno sorto paradižnika (O'Neill, 2002).

2.3.2 Z mikrobi povezani molekularni vzorci in receptorji za prepoznavo MAMP

Rastline prepoznaajo močno ohranjene dele mikroorganizmov, poznane kot z mikrobi povezani molekularni vzorci (MAMPs), ki so ključni za normalno preživetje mikrobov in zaradi tega niso podvrženi mutacijam. To jih naredi idalne tarče za prepoznavo s strani rastlinskih obrambnih receptorjev. Rastline na primer zaznavajo prisotnost po Gramu negativnih bakterij preko zaznavanja prisotnosti lipopolisaharidov (LPS), ki jih najdemo v njihovi zunanji membrani (Dow in sod., 2000). Rastline se odzovejo tudi na ostale elemente mikroorganizmov, kot so flagelin, elongacijski faktorji, 'cold shock' protein, sladkorje ter komponente glivne celične stene (hitin in peptidoglikan). Tako so rastline razvile način za ločevanje med lastnimi deli in deli ostalih organizmov, kot opozorilni sistem pred potencialno okužbo (Nürnberg in sod., 2004). Pomembno vlogo pri prevajanju signala preko membrane po zaznavi MAMP imajo tudi transmembranskim kinazam podobni receptorji (RLKs). Na ekstracelularnem delu imajo RLK, udeleženi v prepoznavo, MAMP domeno, z leucinom bogate ponovitve (LRR domena) ter citosolno

serin/treonin kinazno domeno (Zipfel, 2008). Rastline se na prisotnost MAMP odzovejo hitro, s spremembami v izražanju genov, spremembami v celični steni, kopičenju antimikrobnih proteinov in ostalih molekul, spremeni se apoplastni pH, ki zavira rast mikrobine populacije do neke mere, kljub temu pa večinoma takšen način obrambe ni zadosten (Gómez-Gómez in Boller, 2000).

Zaznava MAMP je natančno posredovana s strani z mitogenom-aktivirano protein kinazo (MAPK) signalne kaskade. MAPK je uporabljen kot pretvornik signala v vseh eukariontih in je element imunskega odziva rastline (Nürnberger et al. 2004). Kaskade so aktivirane s fosforilacijo. MAPK kaskada, lahko na odpornost pozitivna ali pa negativna, je aktivirana po zanavi patogena s strani receptorjev za prepoznavo patogena (PRR-Pathogene Recognition Receptor). Tako lahko aktivacija oziroma fosforilacija različnih MPK proteinov spodbuja odpornost rastline, ali pa jo inhibira. Dokaz za takšno delovanje so mutanti z izbitim genom (angl. knock-out mutante) za določene *MPK* gene. Kljub vsemu, pa biokemijske poti zaznave signala ter delovanja pozitivne in negativne regulacije, še niso povsem raziskane, predvideva pa se, da je signal uravnan glede na naravo signala, ki pride iz okolice (Suarez-Rodriguez in sod., 2006). Po aktivaciji *MPK* se inducira prepisovanje z obrambo povezanih genov preko WRKY transkripcijskih faktorjev (TF) (Ülker in Somssich, 2004; Petitot in sod., 2013).

2.3.3 S strani patogenov pridobljena odpornost

Izražanje mehanizmov za utišanje genov, kot so majhne molekule RNA, je način, kako preprečiti bolezen rastline. Tehnologija je bila uporabljena pri utišanju izražanja genov specifičnih patogenih organizmov, kot so *Fusarium verticillioides*, *Blumeria graminis* in *Puccinia striiformis* f.sp. tritici. Koncept s patogenonom pogojene odpornosti (PDR) sta razvila pred 30 leti Sanford in Johnston (1985), z namenom kontrole rastlinskih bolezni. Pri PDR gostitelj ovira izražanje genov, ki so povezani z rastjo in razmnoževanjem patogena v rastlini, kar rezultira v povečani odpornosti na bolezen. Utišanje tarčnih RNA molekul velja za ključno komponento mnogih odgovorov rastline v odnosu med rastlino ter virusi, insekti, bakterijami, nematodami in glivami (Huang in sod., 2006). Gre za utišanje genov s strani gostitelja, kar omogoča kontroliranje škodljivih organizmov. Pojav pri rastlinah imenujemo ko-supresija (Lee in sod., 1993).

Post translacijsko utišanje genov (PTGS) je v splošnem za zaporedje specifičen regulatorni mehanizem utišanja genov, ki ga povzročijo dolge dvooverižne molekule RNA (dsRNA) ali pa lasnice RNA. Te molekule se preoblikujejo v 21-35 nukleotidov dolga zaporedja RNA, vključena v usmerjen proces utišanja RNA, preko od RNA induciranega kompleksa za utišanje (RISC) in komplementarnega parjenja mRNA z malimi RNA, čemur sledi

razgradnja ali preprečitev translacije. (Esquela-Kerscher in Slack, 2006). Obstajajo različni razredi majhnih RNA molekul. To so male interferenčne RNA (siRNA), mikro RNA (miRNA), s tRNA pridobljeni RNA fragmenti (tRF) in s piwi proteini povezane RNA (piRNA). Za najbolj obetavni obrambni sistem pri rastlinah veljata siRNA in miRNA. Kljub temu, da se njune poti procesiranja razlikujejo, pa se nastanek obeh začne v jedru, kjer se dicer in ribonukleaza III (RNase III) vežeta na lasnice in dvovertižne RNA ter jih procesirata do siRNA ali miRNA. Slednji sta nato preneseni iz jedra s pomočjo proteinov v jedrnih porah (Katahira in Yoneda, 2011).

Primerov aplikacij utišanja RNA v interakcijah gliva-rastlina je vse več. Pomembno je poznavanje mehanizmov, ki so udeleženi pri vnosu efektorskih molekul iz patogena v rastlino. Tako je lahko prenos posredovan na različne načine, tudi preko plazmodezem in floema (Melnyk in sod., 2011).

2.3.4 Reaktivne kisikove zvrsti (ROS)

Rastlinske vrste reagirajo relativno hitro na okužbo s patogeno glivo na način, da začnejo proizvajati reaktivne kisikove zvrsti (ROS), kot so vodikov peroksid (H_2O_2) in superoksid (O_2^-). Ta pojav imenujemo oksidacijski razcvet. Te molekule so lahko dalje pretvorjene v še bolj reaktivne, kot sta na primer prosta kisikova radikala HO_2^- ter OH^- . ROS igrajo pomembno vlogo v hipersenzitivnem odgovoru in so tako povezani s točno določenimi simptomati. Oksidativni razcvet se običajno pojavi v kultivarjih z določenimi poglavitnimi R geni, vendar je lahko povezan s prepoznavo PAMP (za patogene značilni molekularni vzorci). Po napadu patogena se začnejo akumulirati določeni proteini, ki imajo nalogo zaščititi rastlino pred ROS. ROS lahko delujejo tudi kot signalne molekule za indukcijo nadaljnjih, tudi bolj specifičnih obrambnih mehanizmov (Lamb in Dixon, 1997; Torres in sod., 2006).

2.3.5 Obrambni proteini

Znanje o obrambnih proteinih pri modelnih rastlinah (kot so na primer repnjakovec, riž, pšenica in tobak) v primeru okužbe s patogeni, je lahko uporabljeno kot osnova za raziskovanje obrambnih mehanizmov pri hmelju (Kim in Kang, 2008).

Tekom indukcije obrambnega mehanizma so nekateri geni oziroma proteini regulirani navzgor ali navzdol. Ta inducirani odgovor je sprožen s strani prepozname specifičnih patogenov ali kot del splošnega obrambnega odgovora. Nekateri geni in proteini se izražajo konstitutivno ter so tako stalno prisotni. Za posamezne kultivarje je značilna

konstantna visoka izraženost določenih genov in proteinov, medtem ko so lahko pri ostalih kultivarji visoko izraženi le v prisotnosti patogena ob okužbi (Gau in sod., 2004). Sprožitev in vzdrževanje obrambnih mehanizmov zahteva relativno veliko energije rastline, zato je vzdrževanje obrambne funkcije v odsotnosti patogena za rastlino slabost (Monaghan in sod., 2009).

2.3.5.1 S patogenezo povezani proteini (PR)

S patogenezo povezani poroteini, oziroma PR proteini se kopijo v rastlini kot rezultat biotskega ali abiotskega stresa. Imajo pomembno vlogo pri obrambi pred patogenimi organizmi ter pri prilagajanju na stresne razmere (Edreva, 2005; van Loon in sod., 2006). Nekateri PR proteini so bili preizkušeni v študiji izražanja genov pri hmelju, okuženim z *V. albo-atrum* (Cregeen in sod., 2014).

2.3.5.2 R proteini

Čeprav efektorji v večini primerov delujejo kot virulentni faktorji v dovezetnih rastlinah, lahko nekateri efektorji delujejo kot avirulentni faktorji, če so prepoznani s strani rastline, oziroma njenih R proteinov. Aktivacija R proteinov sproži imunski odziv rastline, ki je precej močnejši, kot tisti, sprožen s pomočjo PRR. Aktivacija R proteinov vodi do znatnega ionskega toka, indukcije s patogenezo povezanih genov (*PR* geni), akumulacije signalne molekule salicilne kisline (SA) ter oksidacijskega razcveta, ki vodi do akumulacije reaktivnih kisikovih zvrsti. Takšne fiziološke spremembe ustvarijo neprijetno okolje za rast patogenega organizma, poleg tega pa so pogosto povezane tudi s pojavom programirane celične smrti. Takšen odziv je poznan kot hipersenzitivni odziv (HR), pri katerem ogrožene celice načrtno propadejo, da omejijo rast patogena. HR je učinkovit proti patogenom, ki za uspešno rast potrebujejo živo tkivo gostitelja, saj v mrtvem tkivu ne dobijo vseh potrebnih hraničnih snovi za svojo rast. Pri rastlinah poznamo več razredov R proteinov. Najbolj pomemben je razred NB-LRR, ki vsebuje centralno nukleotidno vezavno domeno (nucleotide-binding domain, NB) ter na C-C terminalnem delu močno variabilne z levcinom bogate ponovitve (leucine rich repeat, LRR). Ta skupina se razdeli na dva dela, glede na strukturne razlike na N-terminalnem koncu. CC-NB-LRR, vsebuje domeno z ovito vijačnico (CC), medtem ko TIR-NB-LRR, vsebuje regijo podobno TIR (Toll in interleukinu 1 regijsko podoben receptor). Slednji se običajno nahajajo v sesalčjih imunskih receptorjih (Takeda in sod., 2003). Proteini z LRR so poleg obrambe udeleženi v mnogih celičnih funkcijah. LRR imajo vlogo proteinov posrednikov pri eukariontih, posebej pri R proteinih pa se predvideva, da specifično prepoznavajo Avr faktorje. NB domena se nahaja pri mnogih proteinih, tudi pri ATPazah, G-proteinih in apoplastnih

regulatorjih (Monaghan in sod., 2009). Predvideva se, da ta domena regulira aktivnost R proteina preko vezave in hidrolize ATP (Tamelung in sod., 2006). CC in TIR domena delujeta kot signalni domeni, predvsem kot CC- in TIR-NB-LRR poznejših signalnih poti. Možno je, da domeni delujeta specifično pri prepoznavi določenih tarč. Poleg naštetih razredov R proteinov, je še nekaj drugih poznanih razredov obrambnih R proteinov. To so Cf proteini, Xa proteini, Pto proteini ter nekateri bolj nenavadni, kot je RRS1 (Monaghan in sod., 2009).

2.3.6 Prepoznavanje efektorjev patogena

V preteklosti je bilo odkritih kar nekaj sorodnih R-Avr parov, vendar pa razmerje med temi pari še ni dobro okarakterizirano in razumljeno na molekularnem nivoju. Preprost model predvideva, da so R proteini receptorji za Avr ligande. Na primer R protein Pto direktrno interreagira z sorodnim efektorjem AvrPto. Takšna interakcija je pomembna oziroma nujna za vzpostavitev odpornosti (Tang in sod., 1996). Kljub temu, da je poznanih nekaj podobnih primerov, pa v večini primerov vezave niso tako specifične. To nakazuje na dejstvo, da so v prepoznavanju efektorjev vpletene še nekateri ostali proteini. Tako se protein R ne veže direktno na efektor, temveč da zaščiti, oziroma nadzoruje tarče efektorjev (Dangl in Jones, 2001). Pri tem modelu R proteini iščejo modificirane gostiteljeve efektorske proteine, ki so inducirani s strani patogena ter sprožijo imunski signal. Že detekcija enega izmed mnogih molekul v rastlini izzove izražanje R proteina ter razvoj imunskega odgovora, kar spremeni patogena v avirulentnega (Belkhadir in sod., 2004).

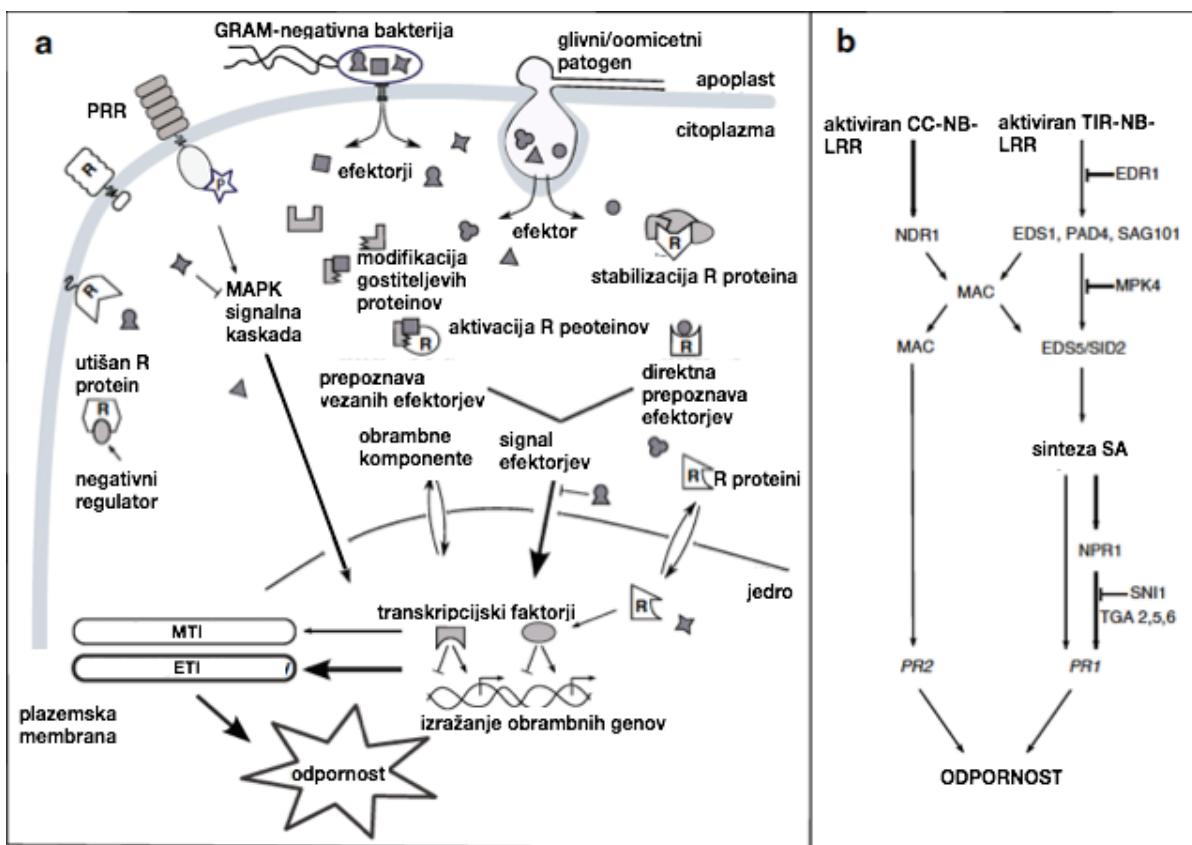
2.3.7 Aktivacija R proteinov

Pri R proteinih v rastlinah je signifikantna razlika v fizioloških in metabolnih posledicah v povezavi z deregulacijo. Tako na primer točkovna mutacija v TIR-NB-LRR tipu R gena lahko povzroči konstitutivno izražanje, kar posledično privede do stalne aktivnosti proteina in imunske signalizacije, kljub temu, da ne pride do okužbe s patogenim organizmom (Zhang in sod., 2003). Takšna mutacija privede do odpornosti rastline na patogena, vendar pa je fitnes rastline precej nižji, kajti poveča se koncentracija SA, rastline pa so posledično pritlikave (Li in sod., 2001). Ostale mutacije, povezane z deregulacijo odpornosti na bolezni, se odrazijo v pojavljanju spontanih HR-podobnih lezijah. Primer takšne mutacije je pridobitev funkcionalne mutacije v TIR-NB-LRRR proteinu. V izogib takšnim energetsko potratnih pojavom imajo rastline močno regulirane obrambne biosinteze poti, R proteini so v celici v represirani obliki, kadar patogeni niso prisotni. Represija je inducirana s pomočjo inhibitornega zvijanja ali pa z negativnimi regulatorji (Marathe in Dinesh-Kumar, 2003). Zvitje proteina usmerjajo šaperoni, ki so odgovorni tudi za premike

R proteinov v celici (Seo in sod., 2008). Tako se lahko NB-LRRR proteini transportirajo tudi v jedro celice, (Dangl in Jones, 2001). Ker učinkujejo nekateri efektorji patogenov v jedru gostiteljske celice, pa je verjetno, da se tam nahajajo tudi R proteini. To nakazuje na uporabo istih obrambnih programov, tako patogena, kot gostitelja, hkrati pa predstavlja takšna lokalizacija R proteinov alternativno in bolj direktno pot modulacije obrambnega odgovora rastline, kadar jo ogrožajo avirulentni patogeni (Shen in sod., 2007).

2.3.8 Signalizacija R proteinov

R proteini pošiljajo signal preko različnih poti, ki se v kasnejši fazи, ko se preko različnih signalnih molekul pretvori in aktivira običajne obrambne odgovore. Posledica takšnega delovanja je kopiranje SA ter prenos signalov, ki jih proizvajajo ROS (Wiermer in sod., 2005). Prisotnih je tudi mnogo negativnih regulatorjev, kar nakazuje na aktivno in strogo kontrolirano okolje (Glazebrook, 2001). Kot odporni molekuli proti herbivorom in nekrotrofnim patogenom pri rastlinah, delujeta tudi jasmonska kislina (JA) in etilen (ET), medtem ko je SA povezana z odpornostjo na biotrofne organizme. JA in SA sta v signalizaciji antagonistični molekule, saj si njuna signalna omrežja nasprotujeta. Okužba z biotrofnimi patogeni vodi do lokalnega kopiranja SA, kar sproži signalizacijo na daljše razdalje. V odgovor na to signalizacijo ostale celice začnejo kopirati SA ter izražati obrambne gene, kar jih efektivno brani pred potencialnimi napadi patogenov. Takšen pojav je poznan pod imenom sistemsko pridobljena odpornost (SAR; Durrant in Dong, 2004). SA je po infekciji sintetizirana iz korizmata s pomočjo encima izokorizmat sintaze (Nawrath in Métraux, 1999). Mutanti, ki niso zmožni sinteze ali akumulacije SA, postanejo bolj dovetni za okužbo s patogeni (Nawrath in Métraux, 1999), SA je povezan s povečanjem koncentracije reaktivnih kisikovih zvrsti, kar ima za posledico spremembe v celičnem redoks potencialu. Spremembe v redoks potencialu zaznavajo v celici receptorji (NPR1) (Slika 9), ki aktivirajo PR gene za sintezo hitinaz, glukanaz, proteinaz ter RNAz (Mou in sod., 2003). Prav vsi že imajo dokazano antimikrobnou aktivnost *in vitro*. Knock-out mutacije so pokazale, da je od SA neodvisna pot obvezna za normalno funkcioniranje bazične in z R proteinimi posredovane obrambe (Monaghan in sod., 2009).



Slika 9: Signalni dogodki, ki so vpleteni v imunost rastline. a) Pri odpornih rastlinah citoplazmatski odpornostni (R) proteini in z membrano povezani odpornostni (R) proteini direktno ali indirektno sprožijo imunski odziv (zaradi efektorjev sprožen imunski odziv), s pomočjo nadziranja določenih rastlinskih proteinov. Aktivirani R proteini posledično sprožijo genetsko reprogramiranje in izvedejo fiziološke spremembe v okuženi celici, kar se kaže v odpornosti. b) Prikaz nekaterih ključnih komponent, ki so aktivirane ob CC- in TIR-NB-LRR R proteinsko posredovani odpornosti (Monaghan in sod., 2009).

2.4 KVANTITATIVNI PCR V REALNEM ČASU (QPCR)

Pri določanju odpornosti rastline lahko s konvencionalnimi metodami določamo odpornost rastline na patogena posredno, vizualno ter s pomočjo opazovanja rasti. Da bi obšli konvencionalne metode, ki so nenatančne, počasne, težavne, ob tem pa ne omogočajo določanja izražanja tarčnih genov, moramo uporabiti metode, ki omogočajo direktno merjenje rasti tudi ob odsotnosti znakov bolezni. Za kvantitativno merjenje izražanja genov se uporablajo metode, ki so osnovane na prepoznavanju zaporedja nukleinskih kislin, kot so RNA-hibridizacija (Mahe in sod., 1992) in semi-kvantitativni PCR (Hu in sod., 1993; Lamar in sod., 1995). Vendar pa imajo omenjene metode precej slabosti, kot na primer dolgi časi analize in delovna zahtevnost (Qi in Yang, 2002; Brouwer in sod., 2003). Razvoj verižne reakcije s polimerazo (PCR) v realnem času je bil pomemben korak naprej, ko gre za natančnost kvantifikacije izražanja genov (Heid in sod., 1996). PCR v realnem

času se od običajne PCR metode razlikuje v samem spremeljanju količine pomnožka (amplikona) v vsakem ciklu pomnoževanja, na osnovi merjenja flourescence. Kvantifikacija se izvede na osnovi vrednosti praznega cikla (C_t), ki je izmerjena oziroma določena v zgodnji fazi procesa pomnoževanja (Mackay in sod., 2002). Verižna reakcija s polimerazo omogoča natančno kvantifikacijo, saj je zaradi visoke senzitivnosti občutljiva in primerna za sledenje izražanja tarčnih genov tudi pri majhnih količinah pomnožka.

Poznanih je več načinov sledenja količine tarčni produktov s pomočjo kemikalij za detekcijo pomnožkov v verižni reakciji v realnem času. V primeru specifične detekcije pomnožka (npr. TaqMan tehnologija) (Tyagi in Kramer, 1996; Whitcombe in sod., 1999) je prednost visoka specifičnost proizvedenega flourescenčnega signala, vendar pa je slabost zahteva po specifičnih sondah, ki so potrebne za detekcijo različnih pomnožkov. V nasprotju s temi imajo nespecifične metode (Morrison in sod., 1998), kot je npr. SYBR Green I tehnologija, prednost, da niso potrebne specifične sonde, saj se fluorofor veže nespecifično v dvojerižno DNA. Takšna tehnologija je lahko problematična, saj se fluorofori lahko povezujejo z dimeri začetnih oligonukleotidov, in ostalimi pomnoženimi nespecifičnimi produkti, kar lahko resno zmoti interpretacijo rezultatov. V primeru, da vključimo v analizo talilno krivuljo (T_m) v povezavi s pomnožkom na koncu namnoževanja, lahko ovrednotimo natančnost pomnoževanja PCR (Ririe in sod., 1997; Schena in sod., 2004).

Metoda RT-qPCR je bila v zadnjem času pogosto uporabljena za karakterizacijo odziva rastlin na patogene v interakciji *H. lupulus* L. - *V. albo-atrum*. Tako je bilo npr. ovrednoteno izražanje referenčnih genov pod različnimi vplivi, s čimer so Štajner in sod. (2013) ter Maloukh in sod. (2009), določili nabolj stabilne gene (endogene kontrole) pri hmelju, ki so lahko uporabljeni kot referenčni geni. Vrsta poskusov se je nanašala na kvantifikacijo glive *V. albo-atrum* pri okužbah lucerne (Larsen in sod., 2007), špinače (Duressa in sod., 2012), krompirja (Pasche in sod., 2013), hmelja (Maurer in sod., 2014) in v tleh (Bilodeau in sod., 2012). Metoda je bila uporabljena tudi za preverjanje uspešnosti transformacije in izražanja transformiranega gena v *H. lupulus* L. (Batista in sod., 2008) ter za analizo genov, ki so vključeni v regulacijo izražanja tarčnih genov (Gatica-Arias in sod., 2013). Prav tako je bila metoda uporabljena s strani Cregeen in sod. (2014), ko so ovrednotili izražanje obrambnih genov pri hmelju po okužbi z *V. albo-atrum*.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 RASTLINSKI MATERIAL

V poskusu smo uporabili rastlinski material hmelja (*H. lupulus* L.), ki smo ga pridobili na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije (IHPS). Rastline so bile dveh sort, in sicer na verticilijsko uvelost odporna sorte hmelja Wye Target ter na verticilijsko uvelost občutljiva sorte Celeia. Rastline so bili 1-letni ukoreninjeni, ki so rastli v sterilnem komercialnem substratu rastne komore v Žalcu. Rastlinski material je bil inokuliran z glivo *V. albo-atrum*, letalnim patotipom PV1 (genotip PG2), z namakanjem korenin v inokulu koncentracije $5 \cdot 10^6$ konidijev/mL. Takšna inokulacija zagotavlja najmanj 80 % uspešnost okužbe. Inokuliranih je bilo po 20 rastlin za vsako časovno točko sorte Wye Target ter 14 rastlin sorte Celeia, medtem ko je bilo 10 rastlin ob vsaki časovni točki neinokuliranih pri obeh sortah ter so v poskusu služile kot kontrolne rastline. Po 6., 12. in 18. dneh (časovne točke vzorčenja) je bil rastlinski material (skupaj 54 rastlin; glej preglednico 1) dostavljen z Inštituta za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije (IHPS) v Žalcu na Oddelek za agronomijo Biotehniške fakultete v Ljubljani. Ob časovni točki 18. dni sta dve z glivo inokulirani rastlini propadli, tako je bilo število inokuliranih rastlin 18. Rastlinski material smo na dan vzorčenja (6, 12 in 18 dni po inokulaciji) očistili (odstranitev zemlje), narezali na manjše dele in ločili posamezne rastlinske dele. Tako smo ločili korenine, stebla in liste. Rastlinski material smo shranili v aluminjasti foliji ter v trenutku zamrznili v tekočem dušiku (okoli -200 °C). Zamrznjeno rastlinsko tkivo smo shranili v zmrzovalniku pri temperaturi -80 °C. Ratlinski material, ki je bil shranjen v zmrzovalniku pri temperaturi -80 °C smo zmleli v terilnici ob stelnem hlajenju s tekočim dušikom ter zmleti material shranili v plastičnih posodicah v zmrzovalniku pri temperaturi -80 °C.

Preglednica 1: Število vzorčenih rastlin v posameznih časovnih točkah po inokulaciji z glivo

Sorta	Časovne točke		
	6	12	18
WT okuženo	20	20	20
CEL okuženo	14	14	14
WT neokuženo	10	10	10
CEL neokuženo	10	10	10
Skupaj	54	54	54

3.1.1 Izolacija DNA

Iz rastlinskega materiala, ki je bil shranjen v zmrzovalniku pri temperaturi -80 °C, smo izolirali DNA glive *V. albo-atrum* po modificirani metodi CTAB (Kump in sod., 1992). Ratlinski material smo prenesli iz plastičnih posodic v centrifugirke ter mu dodali 700 µL na 68 °C segretega CTAB ekstrakcijskega pufra [2 % (w/v) CTAB: 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA (pH 8.0), 100 mM TRIS-HCl (pH 8.0)]. Po dodatku ekstrakcijskega pufra CTAB, smo centrifugirke postavili na mešalo vortex za 10 sekund in intenzivno mešali. Premešane vzorce smo postavili v vročo kopel, segreto na 68 °C ter inkubirali 1,5 h. Po inkubaciji smo vzorcem dodali 700 µL topila kloroform:izoamil alkohol (24:1) ter intenzivno premešali vzorec na vortex mešalu za 5 sekund. Premešane vzorce smo centrifugirali na 14000 rpm v centrifugi Eppendorf 5810R (Rotor: 48 x 1.5/2.0mL (FA-45-48-11, Aerosol-tight)) za 10 min. Supernatant smo prenesli v novo centrifugirko (1.5 mL) ter sedimentu dodali 700 µL svežega topila kloroform: izoamil alkohol. Ponovno smo intenzivno premešali vzorec na vortex mešalu za 5 sekund. Premešane vzorce smo centrifugirali na 14000 rpm v centrifugi Ependorf 5810R za 10 min. Supernatant smo dodali že shranjenemu supernatantu ter zavrgli sediment. Shranjenemu supernatantu smo dodali na -20 °C ohlajen izopropanol v razmerju 1:10 ter NaAcetat v razmerju 1:100. Raztopino smo nato nežno premešali ter vzorce shranili na -20 °C za eno uro ali čez noč. Po precipitaciji smo vzorce centrifugirali na 14000 rpm v centrifugi Ependorf 5810R za 10 min. Odpipetirali smo raztopino izopropanola, na kratko centrifugirali ter odstranili še poslednje ostanke raztopine. Peletu smo dodali 70 % etanol, odlepili pelet ter centrifugirali na 14000 rpm v centrifugi Ependorf [specifikacije] za 10 min. Nato smo odstranili etanol (70 %) ter ponovno centrifugirali na kratko ter odpipetirali še zadnje ostanke etanola (70 %). Pelet smo nato posušili na sobni temperaturi 10 min ter ga raztopili v TE pufru (10 mM Tris-HCl, 1 mM dinatrijev EDTA, pH 8.0) ter takoj izmerili koncentracijo DNA v pufru. Po merjenju koncentracije smo vzorce DNA shranili na -80 °C.

Koncentracijo izolirane DNA smo izmerili s pomočjo naprave NanoDrop (NanoVue Plus Spectrophotometer). Napravo smo umerili s TE pufrom (10 mM Tris-HCl, 1 mM dinatrijev EDTA, pH 8.0). Iz založne raztopine smo odpipetirali 1 µL raztopine ter nanesli na merilno napravo.

3.1.2 Izolacija RNA

Celokupna izolacija RNA je bila izvedena s kitom za izolacijo RNA Spectrum Total Plant RNA Extraction Kit proizvajalca Sigma-aldrich. Izolacija je potekala po protokolu Sigma-Aldrich, z vključenim delom razgradnje prisotne DNA.

V posamezno biološko ponovitev smo združevali rastlinski material iz treh zmletih vzorcev (posameznih rastlin), kot je navedeno v preglednici 11, ter 150 mg vzorca prenesli v 2-ml mikrocentrifugirko, ki je bila predhodno ohlajena na ledu. V nadaljevanju smo uporabili raztopino za liziranje celic (ang. lysis solution), kateri smo pred uporabo dodali 2-merkaptoetanol (2-ME). Na 1 ml raztopine za liziranje celic smo dodali 10 µl 2-ME in dobro premešali. Nato smo na 500 µl mešanice dodali 150 mg zdrobljenega vzorca in vse skupaj vrtinčili 30 sekund. Vzorce smo nato inkubirali v vodni kopeli na 56 °C 5 minut. Vzorce smo centrifugirali pri maksimalni hitrosti 3 minute, da so se celični ostanki usedli na dno. Filtrirne kolone (ang. filtration column) smo vstavili v 2-ml zbirne tubice (ang. collection tube), ter odpipetirali supernatant po liziji v filtrirno kolono. Pri pipetiranju smo pazili, da nismo v kolono prenesli tudi delov celične usedline. Filtrirne kolone smo zaprli in jih centrifugirali 5 minut pri maksimalni hitrosti, da smo se znebili preostalih celičnih ostankov. Lizat, ki je šel preko kolon, smo shranili v zbirnih tubicah. Vzorce smo nato 15 min inkubirali z Amplification Grade DNase I (Deoxyribonuclease I) raztopino (1X) ter po inkubaciji dodali "stop raztopino". Nato smo vzorcu dodali 750 µl raztopine za vezavo (ang. binding solution) in vse skupaj takoj premešali s pomočjo pipete. Kolone za vezavo (ang. binding tube) smo vstavili v 2-ml zbirne tubice, ter 700 µl vzorca nanesli na kolono. Kolone smo zaprli in jih centrifugirali 1 minuto, da se je RNA vezala na silicijevo membrano. Tekočino, ki je prišla čez kolone v zbirne tubice, smo odlili, ter postopek ponovili s preostankom vzorca. Na kolone smo nato dodali 500 µl raztopine za izpiranje 1 (ang. wash solution 1) in jih centrifugirali pri maksimalni hitrosti 1 minuto. Tekočino, ki je prišla skozi kolone smo odstranili, kolone pa ponovno vrnili v zbirne tubice. Nato smo na kolone dodali 500 µl raztopine za izpiranje 2 (ang. wash solution 2), ki smo ji predhodno dodali 100 % etanol, kakor so zahtevala navodila za pripravo kita. Kolone smo zaprli in jih zopet centrifugirali pri maksimalni hitrosti 30 sekund. Tekočino, ki je prišla čez kolone smo odstranili in še enkrat ponovili spiranje z raztopino za izpiranje 2. Tekočino, ki je prišla skozi kolone smo zopet odstranili. Kolone smo ponovno centrifugirali 1 minuto, da smo jih popolnoma osušili. Nato smo osušene kolone prenesli v nove, čiste 2-ml zbirne tubice. Točno na sredino kolone smo odpipetirali 50 µl elucijske raztopine (ang. elution solution) zaprli kolone in počakali 1 minuto. Nato smo kolone centrifugirali pri maksimalni hitrosti 1 minuto, da se je RNA izprala iz membrane in prešla skozi kolono v zbirno tubico. Očiščeno RNA smo tako pridobili v 50 µl elucijske raztopine in jo shranili pri -80 °C do nadaljnje uporabe.

Koncentracijo izolirane RNA smo izmerili s pomočjo naprave NanoDrop (NanoVue Plus Spectrophotometer). Napravo smo umerili z TE pufrom. Iz založne raztopine smo odpipetirali 1 µL raztopine ter nanesli na merilno napravo ter dobili podatke o koncentraciji, razmerju A260/280 in A260/230 (preglednica 11).

3.1.3 Preverjanje integritete RNA z gelsko elektroforezo in RIN testom

Izolirano RNA smo nanesli na 1,2 % gel, iz založne koncentracije smo nanesli 200 µg RNA. Elektroforezo smo zagnali pri napetosti 140 V in 45 mA ter jo pustili teči 45 min (Priloga D). Prav tako smo integrirano RNA preverili s pomočjo naprave Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer instrument ter RNA analyses kit opremo. Analiza preverjanje integritete RNA je potekala po priloženem protokolu. Izmerjena integriteta izoliranih RNA vzorcev je navedena v preglednici 11.

3.2 ANALIZA USPEŠNOSTI INOKULACIJE Z GLIVO *Verticillium albo-atrum*

3.2.1 Pomnoževanje DNA fragmentov z oligonukleotidnimi začetniki, specifičnimi za *Verticillium albo-atrum*

Glivne DNA fragmente smo pomnoževali s pomočjo oligonukleotidnih začetnikov specifičnih za glivo *V. albo-atrum* (preglednica 2). S to metodo smo poskusili pomnožiti glivno DNA v okuženih vzorcih, medtem ko pri nekuženih rastlinah pomnoževanja nismo pričakovali, vendar smo preverili tudi slednje. Specifični oligonukleotidni začetniki so sledeči:

Preglednica 2: Začetni oligonukleotidni začetniki specifični za pomnoževanje glivne DNA (*V. albo-atrum*)

PRIMER-3		dolžina	tm	gc %	Pričakovana dolžina amplikona
Vaa-ITS_2-F	TCATAACCCTTGTAACCATA	22	51,6	36,36	432 bp
Vaa-ITS_2-R	CACGAGGCAGGGCTTGTAG	18	58,7	66,67	

Pomnoževanje je potekalo s PCR metodo v 0,2 mL reakcijske mešanice v PCR tubicah. V posamezni tubici je bilo 5 µl DNA neredčenega vzorca izolirane DNA ter 15 µl reakcijske mešanice. Sledilo je kratko mešanje in centrifugiranje ter prenos tubic v PCR napravo za ciklično termostatiranje (Applied Biosystems 270). Pomnoževanje je poteklalo pri temperaturi 94°C, 5 min; 13 ciklov, 93°C, 35 s; 53°C, 55 s; 72°C 45 s; 13 ciklov, 93°C, 35 s, 53°C, 55 s, 72°C, 59 s; 9 ciklov, 93°C 35 s, 53°C, 55s, 72°C 118s; zaključni cikel, 72°C 10 min.

3.2.2 Gelska elektroforeza in ločevanje pomnoženih fragmentov

Izolirano in pomnoženo DNA smo po pomnoževanju analizirali z metodo gelske elektroforeze na agaroznem gelu. Uporabili smo 1,2 % agarozne gele, ki smo jih pripravili

z uporabo 1 x TBE pufra (44,5 mM Tris HCl, 44,5 mM borove kisline in 1mM EDTA, pH 8,0). Gel smo za končno analizo obarvali z 0,5 µg/ml (iz založne koncentracije raztopine 10 mg/ml) koncentracijo etidijevega bromida.

Elektroforetsko ločevanje vzorcev je potekalo s pomočjo horizontalne elektroforetske naprave SubCell Model 192 (Bio-Rad, ZDA) pri konstantni napetosti 130 V proti anodi v 0,5 x TBE elektroforetskem pufru. V vzorce analizirane DNA smo pred nanašanjem v agarozni gel dodali nanašalno barvilo v razmerju 1:5 (12,5-odstoten (W/v) Ficoll tip 400, 0,2-odstoten (w/v) brom fenol modro). Za oceno dolžine fragmentov smo nanešenim vzorcem na gelu dodali še 100 ng DNA markerja (GeneRulerTM 1 kb DNA Ladder, Fermentas, Litva). Po končani elektroforezi smo gel prenesli na transluminator TFM-30 (UVP Inc., Anglija), opremljen z virom dolgovalovne UV svetlobe (312 nm) in dobljene rezultate fotografirali z digitalnim fotoaparatom (Nikon CoolPix, Japonska).

3.3 ANALIZA DIFERENCIALNE EKSPRESIJE GENOV

3.3.1 Izdelava oligonukleotidnih začetnikov specifičnih za tarčne gene

Kandidatne gene hmelja smo določili na osnovi nukleotidnih zaporedij diferencialno izraženih genov, ki smo jih pridobili z Gene Snare in cDNA analizo prikaza izražanja (Javornik-Cregeen, 2010) ter na osnovi literarnih podatkov (*GER3*, *PRX52*, *PRX34* (Floerl in sod., 2012), *PAL1* (Gayoso in sod., 2010) ter *MPK1*, *MPK2*, *PRXIIF* in *WAK1* (Weiberg in sod., 2013)). Tarčne regije kandidatnih genov (Preglednica 3) v hmelju smo identificirali in nadalje potrdili in s pomočjo BLASTN algoritma glede na EST bazo hmeljnega transkriptoma, ki je na voljo v laboratoriju (Pokorn, neobjavljen) in s poravnavo na nedavno objavljen genom hmelja kultivarja ShinshuWase (Natsume in sod., 2015). Oligonukleotidne začetnike specifične za pomnoževanje tarčnih regij pri kandidatnih genih hmelja (preglednica 4) smo izdelali s pomočjo računalniškega programa Primer Express Software v3.0 (Applied Biosystems, Foster City, USA). Za vsako potencialno tarčo smo izdelali vsaj 2 para oligonukleotidnih začetnikov. Izmed dobljenih smo izbrali najbolj primerenega (najboljše specifikacije v zgradbi in vezavi). Tako smo za vsako tarčo naročili po en oligonukleotidni začetnik. Seznam izdelanih oligonukleotidnih začetnikov je v preglednici 4. Oligonukleotidne začenike smo primerjali z zaporedjem genoma hmelja (*H. lupulus* L.) s spletnim orodjem BLASTn ter tako preverili, ali se kateri izmed oligonukleotidnih začetnikov večkrat pojavi v DNA zaporedju, kar bi lahko motilo specifično pomnoževanje z metodo kvantitativnega PCR.

3.3.2 Postopek prepisovanja RNA v cDNA

Postopek prepisovanja izolirane RNA v cDNA je bil izveden s pomočjo High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, ZDA), po priloženih navodilih proizvajalca. Kit vsebuje naključno prilegajoče heksamerne oligonukleotidne začetnike ter inhibitor RNAAz. Reakcija reverzne transkripcije je potekala 10 min pri 25 °C, 60 min pri 37°C, 5 s pri 85 °C ter se končala pri 4 °C. Iz 1000 ng RNA smo tako pridobili 1000 ng cDNA v 50 ul končnega volumna. Pomnožena cDNA je bila shranjena v zmrzovalniku pri -20 °C.

3.4 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO V REALNEM ČASU (qPCR)

Kvantitativna verižna reakcija s polimerazo v realnem času je bila izvedena s pomočjo Fast SYBR Green tehnologije na napravi ABI PRISM 7500 Fast Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, USA). Mastermix je bil pripravljen s FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) reagenti (Roche company, Branford, Connecticut USA). Reakcija je bila izvedena na ploščah za 96 PCR reakcij (ena plošča je predstavljala eno časovno točko), končna reakcija, v skupnem volumnu 10 µl je bila sestavljena iz: 2 µl - 25 ng/µl cDNA, oziroma DNA. Prav tako smo dodali specifične oligonukleotidne 0,6 µl začetnike s koncentracijo 600 nM ter 5 µl SYBR Green mastermixa. Dodali smo 1,8 µl Rnase free ddH2O. Sledil je program pomnoževanja specifičnega DNA zaporedja: 10 min pri 95°C in 40 ciklov pri 95 °C za 10 sek ter 30 s pri 60°C. Ob koncu tega programa je bila izvedena tudi reakcija za analizo talilne krivulje, pri kateri je temperaturni gradient potekal od 60 °C do 95 °C. Disociacijska krivulja nam je dala podatek o specifičnosti namnoževanja ter informacijo o pomnoževanju nespecifičnih produktov. Poleg tega je vsaka reakcija potekala v treh tehničnih ponovitvah, na posamezno ploščo pa smo vključili tudi po štiri negativne kontrole (slepe vzorce), ki so poleg običajne reakcijske mešanice vsebovali destilirano vodo namesto cDNA. Slednje je služilo kontroli navzkrižne kontaminacije med vzorci ter reakcijske mešanice. Prav tako smo lahko opazili morebitno prisotnost tvorjenih dimerov oligonukleotidnih začetnikov. Namnoževanje z metodo qPCR je za določeno tarčno sekvenco in časovno točko potekalo na posamezni plošči. Relativna količina pomnožka je bila določena s pomočjo Ct vrednosti, ki predstavlja število ciklov PCR reakcije, pri kateri doseže prazno vrednost signala, ki ga oddaja pomnožena reakcija (Walker, 2002).

3.4.1 Analiza pomnoženih regij

V analizi smo testirali 24 tarčnih produktov na osnovi 48-ih oligonukleotidnih začetnikov. Za qPCR analize smo uporabili združene vzorce, kot je nevedeno v poglavju 3.1.2 Izolacija RNA. Izvedli smo serijo redčitev (6-krat, 36-krat, 216-krat in 1296-krat) ter združene vzorce pomnožili z metodo qPCR z vsemi oligonukleotidnimi začetniki (Preglednica 4), specifičnimi za tarčne gene. Po pomnoževanju smo določili optimalne redčitve vzorcev za pomnoževanje v qPCR reakciji, ter izločili tiste tarčne gene, ki se pri nobenem od redčenih vzorcev niso pomnožili. Tako smo dobili končni izbor 18. tarčnih genov, ki smo jih uporabili v analizi.

DNA izolirano iz korenin in stebel rastlin sort Celeia in Wye Target v treh časovnih točkah (6, 12, 18 dpi) smo redčili do koncentracije 25 ng/µL (Glej prilogo B, kjer so podane koncentracije DNA) in pomnožili s pomočjo glivno specifičnih oligonukleotidnih začetnikov 9-1gs (9-1gs-F-GGTAACGTCATCGAACGACATC in 9-1gs-R-CACACGCTACATATCAAACAGCATAT (Cregeen in sod., 2014; Radišek in sod., 2004)). Tako smo določili relativno količino glivne DNA v vzorcu.

3.4.2 Analiza pomnoženih sekvenc s pomočjo spletnega orodja BLAST

Za analizo pomnoženih zaporedji smo uporabljali tri načine validacije pomnoženih zaporedij. Uporabili smo NCBI Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), kjer smo preverili specifičnost zaporedja z nukleotidnim blastom (BLASTN) ter s proteinskim blastom (BLASTX). Uporabili smo prednastavljene parametre poravnave. V podatkovni zbirkvi verticilija (http://vert.fri.uni-lj.si/blast/blast_link.cgi) smo uporabili orodje BLASTN, s prednastavljenimi parametri poravnave, prav tako pa v podatkovni zbirkvi nedavno objavljenega genoma hmelja kultivarja ShinshuWase (Natsume in sod., 2015), katerega zaporedje genoma v fasta formatu smo pripravili v obliki lokalne blast podatkovne baze, na osnovi katere smo pregledovali zaporedja. Podatkovno bazo verticilija (http://vert.fri.uni-lj.si/blast/blast_link.cgi) smo uporabili za poravnavo tarčnih zaporedij z glivo, da smo preverili specifičnost pomnožkov za hmelj in izločili nespecifično pomnoževanje pri glivi *V. albo-atrum*, glede na to, da smo pomnoževali tarče v okuženih vzorcih.

3.4.3 Validacija housekeeping genov s spletnimi algoritmi

Gene za normalizacijo dobljenih rezultatov izražanja tarčnih genov smo pridobili na podlagi preteklih poskusov preverjanja izražanja HK genov (Štajner in sod., 2013). Tako smo iz literature izbrali in ovrednotili izražanje gena *CAC* (clathrin adaptor complex), *DRH1* (DEAD-box RNA helicase 1), *SAND* in *YLS8* (Yellow leaf specific gene 8, oz. thioredoxin-like protein).

Navedene gene smo validirali ter izbrali dva najprimernejša ter z njima normalizirali podatke dobljene na osnovi pomnoževanja tarčnih genov. Validacija genov je potekala s pomočjo javno dostopnih algoritmov RefFinder (Xie in sod., 2011), delta Ct, BestKeeper, NormFinder in geNorm (<http://www.leonxie.com/referencegene.php?type=reference>).

4 REZULTATI Z RAZPRAVO

4.1 BLAST NA HMELJNI GENOM

Nukleotidne sekvene pomnoženih regij smo s pomočjo spletnega orodja BLASTN poravnali s podatkovno zbirko nedavno objavljenega genoma hmelja kultivarja ShinshuWase (Natsume in sod., 2015). S poravnavo smo preverili, če je bilo pomnoževanje specifično samo za naše tarčno zaporedje, ali pa smo pomnoževali več odsekov hmeljnega genoma. Ugotovili smo, da je bilo pomnoževanje specifično pri 16. genih, pri 2. genih pa smo dobili 2 enaka zadetka. Dva zadetka smo verjetno dobili zaradi primerjave na preliminarni genom, ki smo ga uporabili za poravnavo.

4.2 BLAST NA VERTICILIJEV GENOM

Nukleotidne sekvene pomnoženih regij smo s pomočjo spletnega orodja BLASTN poravnali s podatkovno zbirko *V. albo-atrum* TABOR2 build2 NUC 10/4/2013. S poravnavo smo preverili, če je bilo pomnoževanje specifično samo za hmelj, ali pa smo morda pomnoževali tudi kakšnega izmed odsekov genoma glive *V. albo-atrum* (odsek gena, z enakim zaporedjem kot zaporedje tarčnega gena), glede na to, da smo pomnoževali tarčne gene v okuženih rastlinah. Ugotovili smo, da je bilo pomnoževanje specifično pri vseh tarčnih zaporedjih, glivne regije pa nismo pomnožili.

4.3 BLAST V ZBIRKI NCBI

Celotna zaporedja amplikona hmelja, uporabljeni za izdelavo oligonukleotidnih začetnikov smo poravnali z NCBI podatkovno zbirko na proteinskem nivoju s spletnim orodjem BLASTX. Tako smo pridobili informacijo o vlogi tarčnih zaporedij na proteinskem nivoju, glede na anotacijo pri sorodnih vrstah, saj je hmeljni genom slabo anotiran. Pri BLASTX analizi celotnih sekvenc amplikonov smo z vsemi tarčnimi zaporedji dobili pričakovane zadetke na nivoju proteinov, glede na predhodne analize in literaturne podatke na osnovi katerih smo izbrali tarčne gene (preglednica 3). Tako smo dokazali, da je vloga analiziranih genov specifična, saj kodirajo želen protein.

Preglednica 3: Poravnava tarčnih zaporedij genov z NCBI podatkovno zbirko na proteinskem nivoju s spletnim orodjem BLASTX

Št. tarče	Kratica gena	Homologni lokus (Rastlina)	Akcesijska številka	BLASTx	BLASTX E vrednost	Zaporedja za izdelavo začetnih oligonukleotidov
1	HO059224	protein phosphatase, putative [Ricinus communis]	ref XP_002534559.1	335 bits(860)	5,00E-111	TCGTATCGCTTGGAGTTGGATGACAACCTTGCTTCTTCATAAGTTTGGAAAGGAATCCAACAAATGTATAGGAACCAACCAACATAG
2	HO059063	cysteine-rich receptor-like protein kinase 10 isoform X1 [Prunus mume]	ref XP_008240249.1	632 bits(1630)	0	GCCTTGTGCCACCAGTGTATCCACTACTGGGGTTGTATTGTAAAAGCTGAAGTAGAGGCAGTCGTCGTCATCGTCCTACACGACCC
3	HO059122	E3 ubiquitin-protein ligase UPL1 [Morus notabilis]	ref XP_010088436.1	590 bits(1520)	0,00E+00	TGACCTGACGTTAGCATGGATGCTGATGAAGAAAAACACATTCTTATGAGAAAAACCAGGTCACTGATCATGAACTCAAACCTGGAGG
4	HO059225	glycine-rich RNA-binding family protein [Populus trichocarpa]	ref XP_002305429.1	96.3 bits(238)	6,00E-21	GGGATTGGATTCTGTCACTTCAATAACGAAAAGGCATGAGAGATGCCATCGAGGGCATGAACGGCCAAGATCTTGATGGACGTAACATCACCGTAAACGAGG
5	HO059229	Zinc finger CCCH domain-containing protein 40 [Morus notabilis]	ref XP_010110891.1	253 bits(647)	5,00E-79	TGCAAGAGTTACTGAGCAGGATTAAAGAGATAACTTATGCTCATGGGAGATTGAATCGTCGGATGGTACTACAGCGAGCATGTGC

»se nadaljuje«

Švara A. Izražanje odpornostnih genov pri hmelju ... po okužbi z glivo *Verticillium albo-atrum*.
Mag. delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, 2015

»nadaljevanje preglednice 3: Poravnava tarčnih zaporedij genov z NCBI podatkovno zbirko na proteinskem nivoju s spletnim orodjem BLASTX

Št. tarče	Kratica gena	Homologni lokus (Rastlina)	Akcesijska številka	BLASTx score	BLASTX E value	Zaporedja za izdelavo začetnih oligonukleotidov
6	HO059238	cinnamic acid 4-hydroxylase [<i>Humulus lupulus</i>]	gb ACM69364.1	139 bits(349)	3,00E-35	AGAAGGAGCTGCCCTGGTATCATTCTGCTTTGCCAA TTCTTGGCATCACTATTGGACGTTGGTGCAGAACCT CGAGCTCTTGCCACCA
7	HO059256	PREDICTED: lanC-like protein GCL1 [Malus domestica]	XP_008348578.1	146 bits(368)	9,00E-40	CAGGTGATAGAGAATTCCGTGATGCTGCTATAGAAG CAGGAGAAGTAGTGTGGAAGAATGGGTTAGTGAAG AAGGTTGGACTGGCTGATG
8	HO059263	cycloartenol Synthase [<i>Vitis vinifera</i>]	ref XP_002264289.1	118 bits(296)	5,00E-29	GCGACTGCATACTGAAAGGACTCAAGCTTCAGAT GGTCATGGTATGGTCATGGGTGTTGTTACTT ACGCTACATGGTTGGGTCAAAGGGCTG
9	HO059234	Gibberellin receptor [<i>Medicago truncatula</i>]	ref XP_003627647.1	187 bits(476)	7,00E-55	ATGGTGGCCGTGGAGATGAGAGGATCCAACGGCTGC CGAGGTGTCTGGTCACCGGGCATAGAGGGGACCCAC TCATTGATCGGCAGGAGGA
10	HO059267	Receptor-like kinase FERONIA [<i>Morus nobilis</i>]	ref XP_010099327.1	134 bits(336)	5,00E-33	TCAAAATAAAGGGTGAGGACGAAGTCGTTAATGT ACAGTAACAGTAACACCGACTGGGCATATAATAATT ATAGCTCGGAAGACGGGA

»se nadaljuje«

Švara A. Izražanje odpornostnih genov pri hmelju ... po okužbi z glivo *Verticillium albo-atrum*.
Mag. delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, 2015

»nadaljevanje preglednice 3: Poravnava tarčnih zaporedij genov z NCBI podatkovno zbirkou na proteinskem nivoju s spletnim orodjem BLASTX

Št. tarče	Kratica gena	Homologni lokus (Rastlina)	Akcesijska številka	BLASTx score	BLASTX E value	Zaporedja za izdelavo začetnih oligonukleotidov
11	PAL1_AR ATH1156	phenylalanine ammonia lyase [<i>Morus alba</i> var. multicaulis]	gb AEE81750.1	1333 bits(3449)	0.0	CTTCCGCCATCACATTGAAAAGCTAACTTTTCTC TCCAAATCCACCTATATAACACCCACATACCTTCTCC CTCTACTTCCAAGAAA
14	PRX52171 03	peroxidase [<i>Arabidopsis</i> <i>thaliana</i>]	52 ref NP_196153.1	449 bits(1155)	1,00E-151	CGAGCTAATTAAGAGTTGCAAGCATATATATCCCCT ATAGAAACAAGAGAAAACACTATAAACACTTTCTTA ATAAATAATAACAACTAGTTAATAATTGCCTATAT AGCTCTCCTTCG
17	PRX34681 5	class peroxidase [<i>Populus</i> <i>trichocarpa</i>]	III gb AHL39106.1	436 bits(1120)	2,00E-146	AGGGAAGAAAAGTCTTAGCAGACAATAAAAGTTGT TCAACACACGCTTATATATCACACTACCATAAATTGA AGCCTTATTCGTGGTGT
18	GER34511	Germin-like protein [<i>Pisum</i> <i>sativum</i>]	emb CAC34417.1	274 bits(701)	6,00E-87	TCTTCGGAGCCGTCCAAGACTTTGCGTGGCGGACC TCTCTGGTCTCAAGGCCCGCTGGCTACTCCTGCAA GAACCGAATAAGGTT
20	MPK1161 36	Mitogen-activated protein kinase 1 [<i>Theobroma</i> <i>cacao</i>]	ref XP_007017621.1	647 bits(1670)	0.0	CTAACTTGAAATGCTCAGGCTCCTTATCAATATGAAAAA ATAGAAGGAAAGGCTATTATATGCACAAACACATA GCCCACTTCAGCCAGCA

»se nadaljuje«

Švara A. Izražanje odpornostnih genov pri hmelju ... po okužbi z glivo *Verticillium albo-atrum*.
Mag. delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, 2015

»»nadaljevanje preglednice 3: Poravnava tarčnih zaporedij genov z NCBI podatkovno zbirko na proteinskem nivoju s spletnim orodjem BLASTX

Št. tarče	Kratica gena	Homologni lokus (Rastlina)	Akcesijska številka	BLASTx score	BLASTX E value	Zaporedja za izdelavo začetnih oligonukleotidov
21	MPK1762 1	putative MAPK2 [Catharanthus roseus]	gb ABO84840.1	665 bits(1717)	0.0	TCAAATGCTGAGGTAGTAGTTCATAGAAAAATAATA GTAGATAGAAGGTACTGCTGGTTCCAAAAGCTCATT AAGAGAAGCAACACAAGT
22	PRXIIF85 56	PREDICTED: peroxiredoxin-2F, mitochondrial [<i>Fragaria vesca</i> subsp. <i>vesca</i>]	ref XP_004296922. 1	363 bits(931)	3,00E-122	TCCTGAAGAGGC AAAGTTGTTCTGATAAAAAGAAC GAATTTATAAACATTGGCATGATACAAAGTAAC TTTT CAACTTAATT CAGAAGGTTAGTGAGCCC

Preglednica 4: Seznam izdelanih 22-ih parov oligonukleotidnih začetnikov za pomnoževanje z metodo kvantitativne PCR reakcije

IME	ZAPOREDJE (F-5'-3'; R-3'-5')
HO059224F1	TCGTATCGCTTGGAGTTGGAA
HO059224R1	CTATGTTGGTGGTCCCTATACATTGTT
HO059063F1	GCCTTGTCGCCACCAGTGTAA
HO059063R1	GGGTCGTGAGGACGATGGAA
HO059122F1	TGACCTGACGTTAGCATGGAT
HO059122R1	CCTCCAGGTTGAGTCATGATC
HO059273F1	CTAGGCTCGAGACCCCCAGTTG
HO059273R1	TTCGTGCCACAGAACCCATA
HO059225F1	GGGATTGGATTCTGCACTTTC
HO059225R1	CCTCGTTACGGTGATGTTACG
HO059229F1	TGCAAGAGTTACTGAGCAGGATT
HO059229R1	GCACATGCTCGCTGTAGTACCA
HO059238F1	AGAAGGAGCTGCCCTGGTATC
HO059238R1	TGGTGGCAAGAGCTCGAAGT
HO059256F1	CAGGTGATAGAGAATTCCGTGATG
HO059256R1	CATCAGCCAGTCCAACCTTCTT
HO059263F1	GCGACTGCATACATTGAAAGGA
HO059263R1	CAGCCCTTGACCCAAA
HO059234F1	ATGGTGGCCGTGGAGATG
HO059234R1	TCCTCCTGCCGATCAATGAG
HO059267F1	TCAAAATAAAGGGTGAGGACGAA
HO059267R1	TCCCGTCTCCGAGCTATAATTA
PAL1_ARATH1156F1	CTTCCGCCATCACATTGAA
PAL1_ARATH1156R1	TTTCTTGGAAAGTAGAGGGAGAAGGT
PAL1_ARATH5226F1	CAGCTGTTGCCCGTTATT
PAL1_ARATH5226R1	CTGGCAGCCATTAAGTTATCTGAA
PAL1_ARATH3022F1	GTCTTAAGCAAATACATTCCAAGTTTC
PAL1_ARATH3022R1	TTTCAAATGGTACCGTGGATT
PRX52F1	CAAGGGCGAAATCAGAAAGAA
PRX52R1	AAAGCAAAACACACAACGTTGATTA
PRX5217103F1	CGAGCTAATTAAGAGTTGCAAGCA
PRX5217103R1	CGAAGGAGAGCTATAGGCAAATTATT
PRX5235592F1	GCACATCGGATATGACAAGTTTT
PRX5235592R1	ATTCTGCTTTAGTTTGCCTT
PRX3462688F1	TTTGTGGTGGAGGGTTGC
PRX3462688R1	TTGAATGACCCCTCGTACAATG
PRX346815F1	AGGGAAGAAAAGTCTTAGCAGACAAT
PRX346815R1	ACACCACGAATAAGGCTCAATT
GER34511F1	TCTTCGGAGCCGTCCAA

»se nadaljuje«

»nadaljevanje preglednice 4: Seznam izdelanih 22-ih parov oligonukleotidnih začetnikov za pomnoževanje z metodo kvantitativne PCR reakcije

IME	ZAPOREDJE (F-5'-3'; R-3'-5')
GER34511R1	AACCTTATTCGCGTTCTTGCA
GER32174F1	CATGCATGAAACAGCTGAAACC
GER32174R1	TGTGCATGATTTATGTCTAGTACGTGTA
MPK116136F1	CTAACTTGAATGCTCAGGCTCCTT
MPK116136R1	TGCTGGCTGAAGTGGGCTAT
MPK17621F1	TCAAATGCTGAGGTAGTAGTTCATAGAAA
MPK17621R1	ACTTGTGTTGCTTCTCTTAATGAGCTT
PRXIIF8556F1	TCCTGAAGAGGCAAAGTTGTTC
PRXIIF8556R1	GGGCTCACTAACCTCTGAATTAAGT
WAK124197F1	TCGAACCACATTCAAGATCAAAA
WAK124197R1	TTCCATAGAAGAAAAGGAATACTTGCT
WAK18562F1	CGGCTCCCAGTCTTTATTTATTA
WAK18562R1	TTTGTGATCTTAGCCGCTTA

4.4 GLIVNA DNA

4.4.1 Test uspešnosti inokulacije

Inokulacija je bila relativno uspešna, saj smo po testu pomnoževanja glive *V. albo-atrum* s specifičnimi rezultati elektroforeze od 160 testiranih rastlin potrdili 22 lažno negativnih vzorcev, 0 lažno pozitivnih, pri sedmih vzorcih pa nismo uspeli pojasniti rezultata. Za vsako obravnavanje pa smo uspeli pridobiti vsaj 8 vzorcev, ki so bili primerni za nadaljnje analize kvantifikacije glivne DNA v hmeljnih rastlinah ter jih uporabili v postopku izolacije RNA (preglednici 5 in 6).

Preglednica 5: Okuženi vzorci v testu uspešnosti okuževanja hmelja sorte Celeia in Wye Target z metodo PCR s specifičnimi oligonukleotidnimi začetniki za *V. albo-atrum* po končnem ločevanju na agaroznem gelu (Ime združenih vzorcev pove: Število dni po inokulaciji (6, 12 in 18). Kultivar hmelja (CE - Celeia; WT - Wye Target), okužen ali neokužen vzorec (+ okužen; - neokužen), del rastline (R - korenine; S - steblo). Stolpec "Test": Levi stolpec predvidena okužba, desno dejanska okužba po testu na elektroforezi: 1 - zaznali givno DNA; 0 - givne DNA nismo zaznali; ? - ni znano ali je prišlo do okužbe ali ne).

Vzorec	Št. Vzorca	Test	Vzorec	Št. Vzorca	Test	Vzorec	Št. Vzorca	Test
06CE+03R	126	1 1	12CE+10R	109	1 1	12WT+08R	44	1 0
06CE+04R	127	1 1	12CE+11R	110	1 1	12WT+09R	31	1 0
06WT+01R	21	1 1	12CE+12R	111	1 1	12WT+12R	40	1 0
06WT+02R	25	1 1	12CE+13R	112	1 1	12WT+15R	39	1 0
06WT+03R	149	1 1	12CE+14R	113	1 1	12WT+16R	37	1 0
06WT+04R	19	1 1	12WT+01R	33	1 1	12WT+17R	48	1 0
06WT+05R	150	1 1	12WT+04R	35	1 1	12WT+20R	38	1 0
06WT+06R	155	1 1	12WT+05R	43	1 1	18CE+02R	76	1 0
06WT+08R	153	1 1	12WT+07R	30	1 1	18CE+04R	73	1 0
06WT+09R	156	1 1	12WT+10R	36	1 1	18CE+07R	78	1 0
06WT+10R	24	1 1	12WT+11R	27	1 1	18CE+08R	74	1 0
06WT+12R	159	1 1	12WT+13R	29	1 1	18CE+09R	65	1 0
06WT+13R	151	1 1	12WT+14R	28	1 1	18CE+10R	69	1 0
06WT+15R	160	1 1	12WT+19R	32	1 1	18CE+12R	72	1 0
06WT+16R	157	1 1	18CE+01R	66	1 1	18CE+14R	77	1 0
06WT+18R	23	1 1	18CE+05R	68	1 1	18WT+01R	60	1 0
06WT+19R	152	1 1	18CE+06R	67	1 1	18WT+02R	52	1 0
06WT+20R	154	1 1	18CE+11R	70	1 1	18WT+04R	57	1 0
06CE+05R	128	1 1	18CE+13R	71	1 1	18WT+06R	61	1 0
06CE+06R	129	1 1	18WT+03R	51	1 1	18WT+07R	46	1 0
06CE+07R	130	1 1	18WT+05R	53	1 1	18WT+08R	47	1 0
06CE+08R	131	1 1	18WT+10R	49	1 1	18WT+09R	56	1 0
06CE+09R	132	1 1	18WT+17R	63	1 1	18WT+12R	50	1 0
06CE+10R	133	1 1	18WT+18R	54	1 1	18WT+13R	64	1 0
06CE+11R	134	1 1	06CE+01R	124	1 0	18WT+14R	55	1 0
06CE+12R	135	1 1	06CE+02R	125	1 0	18WT+15R	58	1 0
06CE+13R	136	1 1	06WT+11R	20	1 0	18WT+16R	59	1 0
12CE+01R	114	1 1	06WT+14R	26	1 0	12CE+04R	117	1 ?
12CE+02R	115	1 1	06WT+17R	158	1 0	12WT+02R	42	1 ?
12CE+03R	116	1 1	06CE+14R	123	1 0	12WT+18R	34	1 ?
12CE+05R	118	1 1	06WT+07R	22	1 0	18CE+03R	75	1 ?
12CE+07R	120	1 1	12CE+06R	119	1 0	18WT+11R	62	1 ?
12CE+08R	121	1 1	12WT+03R	41	1 0			
12CE+09R	122	1 1	12WT+06R	45	1 0			

Preglednica 6: Neokuženi vzorci v testu uspešnosti okuževanja hmelja sorte Celeia in Wye Target z metodo PCR s specifičnimi oligonukleotidnimi začetniki za *V. albo-atrum* po končnem ločevanju na agaroznem gelu (Ime združenih vzorcev pove: Število dni po inokulaciji (6, 12 in 18). Kultivar hmelja (CE - Celeia; WT - Wye Target), okužen ali neokužen vzorec (+ okužen; - neokužen), del rastline (R - korenine; S - steblo). Stolpec "Test": Levi stolpec predvidena okužba, desno dejanska okužba po testu na elektroforezi: 1 - zaznali glivno DNA; 0 - glivne DNA nismo zaznali; ? - ni znano ali je prišlo do okužbe ali ne)

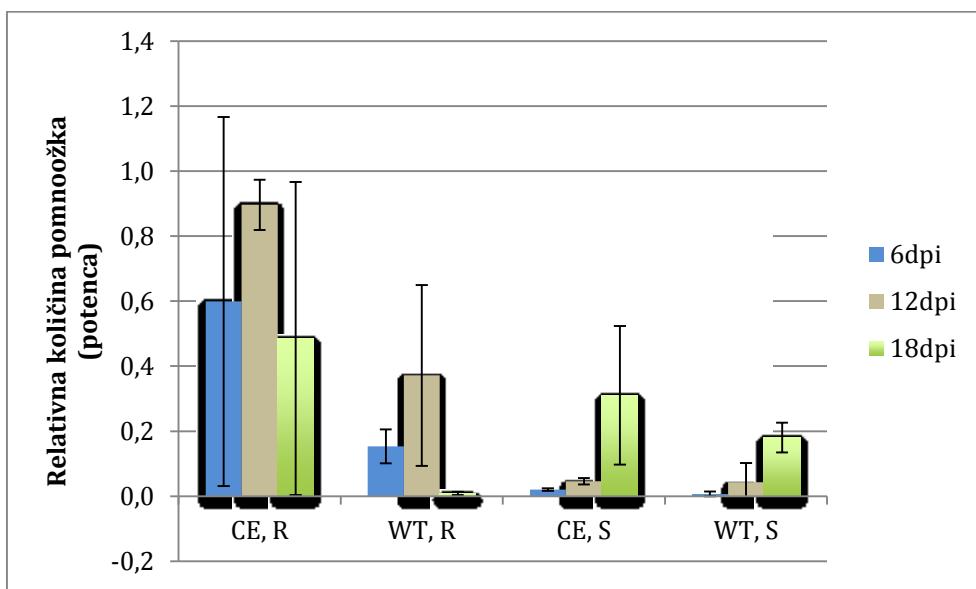
Vzorec	Št. Vzorca	Test	Vzorec	Št. Vzorca	Test	Vzorec	Št. Vzorca	Test
06CE-01R	99	0 0	12WT-08R	14	0 0	18CE-02R	84	0 0
06CE-02R	100	0 0	12CE-01R	98	0 0	18CE-03R	85	0 0
06CE-03R	101	0 0	12CE-02R	95	0 0	18CE-04R	80	0 0
06CE-04R	102	0 0	12CE-03R	91	0 0	18CE-05R	88	0 0
06CE-05R	103	0 0	12CE-04R	92	0 0	18CE-06R	87	0 0
06CE-06R	104	0 0	12CE-05R	93	0 0	18CE-07R	83	0 0
06CE-07R	105	0 0	12CE-07R	89	0 0	18CE-08R	82	0 0
06CE-08R	106	0 0	12CE-08R	90	0 0	18CE-09R	86	0 0
06CE-09R	107	0 0	12CE-09R	96	0 0	18CE-10R	81	0 0
06CE-10R	108	0 0	12CE-10R	97	0 0	18WT-01R	15	0 0
06WT-01R	139	0 0	12WT-01R	148	0 0	18WT-02R	13	0 0
06WT-02R	143	0 0	12WT-02R	8	0 0	18WT-03R	14	0 0
06WT-03R	146	0 0	12WT-03R	1	0 0	18WT-04R	12	0 0
06WT-04R	142	0 0	12WT-04R	7	0 0	18WT-05R	16	0 0
06WT-05R	137	0 0	12WT-05R	5	0 0	18WT-07R	10	0 0
06WT-06R	140	0 0	12WT-06R	3	0 0	18WT-08R	11	0 0
06WT-07R	145	0 0	12WT-07R	6	0 0	18WT-09R	18	0 0
06WT-08R	138	0 0	12WT-09R	2	0 0	18WT-10R	9	0 0
06WT-09R	144	0 0	12WT-10R	4	0 0	12CE-06R	94	0 ?
06WT-10R	141	0 0	18CE-01R	79	0 0	18WT-06R	17	0 ?

4.4.2 Kvantifikacija glivne DNA v okuženih rastlinah

Rezultat pomnoževanja relativne količine glivne DNA v treh časovnih točkah v delih korenin in stebel rastline, prikazujeta preglednica 7 in slika 10.

Preglednica 7: Prikaz relativne količine DNA glive, izolirane iz koreninskih (R) in stebelnih (S) vzorcev hmelja sorte Celeia (CE) in Wye Target (WT), v časovnih točkah 6, 12 in 18 dpi (dni po okuževanju).

Sorta in rastlinski del	6dpi		12dpi		18dpi	
	Povprečje	St. Dev	Povprečje	St. Dev	Povprečje	St. Dev
CE, R	0,599	0,567	0,896	0,077	0,485	0,481
WT, R	0,153	0,052	0,371	0,278	0,008	0,005
CE, S	0,020	0,004	0,045	0,010	0,310	0,213
WT, S	0,007	0,008	0,043	0,060	0,180	0,046



Slika 10: Prikaz povprečja treh ponovitev in standardnih odklonov od povprečja relativne količine DNA glive, izolirane iz koreninskih (R) in stebelnih (S) vzorcev hmelja sorte Celeia (CE) in Wye Target (WT), v časovnih točkah 6, 12 in 18 dpi (dni po okuževanju).

Ugotovili smo, da je količina glivne DNA v koreninah največja v časovni točki vzorčenja 12 dpi v obeh sortah hmelja ter da se zmanjša v točki 18 dpi. Količina glivne DNA pa je v vseh časovnih točkah višja pri občutljivi sorti Celeia, kot pri odporni sorti Wye Target (Slika 11). S tem smo potrdili rezultat Cregeen in sod. (2014), ki so dokazali, da količina glive v koreninah s časoma začne upadati, saj se gliva seli v više dele rastline. Relativna količina glivne DNA v steblih občutljive sorte je bila tekom kolonizacije malo višja kot pri odporni sorti. Šest dni po inokulaciji je bila razlika v količini glive v steblih med sortama majhna ter je ostala na enakem nivoju v 12 in 18 dpi. Pri 18 dpi opazimo izrazito povečanje relativne količine glive v stebelnih vzorcih.. Podoben rezultat je bil prikazan s strani Cregeen in sod. (2014), kjer je bila relativna količina glive do 15 dpi nizka, nato pa je skokovito narasla, medtem ko je v koreninah v tej časovni točki že upadla. Razliko v količini DNA lahko pripisemo odpornosti posamezne sorte na glivo. Odgovor rastline na kolonizacijo glive v obliki fizičnih ovir je bil opažen tudi pri patosistemu hmelj-*V. albo-atrum*, kot ekstenzivno, zgodnje formiranje tiloze ter sinteza in nalaganje premazov okoli okuženih žil (Agrios, 1997). Cregeen in sod (2014) navajajo, da je pojav posebej intenziven v občutljivih rastlinah, medtem ko odporne sorte kažejo manj tiloze ter žilnega premaza. Zmanjšana relativna količina glive v odpornih sortah v primerjavi z občutljivimi je bila prikazana tudi v ostalih študijah z glivami rodu *Verticillium*. Primeri so oljna repica, oljke, solata in bombaž, kjer so določili relativno količino glivne DNA ter fizične odzive rastlin, kot je debeljenje celične stene, nalaganje lignina ter sinteza fenolnih spojin tekom kolonizacije (Eynck in sod., 2007; Markakis in sod., 2009; Zhang in sod., 2013; Vallad in Subbarao, 2008).

4.4.3 Analiza učinkovitosti pomnoževanja tarčnih produktov z RT-qPCR

Določili smo učinkovitost pomnoževanja, ki je definirana z naklonom regresijske premice standardne umeritvene krivulje. Analizirali smo štiri zaporedne redčitve združenih vzorcev (6-kratna, 36-kratna, 216-kratna in 1296-kratna redčitev) in izračunali učinkovitost pomnoževanja v programu ABI 7500 SDS 2.0.4 (Applied Biosystems) (glej preglednico 8). Sprejemljiva učinkovitost pomnoževanja je med 80 % in 110 %. Učinkovitost je bila v normalnih mejah pri vseh tarčah z izjemo koreninskih vzorcev genov HO059229 HO059256 in GER34511.

Preglednica 8: Prikaz učinkovitosti pomnoževanja tarčnih sekvenč pri združenih vzorcih posebej korenin (S) in stebel (R) z metodo qPCR

TARGET	EFFICIENCY (%)	
	S	R
YLS8	100,0	95,0
DRH1	95,1	96,0
SAND	89,8	82,1
CAC	100,3	101,7
HO059224	95,8	104,9
HO059063	100,4	109,9
HO059122	90,2	107,5
HO059225	105,8	98,0
HO059229	98,3	69,5
HO059238	101,4	102,5
HO059256	97,5	72,1
HO059263	104,2	80,5
HO059234	106,6	96,6
HO059267	110,5	85,4
PAL1_ARATH1156	109,7	89,6
PRX5217103	95,6	96,7
PRX346815	97,9	90,5
GER34511	95,2	155,0
MPK116136	107,0	104,9
MPK17621	102,3	106,3
PRXIIF8556	98,5	102,7

4.5 IZBOR IN VALIDACIJA REFERENČNIH GENOV

Za najbolj primerna referenčna gena sta se izkazala gena *CAC* in *YLS-8* (Preglednici 9 in 10), ki sta bila uporabljena v nadaljnji analizi. Iz nadaljne analize je bil izvzet gen *SAND*,

ker se je njegovo pomnoževane v hmeljni cDNA izkazalo za nespecifično, saj smo dobili 2 izrazita vrhova pri talilni krivulji v disociacijski analizi s qPCR.

Preglednica 9: Vrednosti normalizacije izražanaja referenčnih genov z algoritmi Delta CT, Bestkeeper, Normfinder, Genorm ter skupna validacija pri steblih. Geni z nižjo vrednostjo se bolj stabilno izražajo

STEBLA	Delta CT	Bestkeeper	Normfinder	Genorm	Comprehensive
CAC	2,112	1,018	0,439	1,348	1,19
DRH1	2,994	2,106	2,84	1,611	3
YLS-8	2,232	0,756	1,277	1,348	1,414

Preglednica 10: Vrednosti normalizacije izražanaja referenčnih genov z algoritmi Delta CT, Bestkeeper, Normfinder, Genorm ter skupna validacija pri koreninah. Geni z nižjo vrednostjo se bolj stabilno izražajo

KORENINE	Delta CT	Bestkeeper	Normfinder	Genorm	Comprehensive
CAC	2,296	2,191	1,745	1,623	1,86
DRH1	2,643	2,082	2,403	2,303	2,71
YLS-8	1,97	1,491	0,811	1,623	1

Referenčni geni naj bi imeli konstantno izražanje v različnih tkivih ob različnih pogojih. Kljub temu lahko njihovo izražanje niha tekom razvoja rastline ter pod določenimi okoljskimi pogoji (Li in sod., 2011; Vandensompele in sod., 2002). V takšnem primeru rastlinski geni niso nujno vpleteni le v osnovni celični metabolizem, temveč tudi v ostale celične procese. Raziskave kažejo, da se referenčni geni ponavadi stabilno izražajo le znotraj posameznih vrst ali sort in pri določenih stresnih dejavnikih, ter le v specifičnih organih rastline. Poleg tega so lahko specifični tudi za razvojno fazo ali pa glede na posamezne vplive okoljskih dejavnikov (Chen in sod., 2014). Zaradi tega moramo referenčne gene preizkusiti in validirati, glede na stabilnost njihovega izražanja v posameznem poskusu (Guénin in sod., 2009). Validacija genov je pomembna zato, da izberemo gene, ki se pri analiziranih vzorcih v okviru danega poskusa najbolj stabilno izražajo, ne glede na obravnavanja, stresne dejavnike in pogoje rasti ter tkivo oz. rastlinske organe. V našo študijo smo vključili dva referenčna gena, da bi s tem izničili vpliv nestabilnega izražanja enega in drugega (Vandensompele in sod., 2002), kot posledice biotskega stresa in ne le različne količine in kakovosti analiziranega RNA vzorca.

Gen *DRH1* spada v superdružino RNA helikaz ter ima vlogo odvijanja RNA, začetka translacije, procesiranja RNA in zlaganja ribosomov. Ker so se helikaze ob stresu izkazale za nestabilne (Tomashow, 2001), je mogoče, da se podoben vzorec pojavi pri naši študiji. Pri hmelju do sedaj ni bilo podatka o stabilnosti izražanja za koreninske vzorce (Štajner in sod., 2013), zato je verjetno da je pri našem poskusu prišlo do interakcij z glivo, ki ne dajo stabilnega izražanja *DRH1* gena.

Gen *CAC* kodira protein za klatrin, ki je udeležen v celičnem transportu veziklov. Delno manj stabilno izražanje med posameznimi vzorci je lahko posledica različne kakovosti RNA vzorcev, v manjši meri tudi različega odziva na okužbo. Tekom razvoja rastline v različnih obdobjih namreč pride do intenzivnejše endocitoze in sekrecije veziklov kar je lahko povezano z različnim izražanjem klatrinskih genov (Santuari in sod., 2011).

Gen *YL-S8* kodira mitotski protein in je vpletен v senescenco listov ter propadanje kloroplastov. V študiji se je izkazal za najbolj stabilnega. Delno nestabilno izražanje pri posameznih vzorcih je lahko posledica različne kakovosti RNA, ali pa senescence po infekciji z glivo (Biswal in sod., 2003). Se pa je *YLS-8* za bolj stabilnega izkazal v izražanju v koreninah kot pa v steblih, kar je zaradi odsotnosti klorofila pričakovano.

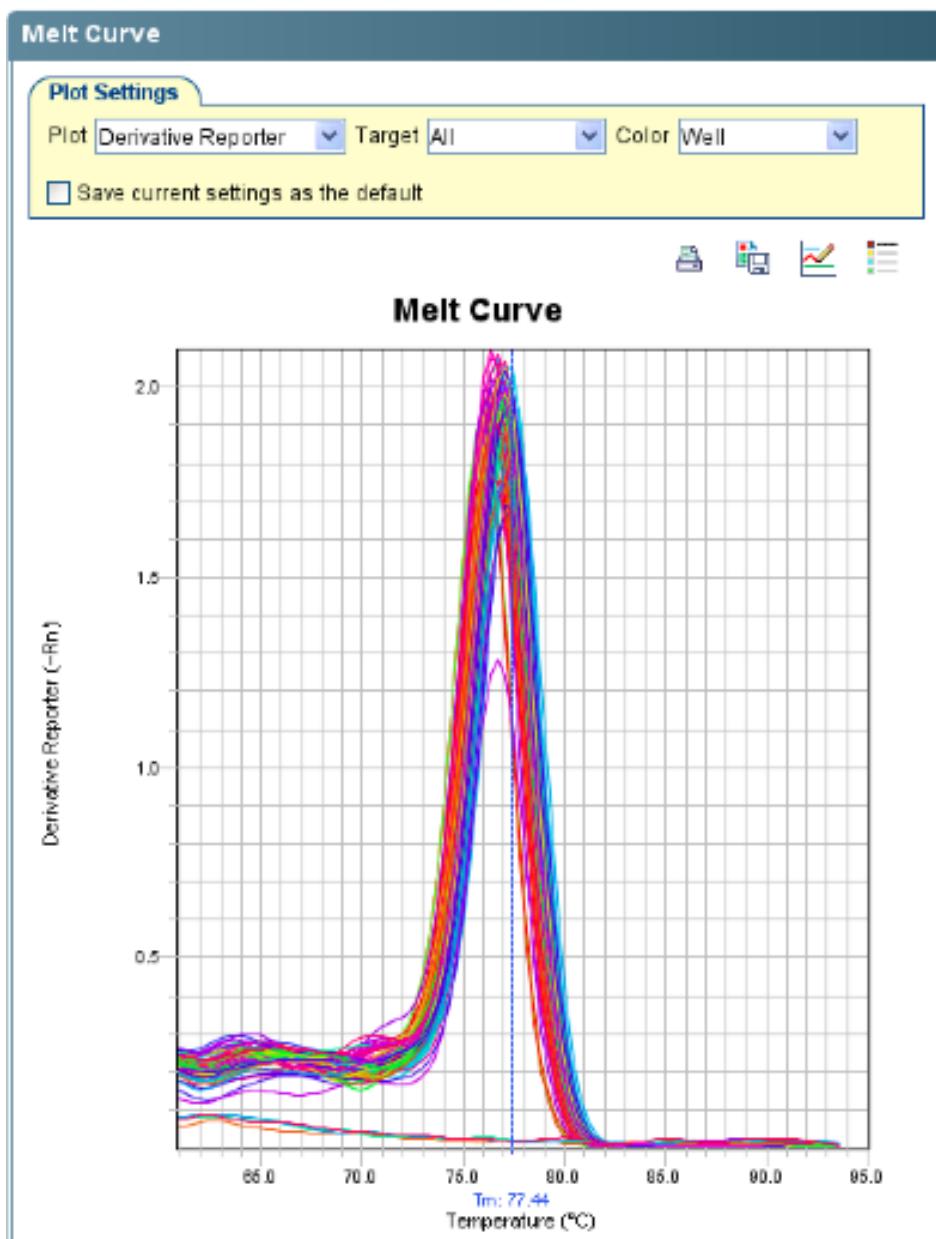
Tekom analize smo opazili, da je bila stabilnost izražanja referenčnega gena *CAC* v koreninah nižja kot v steblih (preglednica 9 in preglednica 10), prav tako tudi pri genu *YLS8* v primeru analize z algoritmoma GeNorm in Bestkeeper. Izolacija RNA je potekala uspešno, saj smo po analizi integritete RNA z RIN testom potrdili dobro integriteto RNA (glej Priloga C in D). Integriteta in čistost RNA lahko močno vplivata na rezultat qPCR analize (Chen in sod., 2014a). Razlog za večjo nestabilnost pomnoževanja referenčnih genov v koreninskih vzorcih bi lahko bil tudi v integriteti izolirane RNA (Priloga D), ki je sicer bila v večini primerov dobra. Izražanje nižje stabilnosti v koreninskih vzorcih se je pojavila pri *A. thaliana* (Remans in sod., 2008), *Lolium multiflorum* (Wang in sod., 2015), *Cynodon dactylon* (Chen in sod., 2014a), ne pa tudi pri *Cucumis melo*. L (Kong in sod., 2014). Zaključimo, da gre za tkivno specifično izražanje v stresnem odzivu rastline.

4.6 ANALIZA DIFERENCIALNO IZRAŽENIH GENOV

Spremembe v transkriptomu hmelja v obdobju zgodnje kolonizacije do razvoja simptomov po inokulaciji s patogeno glivo *V. albo-atrum* so bile analizirane z diferencialno analizo qPCR. Primerjava izražanja tarčnih transkriptov je bila narejena med neokuženimi (kontrolnimi) in okuženimi rastlinami občutljivega kultivarja Celeia (CE, kompatibilna interakcija) ter odpornega kultivarja Wye Target (WT, inkompabilnostna interakcija) v časovnih točkah 6, 12 in 18 dpi. Na obravnavanje smo analizirali tri vzorce in v vsakem od vzorcev so bile združene po dve - tri biološke ponovitve (glej prilogo D). V analizi smo posebej obravnavali koreninske (R) ter stebelne vzorce (S). Ekspresija po posameznih tarčnih genih je predstavljena kot razlika (log2-kratnik) med okuženo in občutljivo sorto, kar pomeni, da je v primeru prikazane negativne ravni izražanja na grafu v posameznem obravnavanju prišlo do višje ravni izražanja pri neokuženem vzorcu kot pri okuženem in obratno. Z disociacijsko analizo smo potrdili pomnoževanje le enega tarčnega produkta in

tako izključili nespecifično pomnoževanje pri vseh analiziranih genih. Na sliki 12 lahko vidimo primer talilne krivulje za tarčni gen cinamat-4-hidroksilaze.

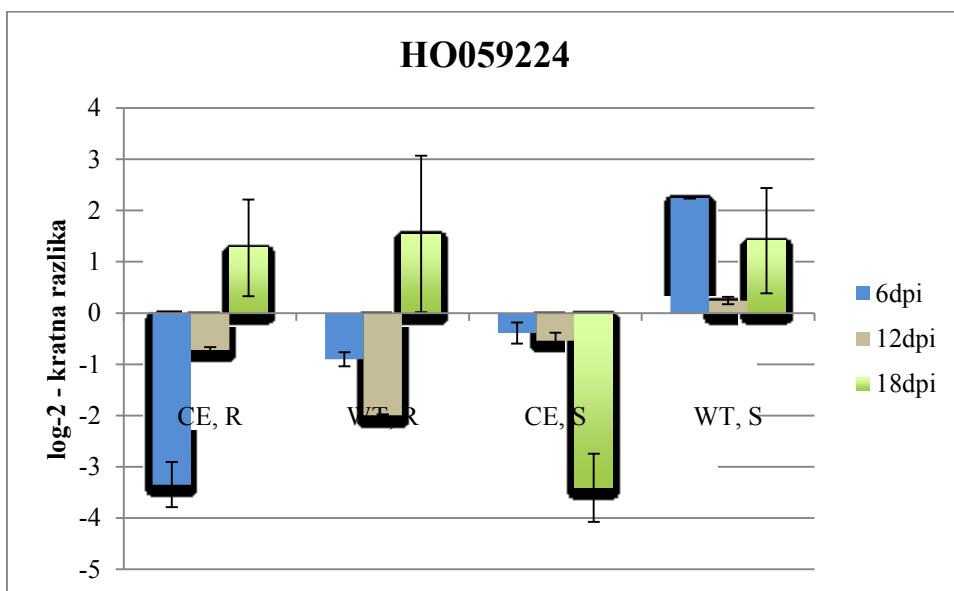
V nadaljevanju bomo predstavili rezultate diferencialne qPCR analize posameznih tarčnih genov (Priloga E) in komentirali rezultate glede na literaturne podatke.



Slika 11: Talilna krivulja disociacijske qPCR analize za tarčni gen cinnamate 4-hydroxylase prikazuje en vrh disociacije pri temperaturi 77,4 °C za vse analizirane vzorce

4.6.1 Proteinska fosfataza 2c 57

Zaporedje transkripta HO059224 kaže največjo podobnost s proteinom za domnevno proteinsko fosfatazo (Protein phosphatase 2c 57; XP_002534559). Transkript je s tem proteinom v poravnavi kazal 82 % identičnost. Obstoj tega zaporedja smo potrdili tudi v genomu hmelja (Natsume in sod., 2015) in sicer je bila identificirana podobnost z enim zaporedjem (> 95 %). Gen za encim spada v družino serin-treoninskih fosfataz. Katalitska aktivnost encima ob prisotnosti vode odcepi fosfatno skupino iz proteina z serinom in treoninom. V podenoto aktivnega mesta se vežeta dva kofaktorja, ki sta dva manganova ali magnezijeva iona. Protein je vpletен v prenos signala abscizinske kislino, kot negativni regulator, kar je še posebej jasno v celicah listnih rež (Leonhardt in sod., 2004).



Slika 12: Prikaz diferencialno izraženega zaporedja HO059224 v primerjavi med neokuženo in okuženo rastlino hmelja pri sorti Celeia (CE) in Wye Target (WT) v časovnih točkah 6, 12 in 18 dpi v koreninah (R) in steblih (S)

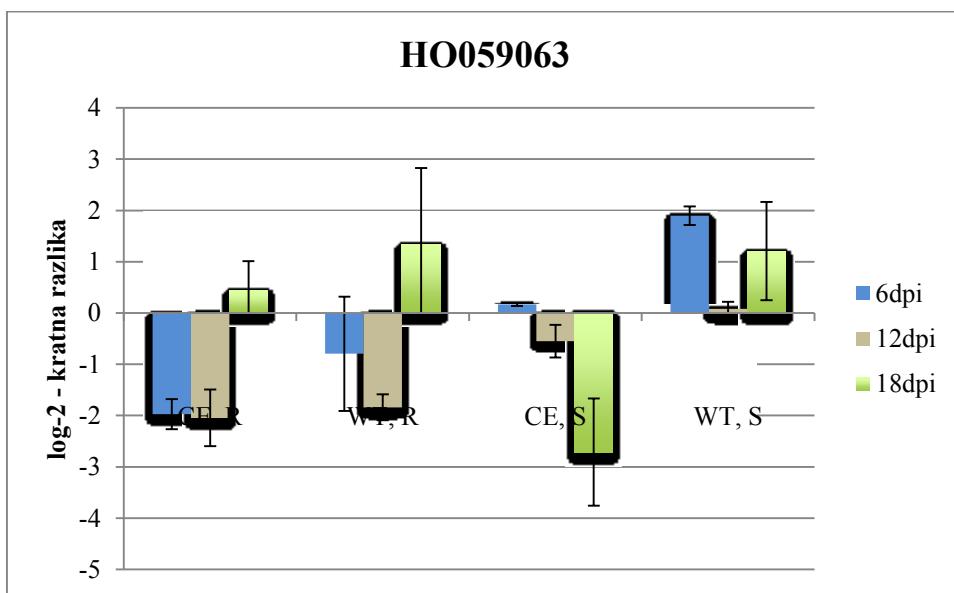
Trend izražanja v koreninah je enak pri CE in WT in sicer pride do zvišanja ravni izražanja šele v zadnji časovni točki (18 dpi), medtem ko je bil višek kolonizacije v koreninah pri obeh sortah v 12 dpi. V stebelnih vzorcih imamo izrazito različno izražanje med CE in WT in sicer pri občutljivi sorti CE v vseh točkah opazimo zmanjšano raven izražanja v okuženih vzorcih, pri tolerantni sorti WT pa v vseh točkah opazimo povečano raven izražanja. To nakazuje na manjšo obrambno vlogo tarčnega gena v občutljivi sorti.

Diferencialno povečano izražanje v pretekli raziskavi (Javornik-Cregeen, 2010) je bilo identificirano v stebelnih vzorcih neokužene sorte Celeia, v časovni točki 10 dpi, kar se ni ponovilo v našem primeru. Rodriguez (1998) navaja, da se abscizinska kislina (ABA) kopči v obdobju senescence, tako je povečano izražanje gena pričakovano v zgodnejših

fazah kolonizacije. Kot negativni regulator ABA je izražanje gena upadlo v kasnejših fazah (steba Celeie). Predpostavljamo da se to zgodi, ko je gliva že precej razširjena po rastlini, procesi, ki preprečujejo razširjanje glive pa so v polnem razmahu. Ko nastopi sinteza ABA izražanje proteina upade (Gosti in sod., 1999).

4.6.2 G-tip lektinski S-receptor, serin/treonin proteinska kinaza 120

Zaporedje transkripta HO059063 kaže največjo podobnost s proteinom za G-tip lektinskega S-receptorja, serin/treonin proteinske kinaze 120 (G-type lectin S-receptor-like serine/threonine-protein kinase B120; XP_008240249). Transkript je s tem proteinom v poravnati kazal 82 % identičnost. Obstoj tega zaporedja smo potrdili tudi v genomu hmelja (Natsume in sod., 2015) in sicer je bila identificirana podobnost z enim zaporedjem (> 95 %). Kim in sod. (2009) navajajo, da G-tip lektinskega S-receptorja, serin/treonin proteinske kinaze 120 represira signalno pot odgovorno za odpornost na bolezni, ki se sproži v odgovoru na bakterijskega patogena (primer: *Pseudomonas syringae* v paradižniku).



Slika 13: Prikaz diferencialno izraženega zaporedja HO059063 v primerjavi med neokuženo in okuženo rastlino hmelja pri sorti Celeia (CE) in Wye Target (WT) v časovnih točkah 6, 12 in 18 dpi v koreninah (R) in steblih (S)

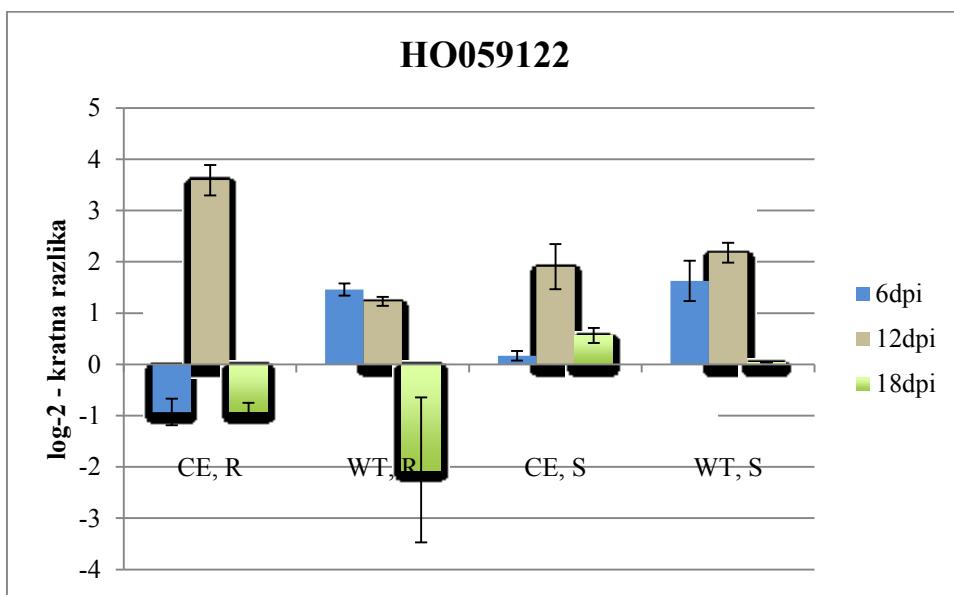
Trend izražanja gena, ki kodira G-tip lektinskega S-receptorja, serin/treonin proteinske kinaze 120 je v koreninah enak pri CE in WT in sicer pride do zvišanja ravni izražanja šele v zadnji časovni točki (18 dpi), medtem ko je utišanje izrazito v prvih dveh časovnih točkah obeh sort. V stebelnih vzorcih imamo izrazito različno izražanje med CE in WT in sicer pri občutljivi sorti CE le v prvi časovni točki opazimo rahlo povečano izražanje,

kasneje pa zmanjšano raven izražanja, pri tolerantni sorti WT pa v vseh točkah opazimo povečano raven izražanja. Pri odporni sorti se izražanje poveča hitreje in intenzivneje kot pri neodporni. Pri slednji je izražanje gena v steblih s časom od 6 dpi do 18 dpi utišano. Tako lahko predpostavimo, da gliva sproži utišanje ekspresije gena le v občutljivi sorti, kar pomeni da signalna pot odgovorna za odpornost v tem primeru ni represirana. Izražanje je v 6 in 12 dpi v okuženih koreninah in steblih neodporne sorte močno utišano, kar bi lahko pomenilo, da ima rastlina možnost za odziv na *V. albo-atrum* in obrambno v koreninskih vzorcih in stebelnih pri kompatibilni rekaciji. Rezultat je v skladu s poskusom pri paradižniku (Kim in sod., 2009), pri katerem je izražanje gena utišano.

Diferencialno povečano izražanje je Javornik-Cregeen (2010) identificirala v stebelnih vzorcih okužene hmeljne sorte Celeia, v časovni točki 10 in 20 dpi. V našem primeru občutljiva sorta Celeia ni kazala povečanega izražanja po okužbi, ampak je bilo povečano izražanje zabeleženo pri sorti WT v stebelnih vzorcih.

4.6.3 E3 ubikvitin proteinska ligaza

Zaporedje transkripta HO059122 kaže največjo podobnost s proteinom za domnevno E3 ubikvitin proteinsko ligazo (E3 ubiquitin protein ligase HECT type; XP_010088436). Transkript je s tem proteinom v poravnavi kazal 97 % identičnost. Obstoj tega zaporedja smo potrdili tudi v genomu hmelja (Natsume in sod., 2015) in sicer je bila identificirana podobnost z enim zaporedjem (> 95 %). Proteini, ki na C-terminalnem koncu vsebujejo ubikvitinsko proteinsko ligazo so udeleženi v regulaciji ubikvitinacije CDC25, oziroma označevanju proteinov za razgradnjo znotrajceličnih proteinov. Encim v končni fazi ligira eno ali več molekul ubikvitina na tarčni protein (Vierstra, 2009). Sledi degradacija tarčnega proteina na proteosomu. Protein je udeležen v proces represije endoreduplikacije v celični morfogenezi trihomov (Huibregtse in sod., 1995), kakor tudi mnogi drugi encimi udeleženi v ubikvitinacijo (Dhawan, 2009; Ewan in sod., 2011; Marino in sod., 2012).



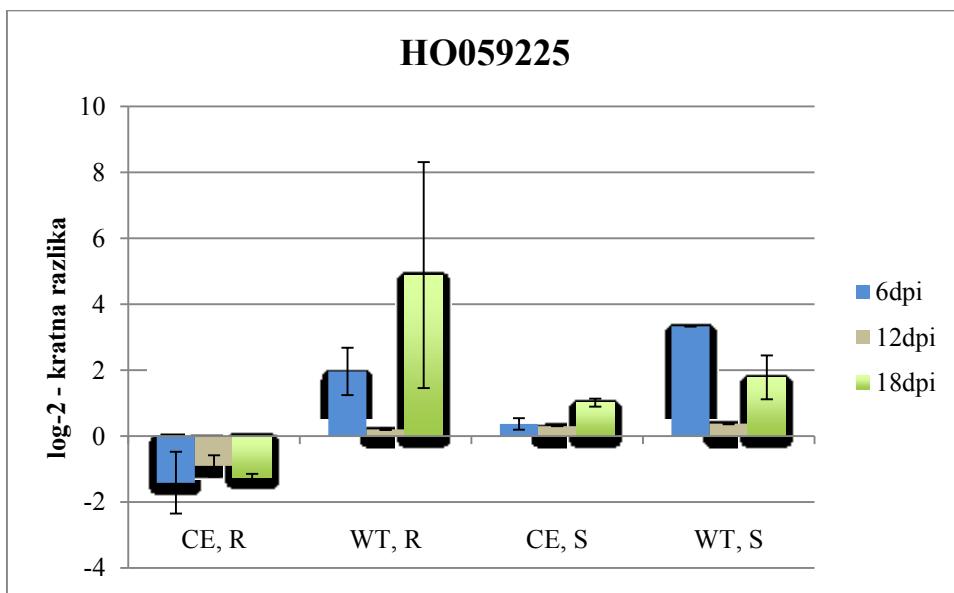
Slika 14: Prikaz diferencialno izraženega zaporedja HO059122 v primerjavi med neokuženo in okuženo rastlino hmelja pri sorti Celeia (CE) in Wye Target (WT) v časovnih točkah 6, 12 in 18 dpi v koreninah (R) in steblih (S)

Izražanje tarčnega gena HO059122, ki kodira E3 ubikvitin proteinsko ligazo je v koreninah pri CE najvišje v drugi časovni točki, torej takrat ko je kolonizacija v koreninah največja, medtem ko je odziv pri WT bolj zgoden, že v prvi časovni točki. V stebelnih vzorcih je trend izražanja med kultivarjem podoben, le da je izražanje pri odporni sorti v primerjavi z občutljivo bolj intenzivno že v prvi časovni točki.

Diferencialno povečano izražanje je Javornik-Cregeen (2010) identificirala pri stebelnih vzorcih neokužene hmeljne sorte Celeia v časovni točki 20 dpi, okužene sorte Wye Target v časovnih točkah 20 in 30 dpi ter neokužene sorte Wye Target v časovnih točkah 20 in 30 dpi. Takšen trend izražanja delno sovpada z našim poskusom, le da je bil odziv rastline v našem poskusu hitrejši, kar je lahko posledica različno hitre kolonizacije glive v posameznih rastlinah obeh poskusov. Evan in sod. (2011) so nakazali na negativno regulacijo hipersenzitivnega odziva pri rastlinah, kar delno pojasni zmanjšano izražanje gena v koreninah odporne in neodporne sorte hmelja po 6 dpi v Celei ter 18 dpi pri obeh sortah hmelja. Ubikvitinacija je vpletena v mnogo celičnih procesov, tudi v rastlinske obrambne odzive (Furlan in sod., 2012), kjer je pomembna predvsem v rastlinski hormonalni signalizaciji (Santner in sod., 2009) in v akumulaciji receptorjev tipa nukleotid-veznih z leucinom bogatih ponovitev (Cheng in sod., 2011).

4.6.4 Z glicini bogat RNA vezni protein

Zaporedje transkripta HO059225 kaže največjo podobnost s proteinom za domnevno z glicini bogat RNA vezni protein (GRP) (Glycine-rich RNA-binding protein; XP_002305429). Transkript je s tem proteinom v poravnavi kazal 90 % identičnost. Obstoj tega zaporedja smo potrdili tudi v genomu hmelja (Natsume in sod., 2015) in sicer je bila identificirana podobnost z enim zaporedjem ($> 95 \%$). Zanj je značilna prisotnosti z glicinom bogate domene ((Gly)n-X ponovitve) in je poznan že več kot 20 let zaradi svoje specifične ekspresije pod vplivom določenih biotskih in abiotiskih dejavnikov (Mangeon in sod., 2010). Protein ima vlogo v prepisovanju RNA ter procesiranju tekom stresa. Veže RNA in DNA, preferenčno enoverižne molekule ter je udeležen v alternativni izrez mnogih tarčnih molekul. Udeležen je tudi pri odgovoru na biotski stres v prirojeni imunosti. V določen razred se ti proteini delijo glede na specifične motive, ekspresijske vzorce, modulacije in subcelične lokalizacije. Razred IV GRP je poznан pod imenom RNA-vezni GRP. Poleg z glicinom bogate regije lahko vsebuje še RNA-prepoznavni motiv (RRM) ali cold-shock domeno (CSD). Poleg tega v strukturi občasno vsebujejo CCHC cinkove prste. Na podlagi raznolike domenske sestave, je razred IV GRP razdeljen v IVa (vsebuje en RRM motiv poleg z glicinom bogate domene), IVb (vsebuje eno RRM in CCHC cinkov prst), IVc (vsebuje cold-shock domeno ter dva ali več cinkovih prstov) ter IVd (vsebuje dve RRM). Protein, ki vsebuje RNA prepoznavni motiv in se veže z RNA molekulami ima zato tudi obrambno vlogo proti rastlinskim patogenom (primer *Arabidopsis thaliana* in *Pseudomonas syringae*) (Mangeon in sod., 2010).



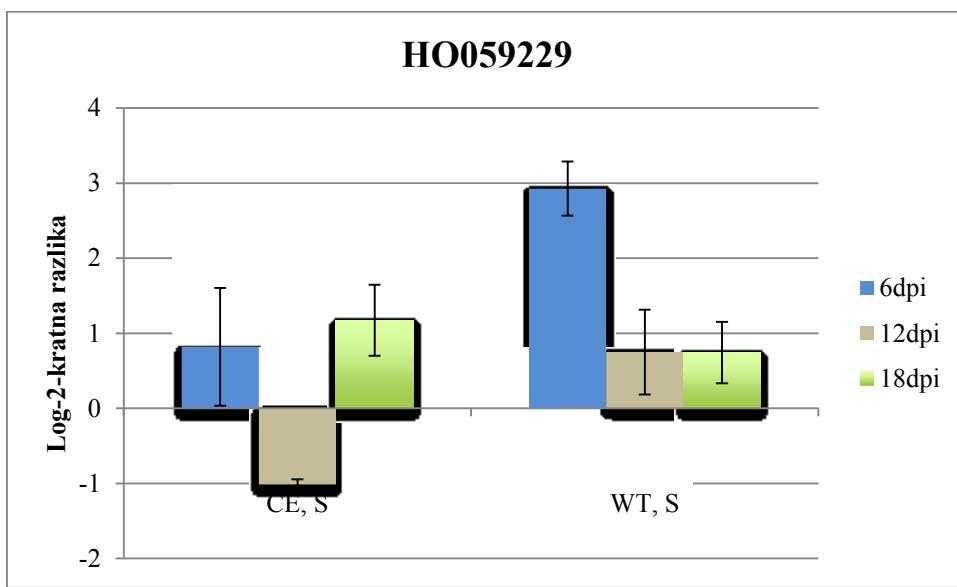
Slika 15: Prikaz diferencialno izraženega zaporedja HO059225 v primerjavi med neokuženo in okuženo rastlino hmelja pri sorti Celeia (CE) in Wye Target (WT) v časovnih točkah 6, 12 in 18 dpi v koreninah (R) in steblih (S)

Relativna količina transkripta HO059225, ki kodira z glicini bogat RNA vezni protein je bila v koreninskih vzorcih sorte Celeia negativno izražena glede na kontrolne rastline, pri odporni sorti WT pa ima gen povečano izražanje predvsem v 3. časovni točki. V stebelnih vzorcih je raven izražanja pri obeh sortah povečana, le da je izražanje pri odporni sorti že v prvi točki po okuževanju znatno večje kot pri občutljivi sorti. V obeh organih gre torej za večji in hitrejši odziv odporne sorte. Izražanje gena v neodporni sorti v steblih do 18 dpi ni znatno povečano. Relativno visok standardni odklon v koreninah sorte Wye Target v časovni točki 18 dpi je odraz visoke variabilnosti pri glivni kolonizaciji. Tako smo preverili ter povezali posamezni vzorec kolonizacije z izražanjem zaporedja v istih vzorcih. Najvišja relativna količina glivesovpa z močnim izražanjem gena in obratno.

Diferencialno povečano izražanje je Javornik-Cregeen (2010) identificirala v stebelnih vzorcih neokužene hmeljne sorte Wye Target, v časovni točki 10 dpi. Takšen rezultat ne sovpada z našimi rezultati, saj je bilo povečano izražanje gena zabeleženo v okuženih vzorcih stebel WT, v začetni fazi kolonizacije. Različno raven izražanja gena v koreninah in steblih lahko povežemo z njegovo vlogo, saj se je protein specifično za različne patogene izkazal tako za negativnega, kot pozitivnega regulatorja obrambnih mehanizmov (Lee in sod., 2012).

4.6.5 Protein 40, ki vsebuje ccch domeno cinkovega prsta

Zaporedje transkripta HO059229 kaže največjo podobnost z proteinom 40, ki vsebuje ccch domeno cinkovega prsta (Zinc finger ccch domain-containing protein 40-like; XP_010110891). Transkript je s tem proteinom v poravnavi kazal 90 % identičnost. Obstoj tega zaporedja smo potrdili tudi v genomu hmelja (Natsume in sod., 2015) in sicer je bila identificirana podobnost z enim zaporedjem (> 95 %). Mnogo sorodnih proteinov je bilo identificiranih v večih rastlinskih vrstah. Rastlinski protein se najpogosteje pojavlja v obliki, ki vsebuje posebno domeno, ki vsebuje z argininom bogat motiv (RR motiv). Poznano je, da RR motiv proteina lokalno veže procesno telo in stresne granule (dva nova citoplazemska agregata - sporočilni ribonukleoproteinski kompleksi), ki imajo kritično vlogo pri rasti rastline, razvoju in odgovoru na stres preko regulacije RNA molekul (Bogamuwa in Jang, 2014).



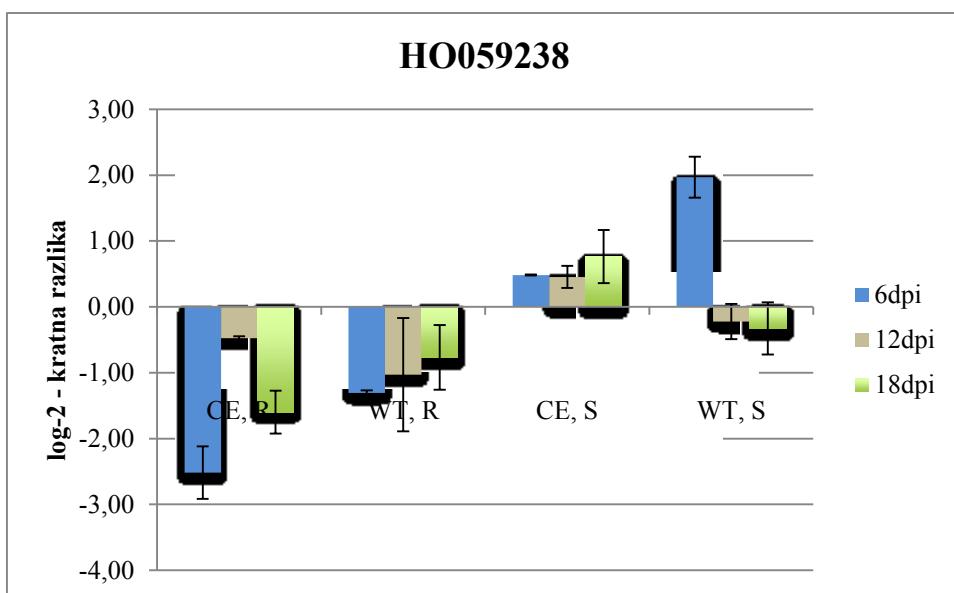
Slika 16: Prikaz diferencialno izraženega zaporedja HO059229 v primerjavi med neokuženo in okuženo rastlino hmelja pri sorti Celeia (CE) in Wye Target (WT) v časovnih točkah 6, 12 in 18 dpi v koreninah (R) in steblih (S)

Izražanje tega gena smo testirali le v stebelnih vzorcih, saj koreninskih vzorcev nismo analizirali zaradi prenizke učinkovitosti pomnoževanja (glej preglednico 8). Pri stebelnih vzorcih je izražanje gena po okužbi relativno povečano, razen pri kompatibilni reakciji v časovni točki 12 dpi, kjer je zabeleženo zmanjšanje izražanja pri okuženih vzorcih. Izrazitejši odziv sorte WT vidimo v 6 dpi, kjer je ekspresija v okuženih vzorcih znatno večja kot v neokuženih in kar 3,6-krat večja kot pri sorti Celeia. Izražanje v steblu je v tem primeru konstitutivno, ter nakazuje različen odgovor stebelnih vzorcev na patogenezo pri analiziranih sortah.

Diferencialno povečano izražanje je Javornik-Cregeen (2010) identificirala pri stebelnih vzorcih okužene hmeljne sorte Wye Target, v časovni točki 10 dpi. Takšen rezultat se ujema z rezultati pri sorti Wye Target v našem eksperimentu. Tudi nekateri ostali poskusi so prikazali pozitivno regulacijo v primeru bakterijskih bolezni (Deng in sod., 2012).

4.6.6 Cinamat-4-hidroksilaza

Zaporedje transkripta HO059238 kaže največjo podobnost s proteinom za domnevno cinamat-4-hidroksilazo (Cinnamate 4-hydroxylase, ACM69364). Transkript je s tem proteinom v poravnavi kazal 100 % identičnost. Obstoj tega zaporedja smo potrdili tudi v genomu hmelja (Natsume in sod., 2015) in sicer je bila identificirana podobnost z enim zaporedjem ($> 95\%$). Encim spada v družino oksidoreduktaz, kot parni donor s kisikom (O_2) kot oksidant, ki vključi kisik ali pa reducira kisik in je odgovoren za prvo encimsko pretvorbo v Cyt P450-odvisni monoooksigenazni fenilpropanoidni poti. Povečano izražanje gena je bilo opaženo v *Arabidopsis thaliana*. Protein se je akumuliral ob prisotnosti svetlobe. Izražanje je povečano v določenih tkivih, še posebej v koreninah, ki so v procesu lignifikacije. Prav tako se gen močneje izraža v ranitvenem tkivu (Bell-Lelong in sod., 1997). Protein zavira kopiranje SA in ga je mogoče utišati s pomočjo inhibitorjev. Če je izražanje v koreninah utišano, to potencialno pripelje do kopiranja SA in indukcije prirojene imunosti (Schöch in sod., 2002).



Slika 17: Prikaz diferencialno izraženega zaporedja HO059238 v primerjavi med neokuženo in okuženo rastlino hmelja pri sorti Celeia (CE) in Wye Target (WT) v časovnih točkah 6, 12 in 18 dpi v koreninah (R) in steblih (S)

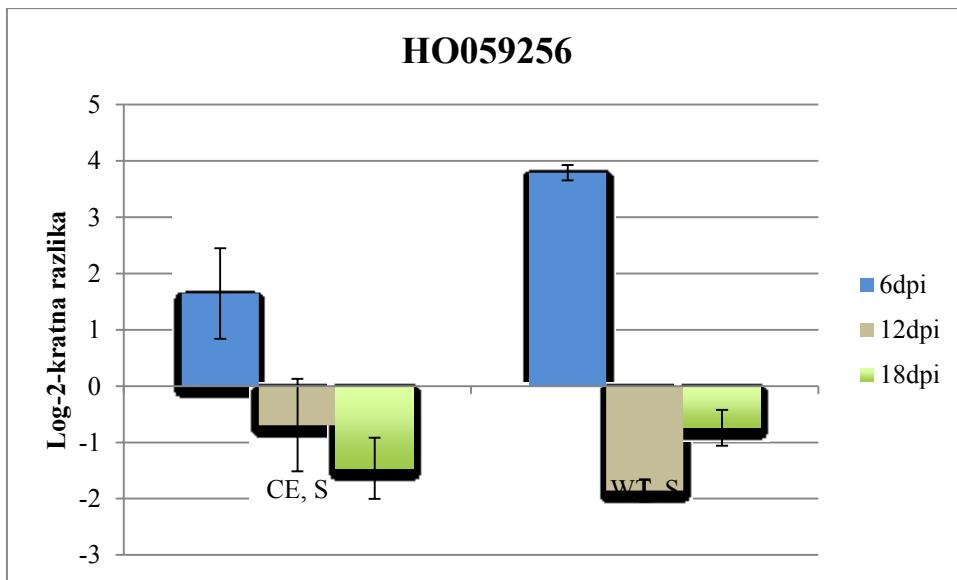
Relativna količina transkripta je bila v koreninskih vzorcih hmelja v 6 dpi izrazito nizka, nizka v primerjavi s kontrolnimi rastlinami predvsem pri občutljivi sorti. Interpretiramo, da je zaradi prisotnosti patogene glive prišlo do utišanja izražanja gena že v zgodnji fazi kolonizacije. V stebelnih vzorcih pa je izražanje gena po okužbi pozitivno že v točki 6 dpi, vendar je pri odporni sorti ekspresija kar 3-krat večja kot pri neodporni sorti. Odgovor sorte Celeia je v steblih podoben konstitutivnemu izražanju (kompatibilna reakcija),

medtem ko inkompatibilna rekacija nakazuje specifičen, hiter in izrazit odgovor na okužbo.

Diferencialno povečano izražanje je Javornik-Cregeen (2010) identificirala pri stebelnih vzorcih okužene sorte Celeia, v časovni točki 20 dpi. Takšen rezultat sovpada tudi z našim rezultatom, saj smo v točki 18 dpi dobili 3-krat višje izražanje pri Celei kot pri sorti Wye Target, ni pa bilo v predhodni raziskavi potrjeno diferencialno izražanje v koreninah kultivarja CE in steblih kultivarja WT .

4.6.7 Proteinska fosfataza GPCR

Zaporedje transkripta HO059256 kaže največjo podobnost s proteinom za proteinsko fosfatazo GPCR (G protein-coupled receptor-like protein; XP_008348578). Transkript je s tem proteinom v poravnati kazal 92 % identičnost. Obstoj tega zaporedja smo potrdili tudi v genomu hmelja (Natsume in sod., 2015) in sicer je bila identificirana podobnost z enim zaporedjem ($> 95 \%$). G-protein-coupled receptor-like protein spada v eno izmed največjih družin proteinov pri človeku in živalih, vendar pa so manj številčni pri ostalih organizmih (Kulkarni in sod., 2005). Vprašanje ali GPCR-ji obstajajo pri rastlinah je bilo temeljno biološko vprašanje, zaradi njihove pomembnosti v celični signalizaciji. V rastlinah so odkrili 56 GPCR proteinov (Taddese in sod., 2014). Zaradi njihove vloge v signalizaciji je možno, da imajo vlogo tudi v imunskem odgovoru na okužbo z glivo.



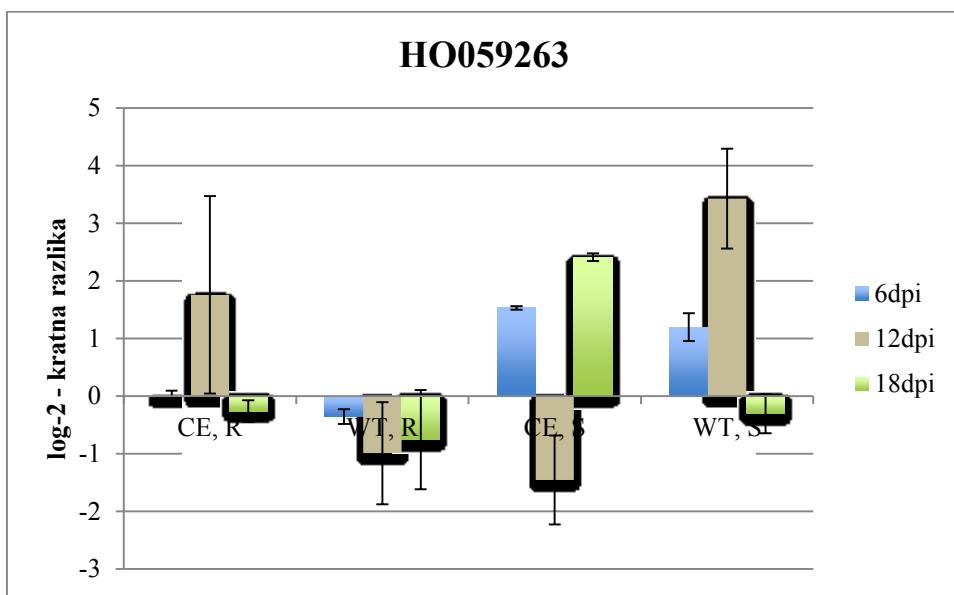
Slika 18: Prikaz diferencialno izraženega zaporedja HO059256 v primerjavi med neokuženo in okuženo rastlino hmelja pri sorti Celeia (CE) in Wye Target (WT) v časovnih točkah 6, 12 in 18 dpi v steblih (S)

Izražanje tega gena smo testirali le v stebelnih vzorcih, saj koreninskih vzorcev nismo analizirali zaradi prenizke učinkovitosti pomnoževanja (glej preglednico 8). Relativna količina transkripta gena HO059256, ki kodira proteinsko fosfatazo GPCR, je bila po prvi meritvi (6 dpi) v stebelnih vzorcih občutljive sorte povečana ter je v sledečih točkah (12 dpi in 18 dpi) znatno upadla, kar nakazuje na zgodnji odgovor rastline in močnejšo reakcijo v zgodnjih časovnih točkah, predvsem pri odporni sorti, kjer je izražanje tega gena skoraj 4x večje v primerjavi z neokuženim vzorcem in 4,4-krat večje v primerjavi z okuženo Celeio v isti točki. Pri sorti Wye Target je prišlo do intenzivnejšega odziva v 6 dpi, ki pa je bil v nadaljnjih točkah utišan.

Diferencialno povečano izražanje je Javornik-Cregeen (2010) identificirala pri stebelnih vzorcih neokužene hmeljne sorte Celeia, v časovni točki 30 dpi. Naši rezultati se delno ujemajo z omenjenimi rezultati, saj je bilo izražanje v neokuženi sorti Celeia povečano v primerjavi z okuženo. Trend izražanja kaže, da bi bilo v 30 dpi lahko izražanje še bolj povečano, vendar ta časovna točka ni bila analizirana v našem poskušu.

4.6.8 Cikloartenol sintaza

Zaporedje transkripta HO059263 kaže največjo podobnost s proteinom za cikloartenol sintazo (Cycloartenol synthase, XP_002264289). Transkript je s tem proteinom v poravnavi kazal 82 % identičnost. Obstoj tega zaporedja smo potrdili tudi v genomu hmelja (Natsume in sod., 2015) in sicer je bila identificirana podobnost z enim zaporedjem (> 95 %). Njegova vloga je pretvorba oksidoskvalena v cikloartenol in parkeol. Protein je pomemben pri biogenezi plastidov in funkcioniranju moškega gametofita ter je udeležen pri biosintezi sterolov, ki imajo v rastlinah obrambno vlogo (Zhu in sod., 2012). Fitosteroli imajo vlogo strukturne komponente membranskih sistemov rastlin, triterpenoidi pa so pogosto udeleženi kot komponenta rastlinske obrambe pred patogenimi mikroorganizmi (Zhu in sod., 2012).



Slika 19: Prikaz diferencialno izraženega zaporedja HO059263 v primerjavi med neokuženo in okuženo rastlino hmelja pri sorti Celeia (CE) in Wye Target (WT) v časovnih točkah 6, 12 in 18 dpi v koreninah (R) in steblih (S)

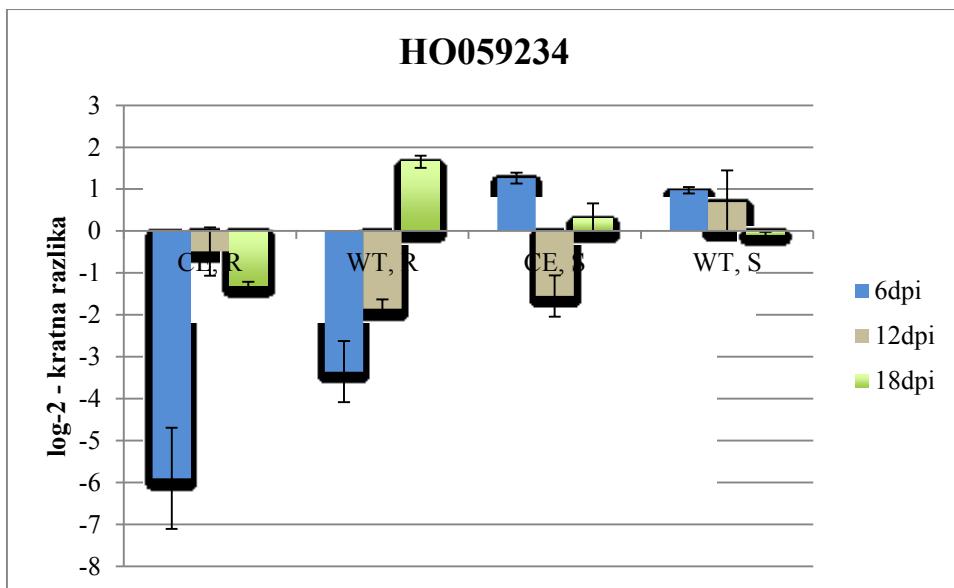
Genski transkript HO059263 je ob začetnem merjenju (6 dpi) kazal relativno povečano regulacijo in izražanje v steblih obeh sort hmelja. V časovni točki 12 dpi se relativna količina tarčnega transkripta poveča v vzorcih sorte Wye Target, v sorti Celeia pa pride do utišanja. Rezultat kaže na intenzivnejši odgovor odporne sorte hmelja v 12 dpi v steblih, pri neodporni pa se pojavi ciklični odziv na glivo, z vrhom v 18 dpi. Rezultat nakazuje, da gre za nekustitutivno izražene odpornostne gene, ki se specifično intenzivneje izrazijo ob prisotnosti patogena. Učinkovitost pomnoževanja je bila pri koreninah relativno nizka, kar nakazuje na inhibicijo v koreninah (glej preglednico 8). Velika variabilnost med biološkimi ponovitvami predvsem pri CE, v 12 dpi, je posledica variabilne kolonizacije v bioloških ponovitvah. Zaradi velike variabilnosti pri posameznih obravnavanjih težko opredelimo trend izražanja analiziranega gena.

Diferencialno povečano izražanje je Javornik-Cregeen (2010) identificirala pri stebelnih vzorcih neokužene hmeljne sorte Celeia v časovni točki 20 dpi, kar se delno ujema z našimi vzorci, ko je bilo izražanje v neokuženem kultivarju občutljive sorte povečano že v 12 dpi, kar je lahko posledica razlike kolonizacije v rastlinah.

4.6.9 Giberelinski receptor gid1

Zaporedje transkripta HO059234 kaže največjo podobnost s proteinom za giberelinski receptor (Gibberellin receptor gid1; XP_003627647). Transkript je s tem proteinom v poravnavi kazal 62 % identičnost. Specifičnost zaporedja smo potrdili tudi v genomu

hmelja (Natsume in sod., 2015) in sicer je bila identificirana podobnost z enim zaporedjem ($> 95\%$). GID1 deluje kot topen giberelinski receptor. Giberelin se na receptor veže z visoko afiniteto v biološko aktivnih oblikah (GA1, GA3 in GA4) ter se nanj ne veže, kadar je v biološko inaktivirani obliki. GA regulira rast in razvoj rastline. Zmanjšana koncentracija GA v celici znižuje občutljivost na stres, signalizacija preko GA pa je povezana z odzivom na biotski in abiotski stres (Colebrook in sod., 2014).



Slika 20: Prikaz diferencialno izraženega zaporedja HO059234 v primerjavi med neokuženo in okuženo rastlino hmelja pri sorti Celeia (CE) in Wye Target (WT) v časovnih točkah 6, 12 in 18 dpi v koreninah (R) in steblih (S)

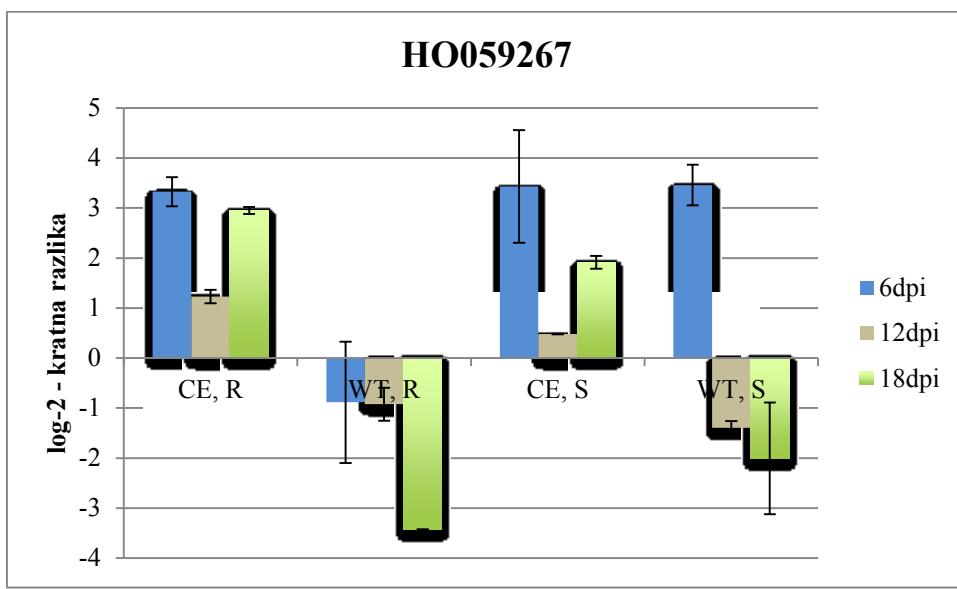
Relativna količina transkripta gena HO059234 je bila v koreninskih vzorcih obeh sort relativno zmanjšana, najmočneje v 6 dpi, in sicer je utišanje izrazito v občutljivi sorte, kar 6-kratno v primerjavi z neokuženimi vzorci. Nekoliko drugačen je odziv odporne sorte, saj je izražanje v koreninah v 18 dpi povečano. Izražanje genov v stebelnih vzorcih obeh sort je relativno povečano v 6 dpi ter nato upade, izrazito pri kompatibilni interakciji.

Diferencialno povečano izražanje je Javornik-Cregeen (2010) identificirala pri stebelnih vzorcih neokužene hmeljne sorte Celeia, v časovni točki 10 dpi. Takšen rezultat se deloma sklada z našimi rezultati, ko smo dobili povečano izražanje gena v prvi časovni točki pri Celei. Z GA tretirane rastline so v preteklosti že pokazale drugačno defenzivno obnašanje, v primerjavi z netretiranimi. GA metabolna pot je udeležena le v nekatere, specifične obrambne odgovore (Fabisch, 2013). Specifična obramba je pogojena z razvojem bolezni. Pojavnost sprememb hormonalne homeostaze korelira z vsesplošno zmanjšano prirojeno imunostjo. Navarro in sod. (2008) navajajo, da se je v primeru zmanjšanja zaznave giberelinov glivna biomasa v koreninah znižala, bazalna obrambna aktivnost pa povečala, ob povečanju izražanja specifičnih PR proteinov v *Alternaria brassicola*. Takšna razlaga

predvideva direktno povezavo med GA signalizacijo in SA/JA specifičnim odzivom (Navarro in sod., 2008; Schäfer in sod., 2009). GA deluje kot pozitivni regulator obrambnega odziva rastline. Za takšnega se je izkazal pri interakciji riža z nekrotrofno patogeno glivo *P. graminicola* (De Vleesschauwer in sod., 2012). Tako se je v nasprotju z repnjakovcem, ječmenom in pšenico, pri rižu uveljavil GA kot promotor odpornosti na nekrotrofne glive (De Bruyne in sod., 2014). Iz študij je razvidno, da je v regulaciji in obrambni vlogi GA še veliko dvomov, kako rastlina odreagira v prisotnosti patogena, saj se rastlina na povečano koncentracijo GA odzove z razvojem bolezenskih simptomov, spet drugič pa sproži obrambne mehanizme ter prepreči razvoj bolezni. GA lahko sproži več odzivov, ki niso odvisni le od rastlinske vrste in vrste patogena, temveč tudi od specifičnih lastnosti posamezne interakcije.

4.6.10 Feronija receptor podobna kinaza

Zaporedje transkripta HO059267 kaže največjo podobnost s proteinom za domnevno feroniji receptor podobno kinazo (Feronia receptor-like kinase; XP_010099327). Transkript je s tem proteinom v poravnavi kazal 60 % identičnost. Obstoj tega zaporedja smo potrdili tudi v genomu hmelja (Natsume in sod., 2015) in sicer je bila identificirana podobnost z enim zaporedjem ($> 95\%$). Gen posreduje in kontrolira moške gamete pri rasti preko pelodne cevke in funkcijo razvoja korenin. Prav tako je gen odgovoren za posredovanje in regulacijo občutljivosti na patogene (hmeljeva pepelovka). Feronia receptor like kinaza represira abscizinsko kislino in promovira rast, ter zavira penetracijo hmeljeve pepelovke v gostiteljsko celico. Regulacija poteka preko lokalizacije proteinov, po podobnem principu kot poteka lokalizacija pri rasti pelodne cevke pri oploditvi. Feronia receptor-like kinase torej igra pomembno vlogo pri odpornosti na patogene organizme, ob tem pa izvaja signalizacijo s pomočjo kontroliranja proizvajanja ROS (Greeff in sod., 2012).



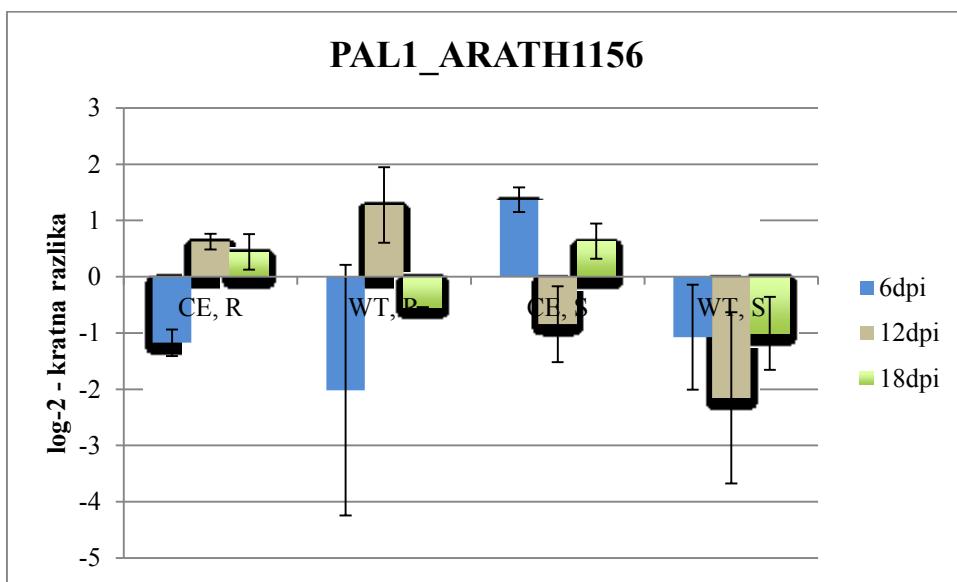
Slika 21: Prikaz diferencialno izraženega zaporedja HO059267 v primerjavi med neokuženo in okuženo rastlino hmelja pri sorti Celeia (CE) in Wye Target (WT) v časovnih točkah 6, 12 in 18 dpi v koreninah (R) in steblih (S)

V koreninskih vzorcih hmelja sorte Celeia je opaziti trend povečanja relativne količine genskega transkripta v primerjavi z neokuženimi rastlinami v vseh časovnih točkah. Sorta Wye Target se v koreninskih vzorcih odzove z utišanjem gena v vseh treh časovnih točkah. V vzorcih stebel v časovni točki 6 dpi je do 3,5-krat povečano izražanje pri obeh sortah v primerjavi z neokuženimi vzorci. Pri odporni sorti Wye Target je prišlo do utišanja gena po 12 dpi, ekspresija pa je ostala povečana pri okuženih vzorcih neodporne sorte. Učinkovitost pomnoževanja pri koreninah je bila relativno nizka, kar nakazuje na možno inhibicijo v koreninah (glej preglednico 8).

Diferencialno povečano izražanje je Javornik-Cregeen (2010) identificirala pri stebelnih vzorcih neokužene hmeljne sorte Wye Target, v časovni točki 20 dpi. Rezultat lahko potrdimo pri naših vzorcih, ko je bilo izražanje tarčnega gena okužene rastline Wye Target v časovni točki 18 dpi nižje kot v neokuženih rastlinah. Protein feronia receptorju podobna kinaza ima vlogo v celični signalizaciji preko nadzorovanja proizvodnje ROS, po zaznavi PAMP (Greeff in sod., 2012) in deluje kot površinski regulator celice za specifična molekuarna stikala celice, preko katerih aktivira proizvodnjo ROS. Slednji so aktivatorji za vrsto specifičnih in nespecifičnih celičnih procesov, tudi obrambnega odziva (Cheung in Wu, 2011). Upoštevajoč obrambno vlogo tarčnega proteina, je ob okužbi hmelja, povečano izražanje v prvi časovni točki (6 dpi) pričakovano.

4.6.11 PAL1_ARATH

Zaporedje transkripta PAL1_ARATH kaže največjo podobnost s proteinom za domnevno fenilalanin amonijevo liao 1 (AEE81750). Transkript je s tem proteinom v poravnavi kazal 89 % identičnost. Obstoj tega zaporedja smo potrdili tudi v genomu hmelja (Natsume in sod., 2015) in sicer je bila identificirana podobnost z enim zaporedjem ($> 95\%$). Protein se nahaja v citoplazmi rastlinske celice in je odgovoren za obrambni odgovor na oksidativni stres in poškodbe tkiva. Ima vlogo ključnega encima rastlinskega metabolizma, ko gre za katalizo prve reakcije biosinteze širokega spektra naravnih produktov iz L-fenilalanina, kateri so sestavljeni iz ogrodja te aminokisline (fenilpropanoidi) (Wanner in sod., 1995).



Slika 22: Prikaz diferencialno izraženega zaporedja PAL1 ARATH v primerjavi med neokuženo in okuženo rastlino hmelja pri sorti Celeia (CE) in Wye Target (WT) v časovnih točkah 6, 12 in 18 dpi v koreninah (R) in steblih (S)

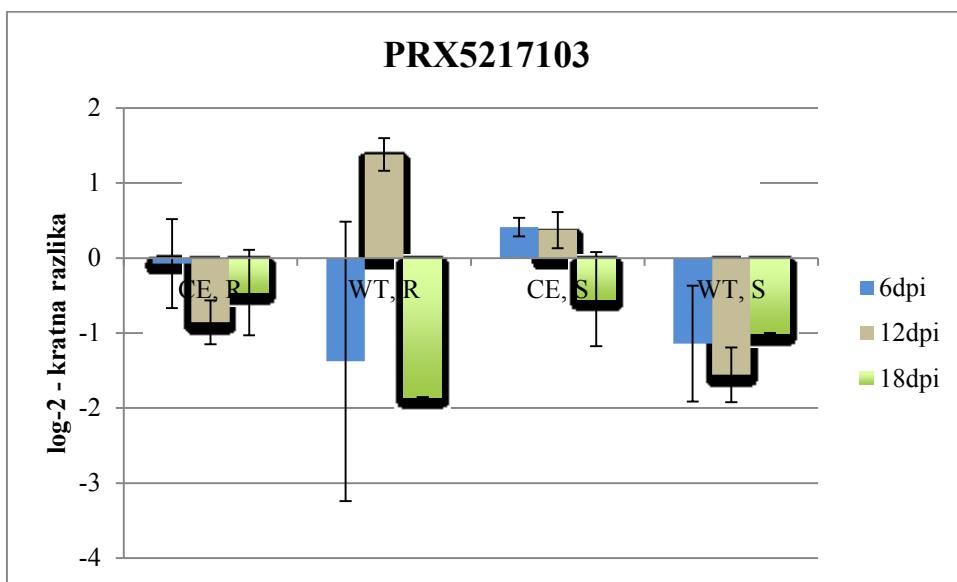
V koreninskih vzorcih, v časovni točki 6 dpi obeh sort smo izmerili nižjo relativno količino transkripta PAL1_ARATH v primerjavi z neokuženimi vzorci. Do povečane ekspresije je prišlo šele v časovni točki 12 dpi. Izražanje gena v stebelnih vzorcih je relativno povečano, v kompatibilni reakciji ter zmanjšano v inkompatibilni interakciji v 6 dpi. Sledi ciklični odziv pri neodporni sorti (Celeia) ter konstitutivno zmanjšano izražanje pri odporni sorti (Wye Target).

Geni kot je *PAL1* so presežno izraženi v neodpornih rastlinah. Gen za encim PAL je udeležen v sintezi suberina in lignina. Gen ni vpletен samo v biosintezo, temveč tudi v signalizacijo kot poglavitni regulatorni encim sinteze SA ter s tem sistemsko pridobljene odpornosti (SAR) (Fradin in Thomma, 2006). Slednje pojasni povečano izražanje gena za

PAL v točki 6 dpi v steblih občutljivega kultivarja hmelja. Vloga v odporni sorti ni bila potrjena, saj se kaže utišanje genov po okužbi ali pa izražanje ni spremenjeno. V paradižniku, je odpornost na glivo *V. albo-atrum* določena primarno s prisotnostjo *Ve* lokusa. V primeru, da sta se dve sorodni sorti, ki sta se razlikovali v lokusu za odpornost, primerjali, je bilo opaženo bistveno hitrejše nalaganje suberina v ksilem odporne sorte. Slednje je močno koreliralo z izražanjem gena za encim PAL, ki je osrednji v mehanizmu suberinizacije. Prav tako je bilo rahlo zmanjšanje opazno pri okuženi odporni sorti, kar nakazuje na zmožnost glive, da utiša izražanje tarčnega obrambnega gena rastline (Lee in sod., 1992). Ob prisotnosti patogena je PAL gen začasno induciran, posebej v zgodnjih fazah po inokulaciji (Trevisan in sod., 1997). Navkljub vsemu je bilo izražanje v koreninah relativno nizko (Gayoso in sod., 2010). Z naštetimi eksperimenti so se naši rezultati relativno dobro ujemali, s čimer lahko potrdimo diferencialno izražanje gena PAL1, ki je povezano z odpornostjo na patogeno glivo in njeno prisotnost v neodporni sorti Celeia. Ne moramo pa reči, da smo zabeležili vse pomembne odzive, saj je bila stimulacija aktivnosti PAL pri paradižniku opažena med 1 h po inokulaciji do 144 h po inokulaciji (Xu in sod., 2011). Tako kot pri Xu in sod. (2011), se je pri nas pojavila visoka biološka variabilnost, ki jo pripisujemo poznim meritvam, ko odgovor rastline ni več tako izrazit. Predvidevamo, da smo opazili le zadnji del intenzivnega bujnega odziva v steblih, pri sorti Wye Target pa smo ga zamudili.

4.6.12 Peroksidaza 52

Zaporedje transkripta PRX5217103 kaže največjo podobnost s proteinom za domnevno rastlinsko peroksidazo 52 (NP_196153). Transkript je s tem proteinom v poravnavi kazal 71 % identičnost. Obstoj tega zaporedja smo potrdili tudi v genomu hmelja (Natsume in sod., 2015) in sicer je bila identificirana podobnost z enim zaporedjem ($> 95 \%$). Peroksidaze vsebujejo heme in so kodirane z večimi paralognimi geni ter katalizirajo razgradnjo oziroma redukcijo vodikovega peroksida (H_2O_2) s prenosom elektronov iz različnih donorskih molekul (lignin, fenolne spojine ali sekundarni metaboliti). Rezultat tega je povečana koncentracija reaktivnih kisikovih zvrsti in celične elongacije. PRX52 gen kodira prekurzorski protein za ostale peroksidaze (Passardi in sod., 2004).



Slika 23: Prikaz diferencialno izraženega zaporedja PRX5217103 v primerjavi med neokuženo in okuženo rastlino hmelja pri sorti Celeia (CE) in Wye Target (WT) v časovnih točkah 6, 12 in 18 dpi v koreninah (R) in steblih (S)

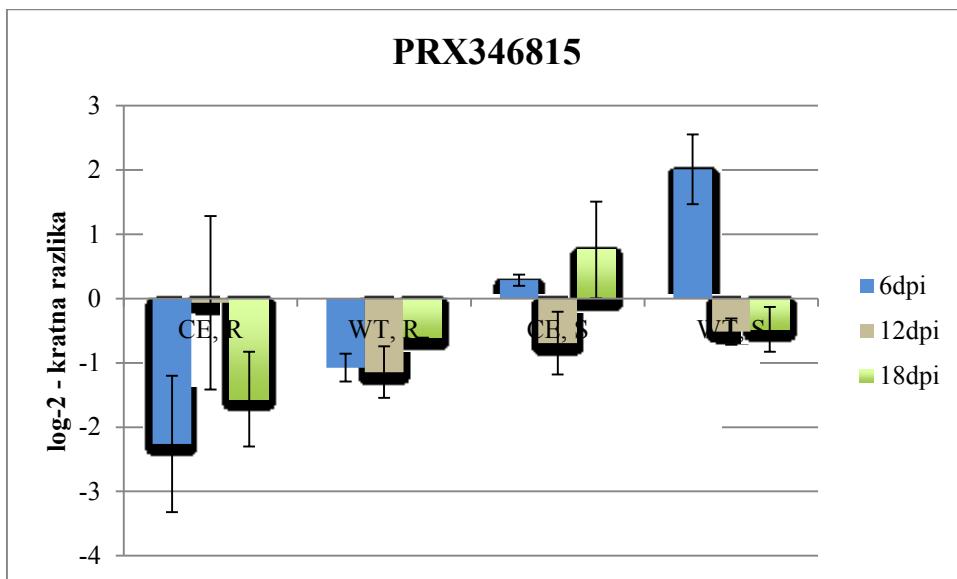
Relativna količina transkripta peroksidazo 52 je bila povečana le v 12 dpi pri odporni sorti, medtem ko je bilo izražanje v tej časovni točki občutljive sorte utišano v primerjavi z neokuženo sorto. V stebelnih vzorcih je bilo izražanje neznatno povečano v 6 in 12 dpi pri sorti Celeia, medtem ko je sorta Wye Target tekom eksperimenta izkazala konstantno negativno izražanje. Velika variabilnost med biološkimi ponovitvami predvsem pri WT, je posledica variabilne kolonizacije v bioloških ponovitvah.

Rastlina se po okužbi obogati s protiglivnimi proteini. Floerl in sod. (2012) navajajo, da pri glivah rodu *Verticillium* glivni proteini povzročijo specifično povečano izražanja *PRX52* gena, ki ima vlogo v obrambi in modifikaciji celične stene. Takšen rezultat delno potrdimo s povečanim izražanjem v steblih kompatibilne interakcije in koreninah inkopatibilnostne interakcije.

4.6.13 Peroksidaza razreda III

Zaporedje transkripta PRX346815 kaže največjo podobnost s proteinom za domnevno peroksidazo razreda III (AHL39106). Transkript je s tem proteinom v poravnavi kazal 66 % identičnost. Obstoj tega zaporedja smo potrdili tudi v genomu hmelja (Natsume in sod., 2015) in sicer je bila identificirana podobnost z enim zaporedjem ($> 95\%$). Peroksidazni protein 34 je vpletен v kisikove reakcije v celici ter regulacijo reaktivnih kisikovih zvrsti v celici. Prav tako je vpletен v odgovor rastline na okužbo z glivami. V primeru, da je gen *PRX34* utišan, so rastline bolj občutljive za okužbe z virusnimi in glivnimi patogeni. Prav

tako je utišanje gena *PRX34* povezano z motnjo v obrambnem hormonskem signaliziranju, še posebej bioloških poti povezanih s SA in JA. Ob tem ne pride do motnje hipersenzitivnega odziva v primeru utišanja gena *PRX34*, vendar je izražanje gena potrebno za učinkovit obrambni odziv rastline na patogeno glivo (Mammarella, 2010).



Slika 24: Prikaz diferencialno izraženega zaporedja PRX346815 v primerjavi med neokuženo in okuženo rastlino hmelja pri sorti Celeia (CE) in Wye Target (WT) v časovnih točkah 6, 12 in 18 dpi v koreninah (R) in steblih (S)

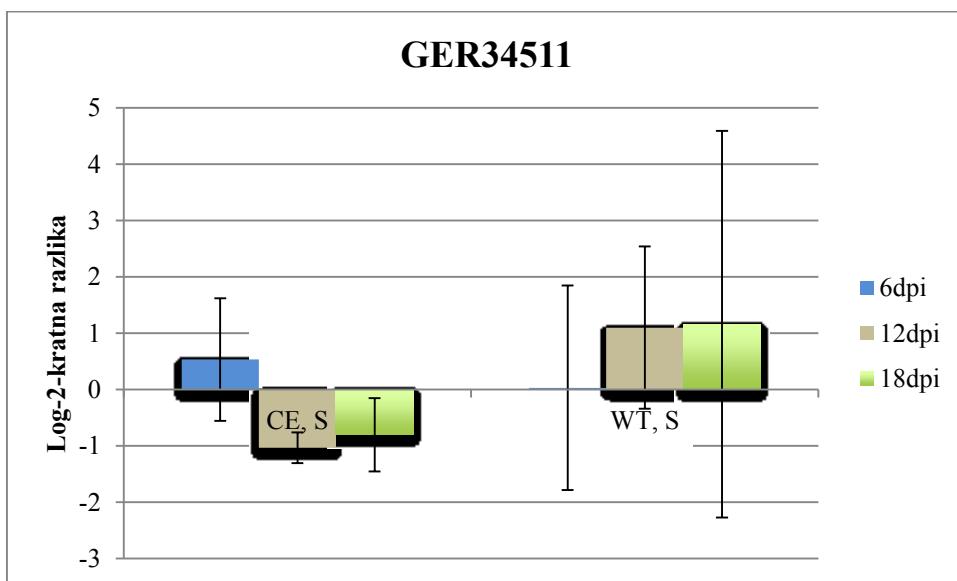
Genska domena, oziroma transkript PRX346815 se v koreninah izraža konstitutivno zmanjšano, z izjemo časovne točke 12 dpi pri občutljivi sorti Celeia, kjer pa je bila variabilnost med biološkimi ponovitvami zelo velika. Takšno izražanje sovpada z vrhom glivne kolonizacije v koreninah (glej sliko 11). V stebelnih vzorcih obeh hmeljnih sort je izražanje po 6 dpi relativno povečano, izrazitejše pri inkompabilni interakciji, ko je izražanje povečano 2-krat glede na neokužene vzorce. Izražanje pri obeh interakcijah je zmanjšano v 12 dpi ter se ponovno poveča (0,75-krat) v kompatibilni interakciji v 18 dpi.

Gen *PRX34* se je izkazal za odgovornega v procesu lignifikacije steba *A. thaliana*. Rastlina se po okužbi obogati s protiglivnimi proteini. Hmeljne celične kulture so kazale povečano peroksidacijo in izražanje peroksidaznih genov v primeru tretiranja kultur z ekstrakti *V. albo-atrum*. Podobno se pokaže pri paradižniku, kjer je aktivnost peroksidaz povečana v steblih in koreninah nekaj ur po okužbi z *V. dahliae* (Xu in sod., 2011). Peroksidaze so povezane s celično steno, kjer sprožijo oksidativni razcvet, njihovo izražanje pa se je po okužbi bistveno povečalo tudi v koreninah odporne sorte paradižnika (Gayoso, 2010). V našem primeru takšnega rezultata ne potrdimo v koreninah, v steblih pa v časovni točki 6 dpi, ko je izražanje znatno povečano predvsem v inkompabilni

interakciji. Zaradi specifične vloge lignifikacije, ki ni poglavita v obrambnem odzivu v koreninah predvidevamo, da je gen v veliki meri utišan v primeru okužbe.

4.6.14 Germin podoben protein 3

Zaporedje transkripta GER34511 kaže največjo podobnost s proteinom za germin podoben protein (XP_010051456). Transkript je s tem proteinom v poravnavi kazal 77 % identičnost. Obstoj tega zaporedja smo potrdili tudi v genomu hmelja (Natsume in sod., 2015) in sicer je bila identificirana podobnost z enim zaporedjem (> 95 %). Germin geni so odgovorni za razvoj rastline. Imajo oksalat oksidazno aktivnost, kar tvori H_2O_2 ob oksidaciji oksalata, ki je mediator in inhibitor hipersenzitivnega odgovora ter tako pripomore v razvojnih in obrambnih funkcijah, še posebej, kadar je oksalat prisoten kot toksin (Lane, 2002). Spadajo v razred razvojnih glikoproteinov vendar zelo verjetno nimajo oksidazne aktivnosti. Poglavitno vlogo imajo v zigotni in somatski embriogenezi, odpornosti na visoko slanost in težke kovine ter pri odstranjevanju patogenov (Patnaik in Khurana, 2001).



Slika 25: Prikaz diferencialno izraženega zaporedja GER34511 v primerjavi med neokuženo in okuženo rastlino hmelja pri sorti Celeia (CE) in Wye Target (WT) v časovnih točkah 6, 12 in 18 dpi v steblih (S)

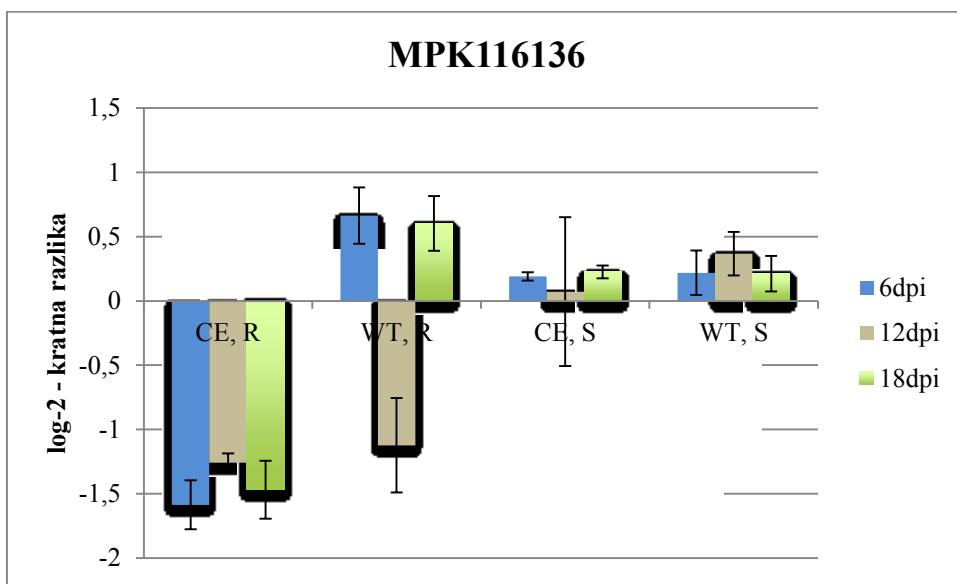
Izražanje tega gena smo testirali le v stebelnih vzorcih, saj koreninskih vzorcev nismo analizirali zaradi previsoke učinkovitosti pomnoževanja. Izražanje je po okužbi v sorti Celeia v časovni točki 6 dpi neznatno povečano v primerjavi z neokuženimi rastlinami, nato je v časovnih točkah 12 dpi in 18 dpi izražanje utišano. Pri sorti Wye Target pa je izražanje nekoliko povečano v 12 in 18 dpi. Veliko variabilnost pripisujemu v tem primeru

veliki raznolikosti bioloških oziroma kolonizacijskih profilov (slika 11) ter nespecifičnosti odgovora glede na glivno kolonizacijo.

Germin podobni proteini imajo vlogo indukcije oksidativnega razcveta, ter so v drugih vrstah (*Brassica napus*) prikazali višjo odpornost s produkcijo H₂O₂ *in vivo*. Kljub temu ni poznano ali je gen vpletен tudi v R proteini posredovano odpornost. Kakšna je posledica specifične indukcije oksidativnega razcveta, je še potrebno raziskati (Rietz in sod., 2012). Mandelc in sod. (2013) so zaznali konstitutivno povečano izražanje tarčnega proteina v odporni in občutljivi sorti hmelja. V našem primeru se je izkazal trend utišanja izražanja transkripta v steblu pri občutljivi sorti in trend povečevanja ekspresije pri odporni sorti. GER proteini so raznolika skupina proteinov, ki sodelujejo v razvojnih in obrambnih procesih rastline hmelja, njihova specifična funkcija pa ni poznana, lahko pa inducirajo mnogo razredov PR proteinov (Mandelc in sod., 2013).

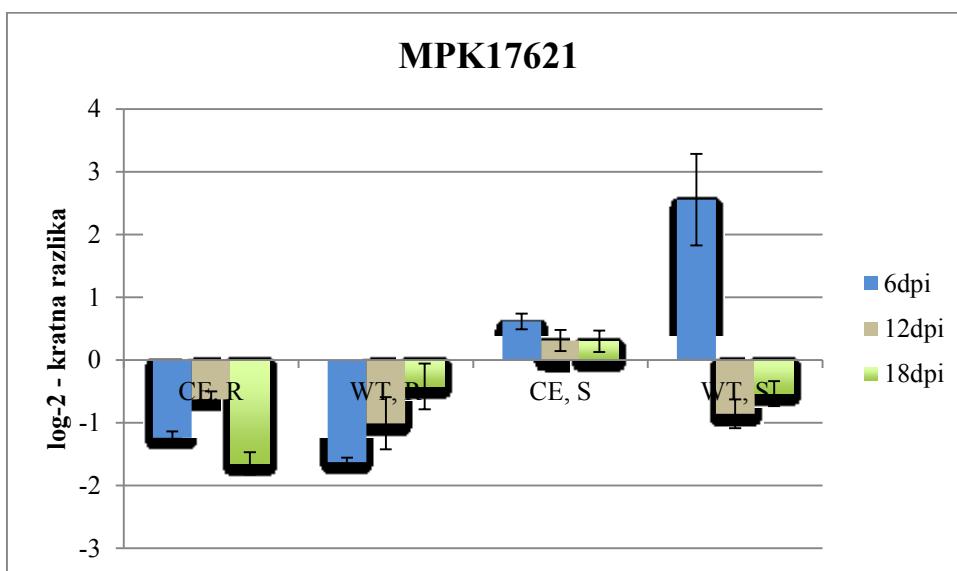
4.6.15 Z mitogenom aktivirani proteinski kinazi 1 in 2

Zaporedji transkriptov MPK116136 ter MPK17621 kažeta največjo podobnost s proteinoma za domnevni z mitogenom aktivirani proteinski kinazi 1 in 2. Transkript MPK116136 je s proteinom 1 v poravnavi kazal 88 % identičnost (XP_007017621), MPK17621 pa 85 % identičnost s proteinom 2 (gb|ABO84840.1). Obstoj teh zaporedja smo potrdili tudi v genomu hmelja (Natsume in sod., 2015) in sicer je bila identificirana podobnost vsakega od njiju z enim zaporedjem (> 95 %). *MPK 1 in 2* spadata v skupino C MAPK kinaz. Vloga gena *MPK* je bila preverjena s pomočjo izklučevanja gena in pa dviga njegovega izražanja in koncentracije proteina. Ugotovljeno je, da višja toleranca na stres korelira s povečano koncentracijo *MPK* v celici, prav tako je v tem primeru povečana koncentracija H₂O₂. V primeru izklopa gena se zmožnost uspešnega odgovora na bolezen rastline močno zmanjša (Nie in sod., 2013).



Slika 26: Prikaz diferencialno izraženega zaporedja MPK116136 v primerjavi med neokuženo in okuženo rastlino hmelja pri sorti Celeia (CE) in Wye Target (WT) v časovnih točkah 6, 12 in 18 dpi v koreninah (R) in steblih (S)

Gen za *MPK1* smo analizirali s pomočjo transkripta MPK116136. Ugotovili smo, da je gen v koreninah sorte Celeia utišan tekom celotne kolonizacije v obeh sortah. Transkript kaže povečano izražanje v steblih po 6 in 18 dpi v CE. V stebelnih vzorcih WT je izražanje povečano po okužbi z glivo v vseh treh časovnih točkah.



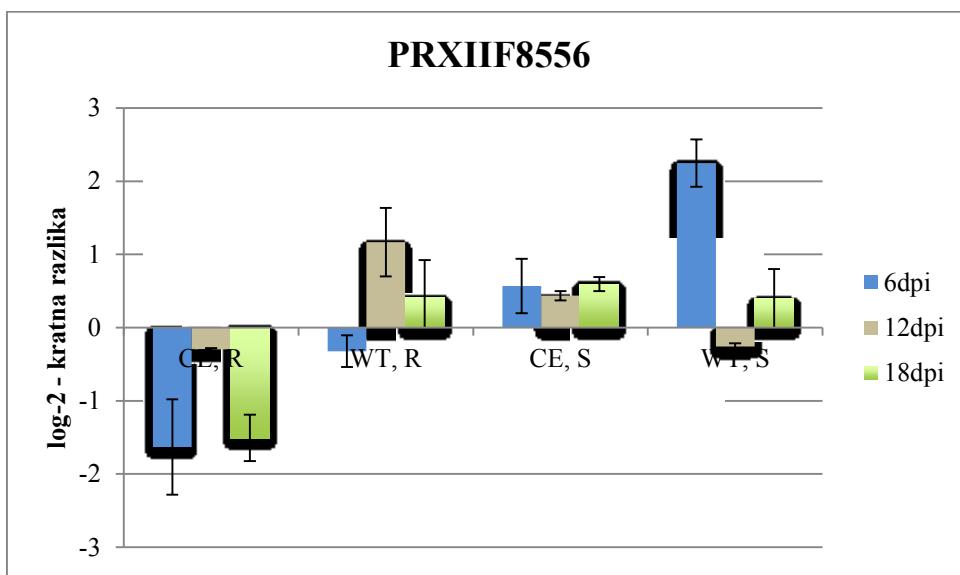
Slika 27: Prikaz diferencialno izraženega zaporedja MPK17621 v primerjavi med neokuženo in okuženo rastlino hmelja pri sorti Celeia (CE) in Wye Target (WT) v časovnih točkah 6, 12 in 18 dpi v koreninah (R) in steblih (S)

Gen za *MPK2* (transkript MPK17621) je v vseh časovnih točkah koreninskih vzorcev kazal zmanjšano izražanje po okužbi. V steblih kompatibilne interakcije je bilo izražanje povečano konstitutivno, prav tako pa v 6 dpi inkompabilne interakcije. Izražanje v steblih WT, je bilo utišano v 12 in 18 dpi.

MPK gen je aktiviran z *MKK3*, ki je aktivator mnogih *PR* genov, MAPK signalizacija pa ima pomembno vlogo v obrambnem signaliziraju in obrambnem odzivu rastline. Študija aktivacije omenjene skupine kinaz, ki so udeležene v odgovoru na mehanske poškodbe rastlinskega tkiva, je pokazala povečano aktivnost v odgovoru na ranitev, ki je bila blokirana s cikloheksimidom. JA aktivira gen *MPK*, če ni ranitve. V odsotnosti JA izražanje *MPK* aktivira ABA in H₂O₂ (Ortiz-Masia in sod., 2007). Tudi v naši študiji smo pokazali, da pride do povečanega izražanja genov *MPK 1* in *2* po okužbi hmelja z *V. albo-atrum* v časovni točki 6 dpi v steblih obeh testiranih sort. Pri *MPK 2* je veliko bolj izrazito povečano izražanje pri odporni sorti, medtem ko je v koreninah gen utišan.

4.6.16 Peroxiredoksin IIF

Zaporedje transkripta PRXIIIF8556 kaže največjo podobnost s proteinom za peroxiredoksin (XP_004296922). Transkript je s tem proteinom v poravnavi kazal 89 % identičnost. Obstoj tega zaporedja smo potrdili tudi v genomu hmelja (Natsume in sod., 2015) in sicer je bila identificirana podobnost z enim zaporedjem (> 95 %). Protein je lokaliziran v mitohondrijskem matriksu in je vpletен v redoks homeostazo. Udeležen je v funkcije razvoja, prilagajanja in bolezni, saj lahko funkcioniра antioksidativno z redukcijo širokega spektra strupenih peroksidov ter prilagaja celično redoks signalizacijo in antioksidativni metabolizem (Finkemeier in sod., 2005).



Slika 28: Prikaz diferencialno izraženega zaporedja PRXIIF8556 v primerjavi med neokuženo in okuženo rastlino hmelja pri sorti Celeia (CE) in Wye Target (WT) v časovnih točkah 6, 12 in 18 dpi v koreninah (R) in steblih (S)

Količina genskega transkripta PRXIIF8556 je v koreninskih vzorcih obeh sort hmelja kazala zmanjšanje izražanja v 6 dpi v primerjavi z neokuženimi rastlinami. Občutljiva sorta Celeia kaže zmanjšano izražanje tekom vseh točk analize, medtem ko je izražanje sorte Wye Target povečano v 12 in 18 dpi. V stebelnih vzorcih obeh sort je gen močno izražen po okužbi, izjema je časovna točka 12 dpi v inkompabilni interakciji, ko pride do utišanja, odziv sorte pa je cikličen. Odgovor stebla v časovni točki 6 dpi pri odporni sorti je mnogo bolj izrazit, kot pri neodporni.

V *A. thaliana* je bilo ob abiotskem stresu povečano izražanje proteina PRXIIF, kar jasno kaže na vlogo PRXIIF v antioksidativni obrambi rastlinskih mitohondrijev na stres. Široka (a nepopolna) paleta stresov, ki vplivajo na povečano izražanje *PRX* gena, predstavlja zanimivo korelacijo med različnimi okoljskimi spremembami in nekaterimi raziskavami genske ekspresije gena *PRX*. Mutant *A. thaliana* *PRXIIF* je izkazal povečano toleranco na stres - povečano rast v prisotnosti kadmija (Finkmeier in sod., 2005). Mutanti s povišano ekspresijo *PRX* genov so se izkazali za uspešne tudi ob biotskem stresu (višja toleranca na *Botrytis cinerea*) (Kiba in sod., 2005), ko so s pomočjo SA inducirali povišano izražanje tarčne peroksidaze.

4.7 KOMENTAR REZULTATOV

Geni, ki smo jih analizirali, pogojujejo v veliki večini sistemski odgovor rastline na okužbo s patogeno glivo, saj so vključeni v splet mehanizmov, ki v končni fazi privede do višje ali nižje tolerance na patogen organizem. Ti mehanizmi po okužbi z glivo niso lokalizirani, temveč se izražajo diferencialno po celotni rastlini, tako v koreninah kot v steblih. V naši raziskavi nismo odkrili gena, za katerega bi lahko rekli, da pogojuje monogensko odpornost. Današnje raziskave so namreč usmejene k iskanju genov odgovornih za monogensko odpornost na patogene organizme. Takšna odpornost posedeje v veliki meri preprečitev kolonizacije v rastlini. V zadnjih 70 letih je bilo poročano o mnogih genih, odgovornih za odpornost na verticilijsko uvelost pri rastlinskih vrstah, pridobljenih iz programov žlahtnenja. Sistemska odpornost na *Verticillium* se kaže v hitri aktivaciji anatomskih in biokemijskih odgovorov v steblu. Naredi se učinkovita zapora, ki prepreči prehod patogena po žilah ksilema, ter s tem zajezi glivo v predhodno okuženih žilnih elementih (Gao in sod., 1995). Prepreči se sistemska okužba. Glivna biomasa pri tem ostane na nizkem nivoju. V našem poskusu, smo kvantitativno določili relativno količino glive v kultivarjih in le-to povezali s toleranco kultivarjev hmelja Celeia in Wye Target na patogeno glivo *V. albo-atrum*. Opazili smo, da se je gliva skozi obdobje po inokulaciji razširila tudi v stebla, visoke količine DNA pa so bile opažene že v časovni točki 6 dpi v koreninah. Ovrednotili smo količino glive in relativno izražanje genov v koreninskih in stebelnih vzorcih obeh sort hmelja, vendar pa nismo povezali podatkov s simptomi pri obeh sortah. V nekaterih študijah navajajo meritve simptomov, kot so števila plodov, teže produkta, uvelostne motnje, ki se večinoma točkujejo semi-kvantitativno, z uporabo bolezenskega indeksa (Robison in sod., 2001; Veronese in sod., 2003; Rob in sod., 2007) ali preko odstotka listov, ki kažejo simptome (Robb in sod., 2007). Nivo okuženosti rastline ter količino glive lahko merimo s pomočjo izdelave tkivnih prezrov ter izolacijo na selektivnih gojiščih ter merjenjem CFU iz združenih vzorcev. Uporablja se tudi svetlobna mikroskopija, ki da semi-kvantitativno meritev, katera korelira s simptomi. Verižna reakcija s polimerazo (PCR) predstavlja nabolj priljubljeno metodo za kvantifikacijo glive. Pomnoževanje vmesnih prepisanih regij (ITS) se že dalj časa uporablja za diagnozo okuženosti rastline z *V. albo-atrum* (Nazar in sod., 1991).

V našem poskusu smo pri primerjavi kolonizacije pri odpornem in občutljivem kultivarju bistveno razliko med njima opazili v časovni točki 18 dpi v koreninah, ko se je v primeru odporne sorte količina glive znatno zmanjšala, in sicer kar 37-krat, v primeru občutljive sorte pa le 2-krat. Sicer pa se je koloniziralo v povprečju (vse časovne točke, korenine in steba) 4-krat manj glive v odpornem kultivarju kot v občutljivem. Torej je bila v koreninah interakcija izrazito različno intenzivna med sortama, medtem ko se v vseh točkah stebelnih vzorcev izrazi podobna interakcija. Gao in sod. (1995) navajajo, da mehanizmi ki so udeleženi pri zaježitvi razširjanja glive, predstavljajo lokalizacijske

mehanizme, ki delno preprečijo napredovanje glive po rastlini. Lokalizacijske mehanizme, ki so locirani v različnih predelih rastline, rastlina uporabi, da usmeri razširjenost glive. Takšna kombinacija mehanizmov rastline deluje v končni točki obrambe pred bolezenskimi simptomi (Robb in sod., 2007).

Pri analizi korelacije med izražanjem posameznih transkriptov in kolonizacijo glive smo ugotovili, da je izražanje transkriptov HO059122, HO059238, HO059263, PRX346815, PRXIIIF8556 povečano v točki 12 dpi korenin oziroma 18 dpi stebel ter v pozitivni korelaciji s kolonizacijo. Medtem je izražanje transkriptov HO059063, HO059225 in MPK116136 korelirano negativno. Primer pozitivne korelacije pomeni, da je ekspresija transkripta največja v tistih točkah v katerih je tudi kolonizacija na višku.

Analiza in interpretacija izražanja obrambnih genov v kultivarju predstavlja velik izziv zaradi relativno naključnih in variabilnih vzorcev kolonizacije glive po rastlini ter za vsako rastlino specifičnih odgovorov na glivo. Gliva kolonizira ksilemske jamice lateralno v primeru nastopa rastlinskih obrambnih barier. Pojavi se sporulacija, ki končno pripelje do totalne kolonizacije in hitrega prenosa spor glive s ksilemskim tokom. V paradižniku npr. se sistemski okužba steba pojavi že dva do štiri dni po inokulaciji (Heinz in sod., 1998). Na zgoden odgovor rastline v koreninah v našem primeru kažeta transkripta HO059267, MPK116136, ki sta imela povisano izražanje že v časovni točki 6 dpi. Predhodno opisan sekundarni proces infekcije, imenovan tudi končna faza II, se običajno zgodi v valovih (Heinz in sod., 1998), ki so lahko povezani v časovno ločeno maksimalno aktivnost obrambnih odzivov gostiteljske rastline (Veronese in sod., 2003). V našem primeru se takšni vrhovi izražanja, ki se pojavijo v valovih, kažejo večinoma v steblih pri tarčnih genih HO059224, HO059063, HO059225, HO059263, HO059267, PAL1_ARATH1156, MPK116136, kjer opazimo povečano izražanje gena v časovni točki 6 dpi in nato zopet v 18 dpi. V tej točki tudi tolerantna sorta Wye Target ne zaustavi kolonizacije, možno pa je, da bi do zmanjšanja pri odporni sorti prišlo v naslednji časovni točki, podobno kot pri raziskavi Creegen in sod. (2014), ko se kolonizacija pri odporni sorti zmanjša šele 30 dni po inokulaciji. Rezultati kažejo na to, da je odgovor nekaterih genov v steblu zgodnejši kot v koreninah, saj so v vegetativnih delih rastline inducibilni obrambni odgovori posebej dobro izoblikovani in so bolj energijsko ekonomični kot stalno prisotne obrambne komponente. Sprožijo se ob prepoznavi elicitorjev patogena. Opisana specifična prepoznavna sproži kaskado prenosa signala, ki vodi do sinteze endogenih signalnih spojin. Slednje so sistematično razširjene po rastlini, tudi v od vira oddaljene organe. Tam sprožijo prepisovanje genov povezanih z obrambnim odzivom rastline (Thomma in sod., 1998). Celice ksilemskega parenhima, kamor se ujamejo glivne celice, odgovorijo z izražanjem obrambnih genov. Slednje determinira odpornost, občutljivost in toleranco hmeljne sorte (Robb, 2007). V primeru nekaterih transkriptov, ki smo jih analizirali v našem poskusu, lahko potrdimo predpostavljeni model, saj je bila obramba inducirana, ko bila je gliva v

steblih omejena (6 dpi). Variabilnost med študijami lahko do neke mere pojasnimo predvsem z analizo različnih gostiteljskih rastlin, z različnimi fiziološkimi in biološkimi značilnostmi ter v manjši meri z vplivom nekaterih okoljskih dejavnikov, kot so temperatura, intenziteta osvetlitve, fotoperioda in vlažnost podlage/zemlje (Robb, 2007).

Chen in sod. (2004) so ugotovili, da je nivo kolonizacije paradižnika dosegel vrh že v časovni točki 6 dpi, medtem ko v steblih hmelja kolonizacija narašča do zadnje analizirane točke (18 dpi). Chen in sod. (2004) pri paradižniku navajajo še drugi vrh kolonizacije po 10 dpi, po katerem se kolonizacija ni več vzpostavila. Gre za tako imenovano ciklično eliminacijo patogene glive. V neodpornih rastlinah se glivna populacija širi, ker patogen utiša gostiteljev površinski odgovor, kar omogoči kolonizacijo novih žilnih elementov. Tekom ciklične periode si gliva ne samo opomore, temveč tudi preseže predhodno namnoževanje. Takšna rast ni le posledica rasti, temveč tudi sporulacije glive. Pri tem relativna količina glivne DNA bolj naraste kot dejanska masa micelija, saj so spore relativno majhne in vsebujejo relativno veliko DNA. V odpornih rastlinah površinski odgovor gostitelja zaustavi patogena, relativna količina glive pa je nižja kot v občutljivih rastlinah. Sporulacija je tako bistveno kasnejša, upočasnjena, ali pa se sploh ne zgodi.

V analizi diferencialnega izražanja tarčnih zaporedij je bilo diferencialno izražanje močnejše in zgodnejše pri inokulirani odporni sorti, kot pri inokulirani občutljivi sorti. V koreninah je bilo posebej izrazito utišanje izražanja velike večine tarčnih genov. Znano je, da patogene glive lahko utišajo izražanje z obrambo povezanih genov rastlin. Tako patogena gliva *Botrytis cinerea* s pomočjo sRNA molekul zatre izražanje genov *MPK*, *PRXIIIF* ter *WAK* v *A. thaliana* (Weiberg in sod., 2013). V študiji je bilo prikazano, da je *A. thaliana* z utišanimi tarčnimi geni imel slabši obrambni odziv na glive iz rodu *Verticillium* (Ellendorff in sod., 2009). Iz tega lahko sklepamo, da je tudi za *V. albo-atrum* značilen mehanizem utišanja obrambnih genov gostitelja ob njegovi kolonizaciji, saj je bil gen PRXII utišan v koreninah občutljive sorte, gena MPK 2 in PRX3 utišana v koreninah obeh sort, v steblih pa je bila pri vseh treh genih izrazito povečana ekspresija v 6 dpi pri odporni sorte. Ellendorff in sod. (2009) so ugotovili, da občutljivosti na glivo ni mogoče razložiti s spremembami v arhitekturi rastline, temveč je bistveno bolj verjetna razloga o utišanju genov z RNA interferenco. Utišanje RNA je bilo prikazano kot pomemben mehanizem pri razvoju interakcij med bakterijo, fiksatorjem dušika *Rhizobium* in modelno rastlino *Medicago truncatula* (Combier in sod., 2006; Boualem in sod., 2008). Prav tako se utišanje tarčnih genov z RNA pojavi v interakciji med glivo *Verticillium* in rastlinami navadnega repnjakovca (Ellendorff in sod., 2009). Tako lahko razložimo rezultate transkriptov HO059224, HO059063, HO059238, HO059263, HO059234, PRX5217103, PRX346815, MPK116136, MPK17621, PRXIIIF8556, ki so bili utišani v koreninah in/ali steblih, v primerjavi z neokuženimi vzorci. Utišanje genov v steblih je razloženo s potovanjem interferenčnih RNA na dolge razdalje po vaskularnem sistemskem transportu

ter pojavom sistemskega utišanja tarčnega gena. Utišanje gena se lahko širi od celice do celice ali pa na dolge razdalje (Voinnet, 2005). Verjetno gre za molekule interferenčne RNA, ki jih je potrebno identificirati pri hmelju, kot tudi pri glivi *V. albo-atrum*.

Pri tarčnih genih lahko predvsem v časovni točki 6 in 12 dpi, pričakujemo začetno utišanje gena, saj je relativna količina gline visoka (slika 10). To se tudi zgodi pri mnogih analiziranih tarčnih genih pri obeh sortah v koreninskih vzorcih HO059224, HO059063, HO059238, HO059263, HO059234, PRX5217103, PRX346815, MPK116136, MPK17621, PRXIIF8556 ter v enem primeru tudi v stebelnih (PAL1_ARATH1156). V nekaterih primerih pa do utišanja pride samo v občutljivi sorti v steblih (HO059224, HO059063 ter GER34511) in v koreninah (HO059225, HO059229, MPK116136 in PRXIIF8556). Navkljub vsemu je ta pojav utišanja genov bistveno pogostejši v koreninah. Chen in sod. (2014b) so dokazali, da patogen (*F. oxysporum*) lahko izrazito utiša obrambne gene (npr. gen MAPK) v *A. thaliana* že v koreninah ter s tem za nekaj časa omogoči lateralno gibanje patogene gline.

Pri paradižniku in bombažu je bilo odkrito, da se v odpornih kultivarjih pojavi hitro obdajanje s suberinom v ksilemu ter povečanje aktivnosti *PAL* gena, ki katalizira začetno fazo sinteze fitoaleksinov, lignina in salicilne kisline. Takšen obrambni odgovor ima vpliv na lateralno gibanje gline *Verticillium* v koreninah in steblih, vendar pa je vseeno relativno neučinkovit pri zaustavljivosti razširjanja patogena po vertikalni osi gostitelja (Veronese in sod., 2003). V našem primeru je bilo izražanje *PAL* gena pri odporni sorti povečano le v koreninah v točki 12 dpi, sicer je bilo izražanje po okužbi utišano. V primeru občutljive sorte pa je bilo izražanje povečano v 12 in 18 dpi v koreninah ter 6 in 18 dpi v steblih).

Lokalni odgovori rastline lahko sprožijo sistemsko pridobljeno odpornost. Po okužbi korenin z glivo iz rodu *Verticillium* se sproži obrambni odgovor rastline na ranitev, kjer sta poleg lokalnega in sistemskega povečanja endogenega nivoja SA, izražena tudi JA in ET. Izražanje omenjenih metabolitov je znatno prekrivajoče in inducira izražanje specifičnih obrambnih genov, med drugim tudi *PR* genov (Johansson in sod., 2006). S tem sovpada tudi izražanje genov, ki so odgovorni za obrambni odgovor rastline. Po zgodnjem izražanju (6 dpi) tarčnih genov, ki so vpleteni v začetne nespecifične reakcije, pride do odziva na sistemski ravni - pri sintezi PR proteinov, kot je bilo prikazano v predhodni raziskavi, ko je bilo izražanje *PR* genov po okužbi povečano v vseh treh časovnih točkah (0, 20 in 30 dpi) (Cregeen in sod., 2014).

Tarčni gen GER34511 ni kazal diferencialnega izražanja v steblih tekom merjenja. Razlogi so lahko različni, najbolj verjetno pa takšen gen ni vpletен v obrambni mehanizem rastline. Možen je pojav nespecifičnega odziva rastline na okužbo, saj se je v prejšnjih študijah paradižnika (Gold in sod., 1996) izkazalo, da ni vedno direktne korelacije med kapaciteto

glivne kolonizacije ter patosistemom *Verticillium*-gostitejska rastlina. Tako je stopnja kolonizacije, ki se je ujemala z odpornostjo rastline v enem patosistemu, izkazala ravno nasproten odziv v drugem sistemu. Po drugi strani pa Gold in sod. (1996) ugotavlajo, da je zmanjšana možnost kolonizacije patogena predpogoj za gostiteljevo odpornost. To je v naši raziskavi vidno pri kolonizaciji hmeljnih korenin (slika 10), kjer je jasno vidna razlika v kolonizaciji obeh sort hmelja, in sicer je v koreninah odporne sorte, 6 in 12 dni po inokulaciji približno 3-krat manj glivne biomase kot v občutljivi sorti, 18 dni po inokulaciji pa kar 48-krat manj. Stebelni vzorci kažejo manj izrazite razlike v kolonizaciji pri posameznih sortah, saj je v prvih dveh točkah kolonizacija še neznatna, v tretji točki pa se poveča, vendar je pri odporni sorti le približno 2x manjša kot pri občutljivi. V tem primeru bi za natančno analizo potrebovali še dodatna vzorčenja v kasnejših terminih po okuževanju z glivo.

Zaradi relativno velike biološke variabilnosti med biološkimi ponovitvami, je ustrezna metoda vzorčenja najpomembnejši del dobro zastavljenega raziskovalnega projekta. Že v predhodnih študijah (Heinz in sod., 1998) se je pokazalo, da so nekateri pristopi bolj primerni kot drugi. Metode sekcij tkiva, oziroma lokalizacija, se je izkazala za nepopolno, saj težje opazimo, kako se je rastlina v celoti odzvala. Ker se patogen pojavlja v večini delov rastline (spodnji in zgornji del steba), rastlina pa ne kaže simptomov povsod, je smiselno vzorčiti združene, velike vzorce, ki prikažejo trende celotne rastline, kar pa pripelje do večje raznolikosti (Pegg in Street, 1984; Heinz in sod., 1998). V naši študiji smo združevali vzorce po rastlinskih delih, torej ločeno korenine in steba, ker nas je zanimal trend širjenja glive po posameznih organih, kot tudi specifično izražanje genov, vendar pa kljub združevanju vzorcev nismo zmanjšali variabilnosti med biološkimi ponovitvami, saj smo z analizo kolonizacije glive potrdili veliko variabilnost med posameznimi analiziranimi vzorci. Biološko variabilnost lahko priprišemo relativno variabilnemu širjenju glive po rastlini kar posledično vpliva tudi na raznoliko ekspresijo genov pri posameznih bioloških ponovitvah. Za primer lahko navedemo transkript PAL_ARATH1156, pri katerem je bila količina glive relativno nizka v 6 dpi pri biološki ponovitvi WT,R2 (priloga F), v primerjavi z ostalima dvema vzorcema, ki sta imela višjo in relativno izenačeno količino glive. Posledično je izražanje gena v ekvivalentnem vzorcu RNA nizko. Z različnimi vzorci razširjanja glive je tako relativno močno pogojena tudi velika biološka variabilnost izražanja nekaterih genov.

5 SKLEPI

V nalogi smo predstavili študijo interakcij med hmeljem in patogeno glivo *V. albo-atrum*. Žilni patogen močno ovira hmeljno pridelavo. Raziskave se osredotočajo na analizo patogenih mehanizmov in rastlinskih obrambnih mehanizmov. V primeru okuževanja z glivo *Verticillium* spp. se večina raziskav rastlinskih odzivov osredotoča na tri faktorje, ki vplivajo na zmožnost razširjanja po žilnem sistemu rastline. Prvi je anatomska vidik rastline, drugi so faktorji, ki pogojujejo rastlinsko sintezo protimikrobnih snovi in pripomorejo k eliminaciji glive in zadna skupina faktorjev so rastni regulatorji in signalne molekule (Robb, 2007). V nalogi smo se osredotočili na izražanje genov iz zadnjih dveh skupin. Opazovali smo, kako so v interakcije vpleteni geni, ki potencialno poligenško prispevajo k odpornosti gostiteljske rastline, ali pa so vpleteni v signalne poti za prepoznavo patogena in obrambo hmelja (Robb, 2007). V vseh rastlinskih patosistemih je izražanje interakcij v občutljivih, odpornih ali tolerantnih genotipih odvisno od prepleta molekularnih mehanizmov, ki jih usmerjata rastlinski in glivni genom v interakciji s spreminjačimi se okoljskimi pogoji. Zaradi kompleksnosti možnih dejavnikov je povsem mogoče, da je vsak patosistem unikum, kar še posebej drži pri raznolikih patogenih, kot so glive rodu *Verticillium* spp., s širokim razponom gostiteljev (Inderbritzin in sod., 2011). Rastlina ima na voljo mnogo mehanizmov, da blokira ali okrne kolonizacijo žilnega sistema ter eliminira patogena. To je vodilo do razvoja patogenih sevov, prilagojenih, da zaobidejo variabilne obrambne mehanizme. Nekatere od teh mehanizmov smo testirali z analizo genov, ki naj bi bili potencialno vpleteni v specifične mehanizme rastlinske obrambe. V analizi diferencialnega izražanja genov je bilo potrebno uporabiti najprimernejše referenčne gene za normalizacijo rezultatov. Tako smo tudi sami naredili analizo štirih (*CAC*, *SAND*, *YLS8* in *DRHI*) ter izbrali dva najprimernejša, *CAC* in *YLS-8*, ki smo jih uporabili v končni analizi normalizacije rezultatov ekspresije tarčnih genov.

V več primerih analize tarčnih genov smo potrdili diferencialno izraženje tako med okuženimi in neokuženimi vzorci kot tudi med odporno in neodporno sorto in tako identificirali gene, ki so v določeni meri vpleteni v obrambne mehanizme in so v določeni fazni odziva pokazali povečano izražanje ali pa je prišlo do izrazitega utišanja.

Z opazovanjem kolonizacijskega vzorca glive ter s podrobno analizo ekspresijskih vzorcev diferencialno izraženih fragmentov, ki so bili predhodno selekcionirani ter izolirani iz občutljivega in odpornega kultivarja hmelja tekom časovno pogojenega eksperimenta (Javornik-Cregeen, 2010), smo v nekaterih primerih potrdili predhodne rezultate (Javornik-Cregeen, 2010), v drugih pa ne. To si lahko razlagamo z različno hitro kolonizacijo glive v dveh eksperimentalnih pogojih in s tem da v poskusih nismo zajeli enakih časovnih točk, ki bi bile relevantne za primerjavo. Izmed 24 predhodno selekcioniranih diferencialno prepisanih fragmentov smo jih nadalje analizirali 18, ker so se le-ti ustrezeno pomnoževali s

PCR v realnem času. Nekateri izmed odkritih in testiranih rastlinskih transkriptov so pokazali, da bi lahko imeli funkcijo v obrambnem odgovoru hmelja na patogeno glivo. To so HO059225, HO059063, HO059122, HO059229, HO059238, HO059256, HO059263, HO059234, HO059267, PRX346815, MPK116136, MPK17621, PRXIIIF8556. Geni, ki so imeli spremenjeno izražanje v kompatibilni in inkompatibilni interakciji, bi morali biti še dodatno testirani za njihove funkcije v rastlini (proteomska in metabolna analiza), da bi lahko pridobili bolj popolno sliko njihove vloge v analizirani interakciji obrambnega mehanizma. Geni s povečanim izražanjem v stebelnih vzorcih ter z zmanjšanim izražanjem v koreninah, so udeleženi predvsem v procesih oksidativnega razcveta, ubikvitinacije proteinov, celične signalizacije, peroksidacije, hidroksilacije ter biosinteze metabolitov. Gen, ki kodira germin podoben protein in je udeležen v procesu razvoja rastline, ni pokazal specifičnega povečanega odgovora po okužbi s patogeno glivo. Tako potrdimo hipotezo o nespremenjenosti izražanja, ko gen ni udeležen v analizirano interakcijo. Splošen vzorec v steblih je kazal na najmočnejši obrambni odgovor v 6 dpi, ko je bila količina glive relativno visoka v koreninah rastline. Kompatibilna intreakcija je pokazala podoben vzorec izražanja kot inkompatibilna pri transkriptih HO059238, PRX346815, MPK17621. Odziv sorte Wye Target je bil v večini tarčnih genov izrazitejši, hitrejši in bolj intenziven.

V analiziranih časovnih točkah smo dobili vzorec pomnoževanja glivne DNA, oziroma kolonizacije glive, ekvivalentno poskusu Cregeen in sod. (2014). Razlike so bile opazne pri kolonizaciji odporne sorte, ko je bila relativna količina glivne DNA v našem poskusu nekoliko višja v primerjavi z občutljivo sorto, vendar pa nismo zajeli enakih časovnih točk in tudi ne nadaljnih časovnih točk, kjer bi lahko videli, če se trend eliminacije glive v koreninah ter povečanja glive v steblih nadaljuje. Hipotezo o kolonizaciji glive lahko potrdimo do te mere, da je bil potek kolonizacije pričakovani, večja količina glive pa je bila prisotna v koreninskih vzorcih kompatibilne interakcije. Količina glive v odpori sorti naj bi bila bistveno nižja kot v občutljivi sorti. V naši študiji je bila količini glive v steblih odporne sorte v 18 dpi le 1,7-krat manjša kot pri občutljivi sorti, vendar predvidevamo da gliva v tej točki še ni dosegla vrha kolonizacije. V raziskavi, kot je naša, kjer smo analizirali rastlino v umetnih pogojih, vedno obstaja vprašanje, do kakšne mere opažanja pri teh poskusih odražajo dejanski potek dogodkov, ki bi se zgodili v rastlini v naravi (Gold in sod., 1996).

Z analizo korelacije med izražanjem genov pri posameznih vzorcih in kolonizacijo glive v teh vzorcih smo ugotovili, da so veliki standardni odkloni posledica variabilnega razširjanja glive po rastlini. Na primer, relativno visok standardni odklon pri tarčnem genu HO059225 v koreninah sorte Wye Target, v časovni točki 18 dpi je odraz visoke variabilnosti glivne kolonizacije v posameznih bioloških ponovitvah analiziranega obravnavanja (priloga F). Tako smo preverili ter povezali posamezni vzorec kolonizacije z izražanjem zaporedja v istem vzorcu. Najvišja relativna količina glive sovpada z močnim

izražanjem gena in obratno. Glede na izrazito variabilno kolonizacijo med posameznimi biološkimi ponovitvami, bi v prihodnje bilo bolje izbirati vzorce za analizo na način, da bi najprej analizirali kolonizacijo in izbrali takšne, ki izražajo podobne tende kolonizacije.

Naša študija izražanja obrambnih genov in glivne kolonizacije rastline v kompatibilni in inkompatibilni reakciji hmelja z glivo *V. albo-atrum* kaže na relativno zgodnji odziv rastline na okužbo z glivo. Deset (PRXIIIF8556, MPK17621, PRX346815, HO59256, HO059238, HO059229, HO059225, HO059122, HO59063 in HO59224) od 17 tarčnih zaporedij se je izražalo izrazito diferencialno v primerjavi stebelnih delov odporne in občutljive sorte v zgodnji fazi glivne kolonizacije rastline (6 dpi). Pri navedenih genih je bilo izražanje izrazito intenzivnejše pri sorti Wye Target, kot pri sorti Celeia. Izražanje tarčnih zaporedij je bilo v koreninah pri večini analiziranih genov utišano (HO059224, HO059063, HO059238, HO059263, HO059234, PRX5217103, PRX346815, MPK116136, MPK17621, PRXIIIF8556), z izjemo časovne točke 18 dpi, kjer je v nekaterih primerih izražanje tudi povečano. Navedeni geni, pri katerih je prišlo do izrazito diferencialnega izražanja, so vpeti v procese oksidativnega razcveta, ubikvitinacije proteinov, celične signalizacije, peroksidacije, hidroksilacije ter biosinteze metabolitov. Kljub temu, da je bila glivna kolonizacija v steblih največja v 18 dpi, pa se glede na vzorce izražanja nekaterih genov aktivacija obrambnih mehanizmov začne že bistveno prej, predvsem pri odpornem kultivarju, kar omeji prosto razširjanje glive po rastlini.

Kljub temu, da je poznan gen, ki pogojuje monogensko odpornost rastlin na glive rodu *Verticillium* (Kawchuk in sod., 2001), je potrebno identificirati tudi ostale dejavnike, ki pogojujejo interakcijo *V. albo-atrum* - *H. lupulus* L., saj je patosistem dinamičen. Poznavanje in razumevanje vseh faz nam bo omogočilo interpretacijo interakcij pri bolezni verticilijske uvelosti hmelja, k čemur je prispevala tudi naša študija.

Magistrska naloga je izpolnila pričakovane cilje, odprla pa vrsto novih vprašanj, na katera je v prihodnosti še potrebno odgovoriti. Rezultat raziskave odpira možnost implementacije rezultatov v sorodnih študijah, pri ostalih ekonomsko pomembnih rastlinskih vrstah in lahko pripomore k boljšemu poznavanju in razumevanju vloge posameznih genov v obrambnem mehanizmu patosistema *H. lupulus* L. - *V. albo-atrum* v povezavi s kolonizacijskimi mehanizmi vaskularnega patogena.

6 POVZETEK

Hmelj (*H. lupulus* L.) je trajna, kmetijsko in ekonomsko pomembna rastlina, ki se v veliki večini goji za uporabo v pivovarski industriji. Uspešno pridelavo hmelja onemogočajo rastlinske patogene glive, ki so stalna in poglavitna grožnja svetovni varnosti hrane in predstavljajo največjo skupino povzročiteljev bolezni pri rastlinah na svetu. Med najbolj uničujočimi je tudi verticilijska uvelost (*V. albo-atrum*), proti kateri zaenkrat ne poznamo učinkovite zaščite, najučinkovitejša obramba pa je naravna odpornost gostitelja proti patogenemu organizmu (Nunes in Dean, 2012).

Verticilijska uvelost je uničujoča bolezen hmelja, ki je odgovorna za velike izgube pridelka. Povzročata jo glivi *V. albo-atrum* in *V. dahliae*. *V. albo-atrum* je izredno razširjena vrsta, medtem ko je *V. dahliae* redkejša. Zaradi dolge obstojnosti glive v zemlji, tudi več let (gliva tvori strukture, ki omogočijo mirovanje) in neučinkovite kemijske kontrole, potrebujemo metode za hitro detekcijo glive. Pojav glive je mogoč tudi ob odsotnosti vidnih simptomov, kar otežuje detekcijo. Možnost nadzora s pomočjo bioloških kontrolnih agensov je omejena (Maurer in sod., 2014).

Cilj naloge je bil ovrednotiti vlogo tarčnih genov v obrambnem mehanizmu hmelja ter potek kolonizacije v posameznih časovnih točkah po inokulaciji z glivo ter v posameznih organih (korenine in stebla). Z raziskavo smo nadaljevali poskus Javornik-Cregeen (2010), v katerem so identificirali diferencialno izražene fragmente s pomočjo Gene Snare in cDNA analize prikaza izražanja. Nekateri izolirani fragmenti so bili že testirani v predhodni raziskavi (Cregeen in sod., 2014), določeni geni pa so bili še nepreverjeni (HO059224, HO059063, HO059122, HO059225, HO059229, HO059238, HO059256, HO059293, HO059234 in HO059267). Poleg omenjenih smo za raziskavo izbrali še nekatere gene, ki so se izkazali za potencialno aktivne v obrambnem sistemu nekaterih interakcij rastlina-patogen (PAL_ARATH1156, PRX5217103, PRX346815, GER34511, MPK116136, MPK17621, PRXIIIF8556). Tako smo od 24 tarčnih zaporedij katerih vloga v obrambnem mehanizmu hmelja na patogeno glivo *V. albo-atrum* še ni bila potrjena za analizo izbrali 17 transkriptov, ki so se uspešno pomnoževali s PCR v realnem času. Izražanje genov smo preverili v vzorcih odporne sorte hmelja Wye Target ter občutljive sorte Celeia, v stebelnih in koreninskih vzorcih. Vzorčenje je bilo izvedeno v treh časovnih točkah, 6, 12 in 18 dpi. Iz vseh vzorcev smo izolirali DNA in visokokakovostno RNA ter preverili RIN vrednost vsakega vzorca posebej. Pridobili smo visokokakovostno RNA, ki je bila primerna za nadaljnje analize. Pomnoževanje in relativno izražanje tarčnih genov ter glivno kolonizacijo smo testirali z metodo kvantitativne verižne reakcije s polimerazo v realnem času. Diferencialno izražanje tarčnih genov je bilo analizirano s pomočjo delta-delta Ct metode, glivna DNA pa kvantificirana po delta Ct metodi.

V prvem delu poskusa smo ovrednotili referenčne gene, ki so se v predhodni študiji (Štajner in sod., 2013) izkazali za najbolj stabilne ne glede na biotski stres. Tako smo preverili gene *CAC*, *SAND*, *YLS8* in *DRH1* ter izbrali najprimernejša (*CAC* in *YLS8*), ki smo ju uporabili v končni analizi normalizacije rezultatov ekspresije tarčnih genov.

Glivno DNA iz korenin in stebel odporne sorte hmelja Wye Target in občutljive sorte hmelja Celeia smo pomnožili z glivno specifičnimi oligonukleotidnimi začetniki 9-1gs (Radišek in sod., 2004; Cregeen in sod., 2014). Relativna količina glivne DNA je v koreninah po kontrolni točki 6 dpi narastla do 12 dpi ter upadla v točki 18 dpi, opazna pa je bila razlika med sortama Wye Target in Celeia. Odporna sorta Wye Target je vsebovala relativno manjšo količino glive. Relativna količina glive je v stebelnih vzorcih obeh sort ostajala na podobnem nivoju v kontrolnih točkah 6 in 12 dpi, nato je narasla v 18 dpi. Takšen odziv je bil pričakovani, vendar ne v takšni meri pri odporni sorti, saj je bila količina glive le malo manjša kot v občutljivi sorti hmelja, vendar pa predvidevamo, da gliva v tej časovni točki še ni dosegla viška kolonizacije v steblih. Rezultat se je relativno dobro ujemal z rezultatom Cregeen in sod. (2014).

Izbrana tarčna zaporedja smo poravnali s podatkovno zbirko NCBI na proteinskem nivoju s spletnim orodjem BLASTX. Za vse tarčne gene smo identificirali tarčne proteine, ki so bili predpostavljeni glede na predhodno študijo ter tako potrdili identiteto posameznega tarčnega zaporedja. Prav vsa zaporedja so kot najboljši zadetek podala iskani protein. Ujemanje z iskanimi proteini je znašalo med 60 % in 97 %. Tarčnim zaporedjem smo pripisali vlogo v celičnem metabolizmu. Tako smo ugotovili, da so tarčna zaporedja vpletena v procese celičnega oksidativnega razcveta, ubikvitinacije proteinov, celične signalizacije, peroksidacije, hidroksilacije, biosinteze fenilalanina, defosforilacije ter biosinteze metabolitov. Tarčna zaporedja so bila poravnana s hmeljnim genomom, z namenom preverjanja specifičnosti pomnoževanja. Pri vseh tarčnih zaporedjih smo dobili en ujemajoč zadetek ($> 95\%$), z izjemo tarčnih zaporedij HO059225 in HO059267, pri katerih smo identificirali dve tarčni zaporedji, kar pa je lahko tudi posledica napak v objavljenem genomu hmelja. Nadalje smo z disociacijsko analizo tekom qPCR reakcije potrdili, da je bilo pomnoževanje tarčnih zaporedij specifično.

Stebelni vzorci okuženih rastlin so se najpogosteje odzvali na prisotnost patogena z izrazitim povečanjem izražanja genov v primerjavi z neokuženimi rastlinami. Takšni so bili geni, ki kodirajo protein fosfatazo 2c 57, G-tip lektin S-receptor-podoben serin/treonin-protein kinazo, E3 ubikvitin protein ligazo, z glicinom-bogat RNA-vezni protein, protein fosfatazo, cinkov prst ccch domeno, cinamat 4-hidroksilazo, G-proteinu podoben receptor, cikloartenol sintazo, giberelinski receptor GID1, feronia receptor-podobno kinazo, fenilalanin amonijeve liaz 1, peroksidazni protein 52, peroksidazni protein 34, z mitogenom aktivirano proteinsko kinazo 1 in 2 ter peroksiredoxin-2F. Odgovor hmelja na

V. albo-atrum je bil v 6 dpi v veliki večini primerov izrazitejši v odporni sorti Wye Target, kot v neodporni sorti Celeia. Pri določenih genih je bil prisoten tudi cikličen odziv na glivo (Heinz in sod., 1998). Pri takšnem odzivu je v prvi fazи patogena gliva omejena na koreninski sistem in bazo stebla. V naslednji fazи gliva zaobide rastlinske obrambne sisteme in intenzivno napreduje v zgornje dele stebla in liste. Takšen cikličen odziv je bilviden pri pomnoževanju genskih transkriptov HO059224, HO059063, HO059225, HO059263, HO059267, PAL1_ARATH1156, MPK116136. Ti kodirajo proteine imenovane protein fosfatazo 2c 57, G-tip lektin S-receptor-podoben serin/treonin-protein kinazo, cikloartenol sintazo, z glicinom-bogat RNA-vezni protein, feronia receptor-podobno kinazo, fenilalanin amonijeve liaz 1 in z mitogenom aktivirano proteinsko kinazo 1.

V koreninah se je kazalo izrazito utišanje tarčnih genov. Takšni so bili geni (HO059224, HO059063, HO059238, HO059263, HO059234, PRX5217103, PRX346815, MPK116136, MPK17621, PRXIIF8556), ki kodirajo protein fosfatazo 2c 57, G-tip lektin S-receptor-podoben serin/treonin-protein kinazo, cinamat 4-hidroksilazo, cikloartenol sintazo, giberelinski receptor GID1, peroksidazni protein 52, peroksidazni protein 34, z mitogenom aktivirano proteinsko kinazo 1, peroksiredoxin-2F.

7 VIRI

- Agrios G. N. 1997. Plant Pathology, 4th edition. San Diego, CA: Academic Press: 635 str.
- Batista D., Fonseca S., Serrazina S., Figueiredo A., Pais M. S. 2008. Efficient and stable transformation of hop (*Humulus lupulus* L.) var. eroica by particle bombardment. *Plant Cell Reports*, 27, 7: 1185-96
- Behre K. E. 1999. The history of beer additives in Europe - a review. *Vegetation History and Archaeobotany*, 8: 35-48
- Belkhadir Y., Nimchuk Z., Hubert D.A., Mackey D., Dangl J.L. 2004. *Arabidopsis* RIN4 negatively regulates disease resistance mediated by RPS2 and PRM1 downstream or independent of the NDR1 signal modulator and is not required for the virulence functions of bacterial type III effectors AvrRpt2 or AvrRpm1. *Plant Cell*, 16: 2822–2835
- Bell-Lelong D. A., Cusumano J. C., Meyer K. in Chapple C. 1997. Cinnamate-4-Hydroxylase Expression in *Arabidopsis* (Regulation in Response to Development and the Environment). *Plant Physiology*, 113, 3.
- Berlangier I., Powelson M. L. 2000. *Verticillium* wilt. The Plant Health Instructor, DOI: 10.1094/PHI-I-2000-0801-01.
<http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/ascomycetes/Pages/VerticilliumWilt.aspx> (4. mar. 2015)
- Bilodeau G. J., Koike S. T., Uribe P. in Martin F. 2012. Development of an Assay for Rapid Detection and Quantification of *Verticillium dahliae* in Soil. *Phytopathology*, 102: 331-343
- Biswal U. C., Biswal B. in Raval M. K. 2003. Chloroplast Biogenesis: From Proplastid to Gerontoplast. Dordrecht. Kluwer Academic Publishers: 353 str.
- Bogamuwa S. P. in Jang J. C. 2014. Tandem CCCH Zinc Finger Proteins in Plant Growth, Development and Stress Response. *Plant and Cell Physiology*, 55, 8: 1367-1375
- Boualem A., Laporte P., Jovanovic M., Laffont C., Plet J., Combier J. P., Niebel A., Crespi M., Frugier F. 2008. MicroRNA166 controls root and nodule development in *Medicago truncatula*. *The Plant Journal*, 54: 876-887
- Brady M. L., Pegg I. 2000. *Verticillium* wilt. CABI. USA: 553 str.
- Brouwer M., Lievens B., Van Hemelrijck W., Van den Ackerveken G., Cammue B. P. A., Thomma B. P. H. J. 2003. Quantification of disease progression of several microbial pathogens on *Arabidopsis thaliana* using real-time fluorescence PCR. *FEMS Microbiology Letters*, 228: 241-248
- Chen P., Lee B., Robb J. 2004. Tolerance to a non-host isolate of *Verticillium dahliae* in tomato. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 64, 6: 283-291

- Chen Y., Tan Z., Hu B., Yang Z., Xu B., Zhuang L., Huang B. 2014a. Selection and validation of reference genes for target gene analysis with quantitative RT-PCR in leaves and roots of bermudagrass under four different abiotic stresses. *Physiologia Plantarum*: 11 str.
- Chen Y. C., Wong C. L., Muzzi F., Vlaardingerbroek I., Kidd B. N., Schenk P. M. 2014b. Root defense analysis against *Fusarium oxysporum* reveals new regulators to confer resistance. *Scientific Reports*, 4, 5584: 1-10
- Cheng Y. T., Li Y., Huang S., Huang Y., Dong X., Zhang Y., Li X. 2011. Stability of plant immune-receptor resistance proteins is controlled by SKP1-CULLIN1-F-box (SCF)-mediated protein degradation. *Proceedings of National Academy of Science*. 108. 35: 14694-14699
- Cheung A. Y., Wu H. M. 2011. THESEUS 1, FERONIA and relatives: a family of cell wall-sensing receptor kinases? *Current Opinion in Plant Biology*, 14, 6: 632-641
- Collard B. C., Mackill D.J. 2008. Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 363: 557–572
- Combier J. P., Frugier F., de Billy F., Boualem A., El-Yahyaoui F., Moreau S., Vernié T., Ott T., Gamas P., Crespi M., Niebel A. 2006. MtHAP2-1 is a key transcriptional regulator of symbiotic nodule development regulated by microRNA169 in *Medicago truncatula*. *Genes and Development*, 20: 3084-3088
- Cregeen S., Radisek S., Mandelc S., Turk B., Stajner N., Jakse J., Javornik B. 2014. Different Gene Expressions of Resistant and Susceptible Hop Cultivars in Response to Infection with a Highly Aggressive Strain of *Verticillium albo-atrum*. *Plant Molecular Biology Reporter*, 10: 1-16
- Čerenak A., Javornik B. 2001. Analysis of molecular markers correlated with resistance of hop (*Humulus lupulus L.*) to damson-hop aphid (*Phorodon humuli* Schrank). V: Proceedings of the Scientific Commision of the International Hop Growers Convention. Scientific Commision of the International Hop Growers Convention, Canterbury, 5.-7. avgust 2001. Seigner E. (ur.). Canterbury, International Hop Growers Convention, 32-35
- Čerenak A., Radisek S., Košir I. J., Oset M. 2010. Strategija razvoja žlahtnjenja novih sort hmelja (*Humulus lupulus L.*). V: Novi izzivi v poljedelstvu 2010, Rogaška Slatina, Ljubljana, Slovensko agronomsko društvo: 108-113
- Dangl J. L., Jones J. D. G. 2001. Plant pathogens and integrated defense responses to infection. *Nature*, 411: 826–833
- Darby P. 2001. Single gene traits in hop breeding. Proceedings of the Scientific Commission of the International Hop Growers Convention. Seigner E. (ur.). Canterbury, UK: 86–90

- Darby P., Atkinson R., Buggey L. A., Meacham A. E. 2003. The potential for selective breeding to increase the xanthohumul content of hops. V: Proceedings of the Scientific Commision of the International Hop Growers Convention. Scientific Commision of the International Hop Growers Convention, Dobrna-Žalec, 24.-27. junij 2003. Seigner E. (ur.). Dobrna-Žalec, International Hop Growers Convention: 97-100
- De Bruyne L., Höfte L. M., De Vleesschauwer D. 2014. Connecting Growth and Defense: The Emerging Roles of Brassinosteroids and Gibberellins in Plant Innate Immunity. *Molecular Plant*, 7, 6: 943-959
- De Vleesschauwer D., Van Buyten E., Satoh K., Balidion J., Mauleon R., Choi I. R., Vera-Cruz C., Kikuchi S., Hofte M. 2012. Brassinosteroids antagonize gibberellin- and salicylate-mediated root immunity in rice. *Plant Physiology*, 158, 4: 1833-1846
- Decreux A., Messiaen J. 2005. Wall-associated Kinase WAK1 Interacts with Cell Wall Pectins in a Calcium-induced Conformation. *Plant and Cell Physiology*, 46, 2: 268-278
- Deng H., Liu H., Li X., Xiao J., Wang S. 2012. A CCCH-type zinc finger nucleic acid-binding protein quantitatively confers resistance against rice bacterial blight disease. *Plant Physiology*, 158, 2: 876-889
- Dhawan R., Luo H., Foerster A. M., Abuqamar S., Du H. N., Briggs S. D., Mittelsten Scheid O., Mengiste T. 2009. HISTONE MONOUBIQUITINATION1 interacts with a subunit of the mediator complex and regulates defense against necrotrophic fungal pathogens in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 21, 3: 1000-1019
- Dolinar M., Ferant N., Žolnir M., Simončič A., Knapič V. 2002. Bolezni, škodljivci in pleveli v hmeljnih nasadih. V: *Priročnik za hmeljarje*. Majer D. (ur.). Žalec, Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Žalec: 51-101
- Dolinar M., Simončič A. 1999. Hmeljeva Uvelost (*Verticillium albo-atrum* Reinke at Berthold in *Verticillium dahliae* Klebahn) v Sloveniji. V: *Zbornik predavanj in referatov s 4. Slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin*, Portorož, 3.-4. marec 1999. Maček J. (ur.). Ljubljana, Društvo za varstvo rastlin Slovenije: 201-208
- Dow M., Newman M. A., von Roepenack E. 2000. The induction and modulation of plant defense responses by bacterial lipopolysaccharides. *Annual Review of Phytopathology*, 38: 241–261
- Down G., Barbara D., Radišek S. 2007. *Verticillium albo-atrum* and *V. dahliae* on hop. *Bulletin OEPP*, 37, 3: 528-535
- Duressa D., Rauscher D., Koike S. T., Mou B., Hayes R. J., Maruthachalam K., Subbarao K. V., Klosterman S. J. 2012. A real-time PCR assay for detection and

- quantification of *Verticillium dahliae* in spinach seed. *Phytopathology*, 102, 4: 443-451
- Durrant W. E., Dong X. 2004. Systemic acquired resistance. *Annual Review in Phytopathology*, 42: 185–209
- Easton G. D., Nagle M. E., Bailey D.L. 1969. A method of estimating *Verticillium albo-atrum* propagules in field soil and irrigation waste water. *Phytopathology*, 59: 1171-1172
- Edreva A. 2005. Phatogenesis-related proteins: research progress in the last 15 years. *Genetics Applied Plant Physiology*, 31, 1-2: 105-124
- Ellendorff U., Fradin E. F., de Jonge R., Thomma B. P. H. J. 2009. RNA silencing is required for *Arabidopsis* defence against *Verticillium* wilt disease. *Journal of Experimental Botany*, 60, 2: 591-602
- Esquela-Kerscher A., Slack F.J. 2006. Oncomirs-microRNAs with a role in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 6: 259–269
- Ewan R., Pangestuti R., Thornber S., Craig A., Carr C., O'Donnell L., Zhang C., Sadanandom A. 2011. Deubiquitinating enzymes AtUBP12 and AtUBP13 and their tobacco homologue NtUBP12 are negative regulators of plant immunity. *New Phytologist*, 191, 1: 92-106
- Eynck C., Koopmann B., Grunewaldt-Stoecker G., Karlovsky P., von Tiedemann A. 2007. Differential interactions of *Verticillium longisporum* and *V. dahliae* with *Brassica napus* detected with molecular and histological techniques. *European Journal of Plant Pathology*, 118, 3: 259-274
- Fabisch T. 2013. Influence of gibberellins on *Nicotiana attenuata*'s defense against insects. Faculty of Nature and Technic, University of Applied Sciences Bremen, Germany. Master thesis: 67 str.
- Finkemeier I., Goodman M., Lamkemeyer P., Kandlbinder A., Sweetlove L. J., Dietz K. J. 2005. The mitochondrial type II peroxiredoxin F is essential for redox homeostasis and root growth of *Arabidopsis thaliana* under stress. *The Journal of Biological Chemistry*, 280: 12168-12180
- Floerl S., Possienke M. A. M., Feussner K., Tappe H., Gatz C., Feussner I., Kües U., Polle A. 2012. *Verticillium longisporum* Infection Affects the Leaf Apoplastic Proteome, Metabolome, and Cell Wall Properties in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE*, 7, 2: e31435, DOI: 10.1371/journal.pone.0031435: 14 str.
- Flor H. H. 1971. Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology*, 9: 275–296
- Fradin E. F. in Thomma B. P. H. J. 2006. Physiology and molecular aspects of *Verticillium* wilt diseases caused by *V. dahliae* and *V. albo-atrum*. *Molecular Plant Pathology*, 7: 71–86

- Furlan G., Klinkenberg J., Trujillo M. 2012. Regulation of plant immune receptors by ubiquitination. *Frontiers in Plant Science*, 3: 238, DOI: 10.3389/fpls.2012.00238: 6 str.
- Gao H., Beckman C. H., Mueller W. C. 1995. The rate of vascular colonization as a measure of the genotypic interaction between various cultivars of tomato and various formae or races of *Fusarium oxysporum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 46: 29-43
- Garber R. H. 1973. United States Department of Agriculture Publication 1. ARS-S-19: 69-77
- Gatica-Arias A. Stanke, M., Häntzschel K. R., Weber G. and Matousek J. 2013. Over-expression of the transcription factor HlMYB3 in transgenic hop (*Humulus lupulus* L. cv. Tettnanger) modulates the expression of genes involved in the biosynthesis of flavonoids and phloroglucinols. *Plant cell, tissue, and organ culture*, 113, 2: 279-289
- Gau A., Kouth M., Piotrowski M., Kloppstech K. 2004. Accumulation of pathogenesis-related proteins in apoplast of susceptible cultivar of apple (*Malus domestica* cv. Elstar) after infection by *Venturia inaequalis* and constitutive expression of PR genes in cultivar Remo. *European Journal of Plant Pathology*, 110: 703-711
- Gayoso C., Pomar F., Novo-Uzal E., Merino F., de Ilarduya O. M. 2010. The Ve-mediated resistance response of the tomato to *Verticillium dahliae* involves H₂O₂, peroxidase and lignins and drives PAL gene expression. *BMC Plant Biology*, 10: 232, DOI: 10.1186/1471-2229-10-232: 19 str.
- Glazebrook J. 2001. Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis*: 2001 status. *Current Opinion in Plant Biology*, 4: 301–308
- Gold J., Lee B., Robb J. 1996. Colonization of tomatoes by *Verticillium dahliae*: determinative phase II. *Canadian Journal of Botany*, 74: 1279-1288
- Gómez-Gómez L., Boller T. 2002. Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. *Trends in Plant Science*, 7: 251–256
- Gómez-Gómez L., Boller T. 2000. FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Molecular Cell*, 5: 1003–1011
- Gosti F., Beaudoin N., Serizet C., Webb A. A., Vartanian N., Giraudat J. 1999. ABI1 protein phosphatase 2C is a negative regulator of abscisic acid signaling. *Plant Cell*, 11, 10: 1897-1910
- Greeff C., Roux M., Mundy J., Petersen M. 2012. Receptor-like kinase complexes in plant innate immunity. *Frontiers in Plant Science*, 3: 209, doi: 10.3389/fpls.2012.00209: 2 str.

- Guénin S., Mauriat M., Pelloux J., Van Wuytswinkel O., Bellini C., Gutierrez L. 2009. Normalization of qRT-PCR data: the necessity of adopting a systematic, experimental conditions-specific, validation of references. *Journal of Experimental Botany*, 60, 2: 487-493
- He Z. H., He D., Kohorn B. D. 1998. Requirement for the induced expression of a cell wall associated receptor kinase for survival during the pathogen response. *Plant Journal*, 14, 1: 55-63
- Heid C. A., Stevens J., Livak K. J., Williams P. M. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Research*, 6: 986-994
- Heinz R., Lee S. W., Saparno A., Nazar R. N., Robb J. 1998. Cyclical systemic colonization in *Verticillium*-infected tomato. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 52: 385-396
- Howard E. L., Whittock S. P., Jakse J., Carling J., Matthews P. D., Probasco G., Henning J. A., Darby P., Cerenak A., Javornik B., Killian A., Koutoulis A. 2011. High-throughput genotyping of hop (*Humulus lupulus* L.) utilising diversity arrays technology (DArT). *Theoretical and Applied Genetics*, 122: 1265–1280
- Hu X., Nazar R. N., Robb J., 1993. Quantification of *Verticillium* biomass in wilt disease development. *Phisiological and Molecular Plant Pathology*, 42, 1: 23-36
- Huang G., Allen R., Davis E. L., Baum T. J., Hussey R. S. 2006. Engineering broad root-knot resistance in transgenic plants by RNAi silencing of a conserved and essential root-knot nematode parasitism gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103, 39: 14302–14306
- Huibregtse J. M., Beaudenon S. M., Howley S. P. M. 1995. A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. *Proceedings of the National Academy of Science*, 92, 7: 2563–2567
- Inderbitzin P., Davis R. M., Bostock R. M., Subbarao K. V. 2011. The ascomycete *Verticillium longisporum* is a hybrid and a plant pathogen with an expanded host range. *PLoS ONE*, 6: e18260, DOI: 10.1371/journal.pone.0018260: 13 str.
- Jakše J., Stajner N., Kozjak P., Cerenak A., Javornik B. 2008. Trinucleotide microsatellite repeat is tightly linked to male sex in hop (*Humulus lupulus* L.). *Molecular Breeding*, 21: 139–148
- Jakše J., Štajner N., Luthar Z., Jeltsch J.M., Javornik B. 2011. Development of transcriptassociatedmicrosatellite markers for diversity and linkage mapping studies in hop (*Humulus lupulus* L.). *Molecular Breeding*, 28: 227-239
- Jakše J., Čerenak A., Radišek S., Satovic Z., Luthar Z., Javornik B. 2013. Identification of quantitative trait loci for resistance to *Verticillium* wilt and yield parameters in hop (*Humulus lupulus* L.). *Theoretical Applied Genetics*, 126, 6: 1431-1443

- Javornik-Cregeen S. 2010. Differential gene expression in hop after infection with *Verticillium albo-atrum*. Ljubljana, Univerza v Ljubljani: 136 str.
- Johansson A., Staal J., Dixellius C. 2006. Early responses in the Arabidopsis-Verticillium longisporum pathosystem are dependent on NDR1, JA- and ET-associated signals via cytosolic NPR1 and RFO1. Molecular Plant-Microbe Interactions Journal, 19, 9: 958-969
- Jones J. D. G., Dangl J. L. 2006. The plant immune system. Nature, 444: 323–329
- Katahira J., Yoneda Y. 2011. Nucleocytoplasmic transport of microRNAs and related small RNAs. Traffic, 12, 11: 1468–1474
- Kawchuk L. M., Hachey J., Lynch D. R., Kulcsar F., van Rooijen G., Waterer D. R. 2001. Tomato Ve disease resistance genes encode cell surface-like receptors. Proceedings of the National Academy of Sciences, 98, 11: 6511-6515
- Kiba A., Nishihara M., Tsukatani N., Nakatsuka T., Kato Y., Yamamura S. 2005. A peroxiredoxin Q homolog from gentians is involved in both resistance against fungal disease and oxidative stress. Plant Cell Physiology, 46: 1007-1015
- Kim H. S., Jung M. S., Lee S. M., Kim K. E., Byun H., Choi M. S. 2009. An S-locus receptor-like kinase plays a role as a negative regulator in plant defense responses. Biochemical and Biophysical Research Communications 381, 3: 424-428
- Kim S., Kang K. 2008. Proteomics in plant defense response. V: Plant Proteomics. Agrawal G. and Rakwal R. (eds.). Hoboken, Wiley: 587-604
- Kirk P. M., Cannon P. F., Minter D. W., Stalpers J. A. 2008. Dictionary of the Fungi. 10th ed. Wallingford: CABI: 724 str.
- Kong Q. Y. J., Niu P., Xie J., Jiang W. 2014. Screening Suitable Reference Genes for Normalization in Reverse Transcription Quantitative Real-Time PCR Analysis in Melon. PLoS ONE, 9, 1: e87197, DOI: 10.1371/journal.pone.0087197: 11 str.
- Kovačević M., Kač M. 2002. Determination and verification of hop varieties by analysis of essential oils Food Chemistry, 77: 489-494
- Kulkarni R. D., Thon M. R., Pan H., Dean R. A. 2005. Novel G-protein-coupled receptor-like proteins in the plant pathogenic fungus *Magnaporthe grisea*. Genome Biology, 6, 3: R24, doi: 10.1186/gb-2005-6-3-r24: 14 str.
- Kump B., Svetek S., Javornik B. 1992. Izolacija visokomolekularne DNA iz rastlinskih tkiv. Zbornik Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani - Kmetijstvo, 59: 63-66
- Lamar R. T., Schoenike B., Vanden Wymelenberg A., Steward P., Dietrich D. M., Cullen D. 1995. Quantitation of fungal mRNAs in complex substrates by reverse transcription PCR and its application to *Phanerochaete chrysosporium*-colonized soil. Applied and Environmental Microbiology, 61: 2122-2126
- Lamb C., Dixon R. A. 1997. The oxidative burst in plant disease resistance. Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 48: 251-275

- Lane B. G. 2002. Oxalate, germins, and higher-plant pathogens. IUBMB Life, 53, 2: 67-75
- Larsen R. C., Vandemark G. J., Hughes T. J., Grau C. R.. 2007. Development of a Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay for Quantifying *Verticillium albo-atrum* DNA in Resistant and Susceptible Alfalfa. Phytopathology, 97, 11: 1519-1525
- Lee H. J., Kim J. S., Yoo S. J., Kang E. Y., Han S. H., Yang K. Y. 2012. Different roles of glycine-rich RNA-binding protein7 in plant defense against *Pectobacterium carotovorum*, *Botrytis cinerea*, and tobacco mosaic viruses. Plant Physiology and Biochemistry, 60: 46-52
- Lee R. C., Feinbaum R. L., Ambros V. 1993. The *C. elegans* heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. Cell, 75: 843–854
- Lee S. W., Nazar R. N., Powell D. A., Robb J. 1992. Reduced PAL gene suppression in *Verticillium*-infected resistant tomatoes. Plant Molecular Biology, 18, 2: 345-352
- Leonhardt N., Kwak J. M., Robert N., Waner D., Leonhardt G., Schroeder J. I. 2004. Microarray Expression Analyses of Arabidopsis Guard Cells and Isolation of a Recessive Abscisic Acid Hypersensitive Protein Phosphatase 2C Mutant. Plant Cell, 16, 3: 596–615
- Li H., Qin Y., Xiao X., Tang C. 2011. Screening of valid reference genes for real-time RT-PCR data normalization in *Hevea brasiliensis* and expression validation of a sucrose transporter gene HbSUT3. Plant Science, 181, 2: 132-139
- Li X., Clark J. D., Zhang Y., Dong X. 2001. Activation of an EDS1-mediated R-gene pathway in the snc1 mutant leads to constitutive, NPR1-independent pathogen resistance. Molecular Plant-Microbe Interactions, 14: 1131–1139
- Luck J. V. 1954. Studies on the *Verticillium* wilt of *Mentha piperita* L. with special emphasis on the causal organism, *Verticillium albo-atrum* R. & B. Dissertation Abstracts, 14: 916-917
- Mackay I. M., Arden K. E., Nitsche A. 2002. Real-time PCR in virology. Nucleic Acids Research, 30: 1292-1305
- Mahaffee W. F., Pethybridge S. J., Gent D. H. 2009. Compendium of hop diseases and pests. American Phytopathological Society: 112 str.
- Mahe A., Grisvard J., Dron M., 1992. Fungal-specific and plant-specific gene markers to follow the bean anthracnose infection process and normalize a bean chitinase mRNA induction. Molecular Plant-Microbe Interactions, 5: 242-248
- Majer A., Javornik B., Cerenak A., Jakse J. 2014. Development of novel EST-derived resistance gene markers in hop (*Humulus lupulus* L.). Molecular Breeding, 33, 1: 61-74

- Maloukh L., Matousek J., Van Bockstaele E., Roldán-Ruiz I.. 2009. Housekeeping Gene Selection for Real Time-PCR Normalization in Female Hop (*Humulus lupulus L*) Tissues. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 18, 1: 53-58
- Mandelc S., Timperman I., Radisek S., Devreese B., Samyn B., Javornik B. 2013. Comparative proteomic profiling in compatible and incompatible interactions between hop roots and *Verticillium albo-atrum*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 68: 23-31
- Mangeon A., Junqueira R. M., Sachetto-Martins G. 2010. Functional diversity of the plant glycine-rich proteins superfamily. *Plant Signaling and Behaviour*, 5, 2: 99–104
- Marathe R., Dinesh-Kumar S. P. 2003. Plant defense: one post, multiple guards?! *Molecular Cell*, 11: 284–286
- Marino D., Peeters N., Rivas S. 2012. Ubiquitination during plant immune signaling. *Plant Physiology*, 160, 1: 15-27
- Markakis E., Tjamos S., Antoniou P., Paplomatas E., Tjamos E. 2009. Symptom development, pathogen isolation and Real-Time QPCR quantification as factors for evaluating the resistance of olive cultivars to *Verticillium* pathotypes. *European Journal of Plant Pathology*, 124, 4: 603-611
- Mammarella N. D. 2010. The role of apoplastic peroxidases in the *Arabidopsis thaliana* defense response. Cambridge, Harvard university: 172 str.
- Maurer K. A., Berg G., Seefelder S. 2014. Research on *Verticillium* Wilt in Hop Growing Area Hallertau. *Gesund Pflanzen*, 66: 2; 53-61
- Melnyk C. W., Molnar A. in Baulcombe D. C. 2011. Intercellular and systemic movement of RNA silencing signals. *EMBO Journal*, 30: 3553–3563
- Mol L., van Riessen H.W. 1995. Effect of plant roots on the germination of microsclerotia of *Verticillium dahliae*. I. Use of root observation boxes to assess differences among crops. *European Journal Plant Pathology*, 101: 673–678
- Monaghan J., Weihmann T., Li X. 2009. Plant Innate Immunity. *Signaling and Communication in Plants*, 10: 119-136
- Morrison T. B., Weis J. J., Wittwer C. T. 1998. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques*, 24: 954-962
- Mou Z., Fan W., Dong X. 2003. Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell*, 113: 935–944
- Navarro L., Bari R., Achard P., Lisón P., Nemri A., Harberd N. P. 2008. DELLA's Control Plant Immune Responses by Modulating the Balance of Jasmonic Acid and Salicylic Acid Signaling. *Current Biology*, 189: 650-655

- Natsume S., Takagi H., Shiraishi A., Murata J., Toyonaga H., Patzak J., Takagi M., Yaegashi M., Uemura A., Mitsuoka C., Yoshida K., Krofta K., Satake H., Terauchi R., Ono E. 2015. The Draft Genome of Hop (*Humulus lupulus*), an Essence for Brewing. *Plant Cell Physiology*, 56, 3: 428-441
- Nawrath C., Métraux J.-P. 1999. Salicylic acid induction-deficient mutants of *Arabidopsis* express PR-2 and PR-5 and accumulate high levels of camalexin after pathogen inoculation. *Plant Cell*, 11: 1393–1404
- Nazar R. N., Hu X., Schmidt J., Culham D., Robb J. 1991. Potential use of PCR-amplified detection and differentiation of *Verticillium* wilt pathogens. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 39: 1-11
- Neve R. A. 1986. Centenary review hop breeding worldwide - its aims and achievements. *The Journal of The Institute of Brewing*, 92. 21-24
- Neve R. A. 1991. Hops. London, Chapman and Hall: 266 str.
- Nie W. F., Wang M. M., Xia X. J., Zhou Y. H., Kai S., Chen Z. 2013. Silencing of tomato RBOH1 and MPK2 abolishes brassinosteroid-induced H₂O₂ generation and stress tolerance. *Plant Cell Environment*, 36, 4: 789-803
- Nunes C. C., Dean R. A. 2012. Host-induced gene silencing: a tool for understanding fungal host interaction and for developing novel disease control strategies. *Molecular Plant Pathology*, 13, 5: 519-529
- Nürnberg T., Brunner F., Kemmerling B., Piater L. 2004. Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunological Reviews*, 198: 249–266
- O'Neill, T. M. 2002. First report of *Verticillium albo-atrum* causing wilt in Ve-resistant tomato in the United Kingdom. *Plant Pathology*, 51: 810
- Ortiz-Masia D., Perez-Amador M. A., Carbonell J., Marcote M. J. 2007. Diverse stress signals activate the C1 subgroup MAP kinases of *Arabidopsis*. *FEBS Letters*, 581: 1834-1840
- Palmer C. S., Saleeba J. A., in Lyon B. R. 2005. Phytotoxicity on cotton ex-plants of an 18.5 kDa protein from culture filtrates of *Verticillium dahliae*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 67: 308–318
- Parker J. S., Clark M. S. 1991. Dosage sex-chromosome systems in plants. *Chromosomes Today*, 10: 187-198
- Pasche J. S., Mallik I., Anderson N. R., Gudmestad N. C. 2013. Development and Validation of a Real-Time PCR Assay for the Quantification of *Verticillium dahliae* in Potato. *Plant Disease*, 97, 5: 608-618
- Passardi F., Longet D., Penel C., Dunand C. 2004. The class III peroxidase multigenic family in rice and its evolution in land plants. *Phytochemistry*, 65, 13: 1879-93

- Patnaik D., Khurana P. 2001. Germins and germin like proteins: an overview. Indian Journal of Experimental Biology, 39, 3: 191-200
- Patzak J., Vrba J., Matoušek J. 2006. New STS molecular markers for assessment of genetic diversity and DNA fingerprinting in hop (*Humulus lupulus L.*). Genome, 50, 1: 15-25
- Pavlovič M. 2014. International hop growers' convention: Economic Commission summary reports.
<http://www.hmelj-giz.si/ihgc/doc/IHGC%20hop%20supply.pdf> (24. 8. 2014).
- Pegg G. F., Street P. F. S. 1984. Measurement of *Verticillium albo-atrum* in high and low resistance hop cultivars. Transactions of the British Mycological Society, 82, 1: 99-106
- Pethybridge S. J., Hay F. S., Barbara D. J., Eastwell K. C., Wilson C. R. 2008. Viruses and viroids infecting hop: significance, epidemiology, and management. Plant Disease, 92: 324-338
- Petitot A. S., Barsalobres-Cavallari C., Ramiro D., Albuquerque Freire E., Etienne H., Fernandez D. 2013. Promoter analysis of the WRKY transcription factors CaWRKY1a and CaWRKY1b homoeologous genes in coffee (*Coffea arabica*). Plant Cell Reports, 32, 8: 1263-1276
- Presley J. T., Carns H. R., Taylor E. E., Schnathorst W. C. 1966. Movement of conidia of *Verticillium albo-atrum* in cotton plants. Phytopathology, 56: 375
- Polley A., Ganal M. W., Seigner E. 1997. Identification of sex in hop (*Humulus lupulus*) using molecular markers. Genome, 40: 357-361
- Qi M., Yang Y. 2002. Quantification of *Magnaporthe grisea* during infection of rice plants using real-time polymerase chain reaction and northern blot/phosphoimaging analyses. Phytopathology, 92: 870-876
- Radišek S. 2001. Analiza povzročiteljev hmeljeve uvelosti (*Verticillium* spp.) z molekulskimi markerji in umetnimi okužbami hmelja. Ljubljana, Univerza v Ljubljani: 61 str.
- Radišek S., Jakše J., Javornik B. 2003. Identifikacija dveh patotipov glive *Verticillium albo-atrum* na hmelju z molekulskimi markerji in umetnimi okužbami hmelja. V: Zbornik predavanj in referatov 6. slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin. Ljubljana, Društvo za varstvo rastlin Slovenije: 107-111
- Radišek S., Jakše J., Javornik B. 2004. Development of pathotype-specific SCAR markers for detection of *Verticillium albo-atrum* isolates from Hop. Plant Disease, 88, 10: 1115-1122

- Radišek S., Jakše J., Javornik B. 2006. Genetic variability and virulence among *Verticillium albo-atrum* isolates from hop. European Journal of Plant Pathology, 116: 301–314
- Reinke J., Berthold G. 1879. Die zersetzung der kartoffel durch pilze. Untersuchungen aus dem Botanischen Laboratorium der Universität Göttingen, Harvard University, Wiegandt, Hempel & Parey: 100 str.
- Remans T., Smeets K., Opdenakker K., Mathijssen D., Vangronsveld J., Cuypers A. 2008. Normalisation of real-time RT-PCR gene expression measurements in *Arabidopsis thaliana* exposed to increased metal concentrations. *Planta*, 227, 6: 1343-1349
- Reusche M., Thole K., Janz D., Truskina J., Rindfleisch S., Drübert C., Polle A., Lipka V., Teichmann T. 2012. *Verticillium* infection triggers VASCULAR-RELATED NAC DOMAIN7-dependent de novo xylem formation and enhances drought tolerance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 24: 3823 –3837
- Rietz S., Bernsdorff F. E., Cai D. 2012. Members of the germin-like protein family in *Brassica napus* are candidates for the initiation of an oxidative burst that impedes pathogenesis of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of Experimental Botany*, 63, 15: 5507-5519
- Ririe K. M., Rasmussen R. P., Wittwer C. T. 1997. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry*, 245: 154-160
- Robb J., Lee B., Nazar R. N. 2007. Gene suppression in a tolerant tomato-vascular pathogen interaction. *Planta*, 226: 299-309
- Robb J. 2007. *Verticillium* tolerance: resistance, susceptibility, or mutualism? *Canadian Journal of Botany*, 85: 903-910
- Robison M. M., Shah S., Tamot B., Pauls K. P., Moffat B. A., Glick B. R. 2001. Reduced symptoms of *Verticillium* wilt in transgenic tomato expressing a bacterial ACC deaminase. *Molecular Plant Pathology*, 2: 135-145
- Rodriguez, P. L. 1998. Protein phosphatase 2C (PP2C) function in higher plants. *Plant Molecular Biology*, 38, 6: 919-927
- Sanford J. C., Johnston S. A. 1985. The concept of parasite-derived resistance-deriving resistance genes from the parasite's own genome. *The Journal of Theoretical Biology*, 113: 395–405
- Santner A., Calderon-Villalobos L. I. A., Estelle M. 2009. Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. *Nature Chemical Biology*, 5: 301-307
- Santuari L., Scacchi E., Rodriguez-Villalon A., Salinas P., Dohmann Esther M. N., Brunoud G. 2011. Positional Information by Differential Endocytosis Splits Auxin

- Response to Drive *Arabidopsis* Root Meristem Growth. Current Biology, 21, 22: 1918-1923
- Schena L., Nigro F., Ippolito A., Gallitelli D. 2004. Real-time quantitative PCR: a new technology to detect and study phytopathogenic and antagonistic fungi. European Journal of Plant Pathology, 110: 893-908
- Schoch G. A., Nikov G. N., Alworth W. L., Werck-Reichhart D. 2002. Chemical inactivation of the cinnamate 4-hydroxylase allows for the accumulation of salicylic acid in elicited cells. Plant Physiology, 130, 2: 1022-1031
- Seo Y. S., Lee S. K., Song M. Y., Suh J. P., Han T. R., Ronald P., Jeon J. S. 2008. The HSP90-SCT1-RAR1 molecular chaperone complex: a core modulator in plant immunity. Journal of Plant Biology, 51: 1–10
- Sewell G. W. F. 1959. Direct observation of *Verticillium albo-atrum* in soil. Transactions of the British Mycological Society, 42: 312-321
- Shen Q. H., Sajio Y., Mauch S., Christoph B., Bieri S., Beat K., Hikary S., Üker B., Somssich I. E. , Schulze-Lefert P. 2007. Nuclear activity of MLA immune receptors links isolate-specific and basal disease-resistance responses. Science, 315: 1098-1103
- Shepard H. L., Parker J. S., Darby P., Ainsworth C. C. 2000. Sexual development and sex chromosomes in hop. New Phytologist, 148: 397-411
- Small E. 1978. A numerical and nomenclatural analysis of morphogeographic taxa of *Humulus*. System Botany, 3: 37-76
- Suarez-Rodriguez M. C., Adams-Phillips L., Liu Y., Wang H., Su S.-H., Jester P.J., Zhang S., Bent A.F., Krysan P.J. 2006. MEKK1 is required for flg22-induced MPK4 activation in *Arabidopsis* plants. Plant Physiology, 143: 661–669
- Sugimoto K., Gordon S. P., Meyerowitz E. M. 2011. Regeneration in plants and animals: Dedifferentiation, transdifferentiation, or just differentiation? Trends in Cell Biology, 21: 212–218
- Štajner N., Cregeen S., Javornik B. 2013. Evaluation of Reference Genes for RT-qPCR Expression Studies in Hop (*Humulus lupulus* L.) during Infection with Vascular Pathogen *Verticillium albo-atrum*. PLOS One, 8, 7: e68228, DOI: 10.1371/journal.pone.0068228, 13 str.
- Taddese B., Upton G. J. G., Bailey G. R., Jordan S. R. D., Abdulla N. Y., Reeves P. J., Reynolds C. A. 2014. Do Plants Contain G Protein-Coupled Receptors? Plant Physiology, 164, 1: 287-307
- Takeda K., Kaisho T., Akira S. 2003. Toll-like receptors. Annual Review of Immunology, 21: 335-376

- Talboys P. W. 1958a. Association of tylosis and hyperplasia of the xylem with vascular association of the hop by *Verticillium alboatrum*. Transactions of the British Mycological Society, 41: 249–260
- Talboys P. W. 1958b. Some mechanisms contributing to *Verticillium*-resistance in the hop root. Transactions of the British Mycological Society, 41: 227-241
- Talboys P. W. 1972. Resistance to vascular wilt fungi. Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences, 181: 319-332
- Tameling W. I. L., Vossen J. H., Albrecht M., Lengauer T., Berden J. A., Haring M. A., Cornelissen B. J. C., Takken F. L. W. 2006. Mutations in the NB-ARC domain of I-2 that impair ATP hydrolysis cause autoactivation. Plant Physiology, 140: 1233-1245
- Tang X., Frederick R. D., Zhou J., Halterman D. A., Jia Y., Martin G. B. 1996. Initiation of plant disease resistance by physical interaction of AvrPto and Pto kinase. Science, 274: 2060–2063
- Thomma B. P., Eggermont K., Penninckx I. A., Mauch-Mani B., Vogelsang R., Cammue B. P. 1998. Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. Proceedings of National Academy of Science, 95, 25: 15107-15111
- Thordal-Christensen H. 2003. Fresh insights into processes of nonhost resistance. Current Opinion in Plant Biology, 6, 4: 351-357
- Tomaszow M.F. 2001. So What's New in the Field of Plant Cold Acclimation? Lots! Plant Physiology, 125, 1: 89–93
- Torres M., Jones J., Dangl J. 2006. Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. Plant Physiology, 141: 373-378
- Trevisan M. T. S., Ramos Valdivia A. C., Scheffer J. J. C., Verpoorte R. 1997. Enzyme activities in cell suspension cultures of two hop cultivars after elicitation by a fungal culture filtrate. Biotechnology Letters, 19, 3: 207-212
- Tyagi S., Kamer F. R. 1996. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. Nature Biotechnology, 14: 303-308
- Ülker B., Somssich I. E. 2004. WRKY transcription factors: from DNA binding towards biological function. Current Opinion in Plant Biology, 7: 491–498
- Vallad, G. E., K. V. Subbarao. 2008. Colonization of resistant and susceptible lettuce cultivars by a green fluorescent protein-tagged isolate of *Verticillium dahliae*. Phytopathology, 98, 8: 871-885
- Vander Molen G. E., Labavitch J. M., Strand L. L., DeVay J. E. 1983. Pathogen-induced vascular gels: Ethylene as a host intermediate. Physiologia Plantarum, 59: 573–580

- Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paepe A. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3, 7: 1-12
- van Loon L., Rep M., Pieterse C. 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology*, 44: 135-162
- Veronese P., Narasimhan M. L., Stevenson R.A., Zhu J.-K., Weller S. C., Subbarao K. V., Bressan R. A. 2003. Identification of a locus controlling *Verticillium* disease symptom response in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 35: 574-587
- Vierstra R. D. 2009. The ubiquitin-26S proteasome system at the nexus of plant biology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10: 385–397
- Voinnet O. 2005. Non-cell autonomous RNA silencing. *FEBS Letters*. 579: 5858–5871
- Walker N. J. 2002. Tech.Sight. A technique whose time has come. *Science*, 296, 5567: 557-559
- Wang J. Y., Cai Y., Gou J. Y., Mao Y. B., Xu Y. H., Jiang W. H., Chen X. Y. 2004. VdNEP, an elicitor from *Verticillium dahliae*, induces cotton plant wilting. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 4989–4995
- Wang X., Ma X., Huang L., Zhang X. 2015. Identification of the valid reference genes for quantitative RT-PCR in annual ryegrass (*Lolium multiflorum*) under salt stress. *Molecules*, 20, 3: 4833-4847
- Wanner L., Li G., Ware D., Somssich I., Davis K. 1995. The phenylalanine ammonia-lyase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, 27, 2: 327-338
- Weiberg A., Wang M., Lin F. M., Zhao H., Zhang Z., Kaloshian I. 2013. Fungal small RNAs suppress plant immunity by hijacking host RNA interference pathways. *Science*, 342, 6154: 118-123
- Whitcombe D., Theaker J., Guy S. P., Brown T., Little S. 1999. Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. *Nature Biotechnology*, 17: 804-807
- Wiermer M., Feys B.J., Parker J.E. 2005. Plant immunity: the EDS1 regulatory node. *Current Opinion in Plant Biology*, 8: 383–389
- Wilhelm S. 1955. Longevity of the *Verticillium* wilt fungus in the laboratory and field. *Phytopathology*, 455: 180-181
- Winge O. 1929. On the nature of sex chromosomes in *Humulus*. *Hereditas*, 12: 53-63.
- Xie F. S. G., Stiller J. W., Zhang B. 2011. Genome-Wide Functional Analysis of the Cotton Transcriptome by Creating an Integrated EST Database. *PLoS ONE*, 6, 11: e26980, DOI: 10.1371/journal.pone.0026980: 12 str.
- Xu L., Zhu L., Tu L., Liu L., Yuan D., Jin L. 2011. Lignin metabolism has a central role in the resistance of cotton to the wilt fungus *Verticillium dahliae* as revealed by RNA-

- Seq-dependent transcriptional analysis and histochemistry. Journal of Experimental Botany, 62, 15: 5607-21
- Zare R., Gams W. 2001. A revision of *Verticillium* section *Prostrata*. V. The genus *Pochonia*, with notes on *Rotiferophthora*. Nova Hedwigia, 71: 329-337
- Zhang W. W., Jiang T. F., Cui X., Qi F. J., Jian G. L. 2013. Colonization in cotton plants by a green fluorescent protein labelled strain of *Verticillium dahliae*. European Journal of Plant Pathology, 135, 4: 867-876
- Zhang Y., Goritschnig S., Dong X., Li X. 2003. A gain-of-function mutation in a plant disease resistance gene leads to constitutive activation of downstream signal transduction pathways in suppressor of npr1-1, constitutive 1. Plant Cell, 15: 2636–2646
- Zhu Z. H, Liu W. H, Ge L. J, Yu Q., Zhao W. C., Yang J. H., Wan H. T. 2012. Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding cycloartenol synthase from *Fritillaria thunbergii* Miq. African Journal of Biotechnology, 11, 26: 6896-6903
- Zipfel C. 2008. Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. Current Opinion in Immunology, 20: 10-16

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici doc. dr. Nataši Štajner, ki mi je ves čas izdelave magistrskega dela nudila podporo v vseh pogledih. Nataša, hvala, ker si z menoj delila neprecenljivo znanje, izkušnje in iskreno ter kritično mnenje.

Zahvaljujem se dr. Sebastjanu Radišku za nasvete ter hiter, natančen in kritičen pregled magistrskega dela.

Zahvaljujem se vsem sodelavcem na Katedri za genetiko, biotehnologijo, statistiko in žlahtnjenje rastlin, saj sem z vami preživel veliko lepih trenutkov, se ogromno naučil in pridobil neprecenljive izkušnje ki me bodo spremljale na poklicni in osebni poti v prihodnosti.

Hvala profesorjem in asistentom študija biotehnologije, Biotehniške fakultete, ki so podali ogromno kvalitetnega znanja ter mi omogočili vrhunsko izhodišče za nadaljno študijsko in karierno pot. Posebna zahvala gre izr. prof. dr. Poloni Jamnik, prof. dr. Branki Javornik in asist. dr. Ireni Oven.

Zahvaljujem se tudi prof. Milanu Paviču ter članom košarkarske ekipe BF za vse lepe tekmovalne in družabne trenutke za časa študija.

Velika zahvala gre sošolcem in dobrim prijateljem s katerimi smo preživeli lepa in (pre)kratka leta na fakulteti. Brez vas leta študija ne bi bila enaka.

Iskreno se zahvaljujem vsem domačim še posebej Kaju, Žaku, Eleni in Gorazdu, za pomoč in pozitivne misli.

Tina, najlepša hvala za neprecenljivo podporo pri in izven nastajanja magisterske naloge. Hvala za vso spodbudo in najlepše nasmehe. :)

Vid, najlepša hvala za vse bratske, prijateljske in bio(tehno)loške pogovore ter študijske trenutke. Upam da iz njih nekoč nastane nekaj zares inovativnega. ;)

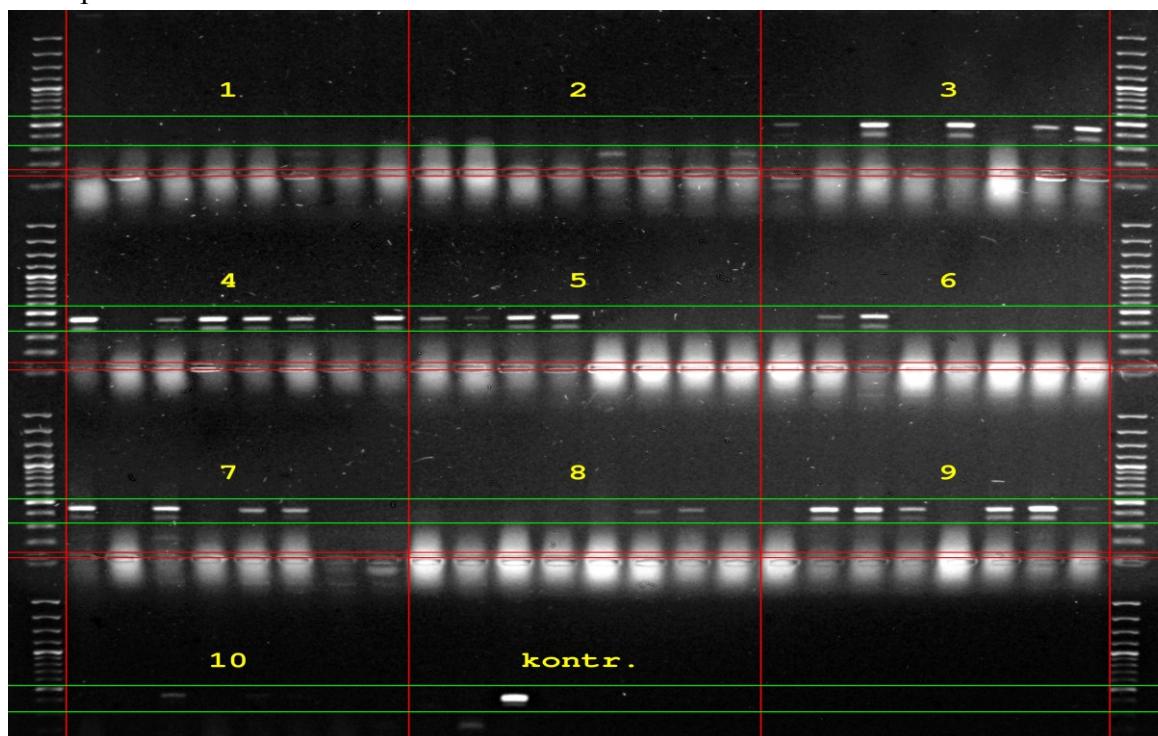
Babi, iskreno hvala za vse zgodbe, nasvete in spodbude in ker mi vedno stojiš ob strani.

Mami, iz srca se ti zahvaljujem za podporo pri vseh korakih in za vse pokazane poti. Verjamem da si me pripeljala na pravo.

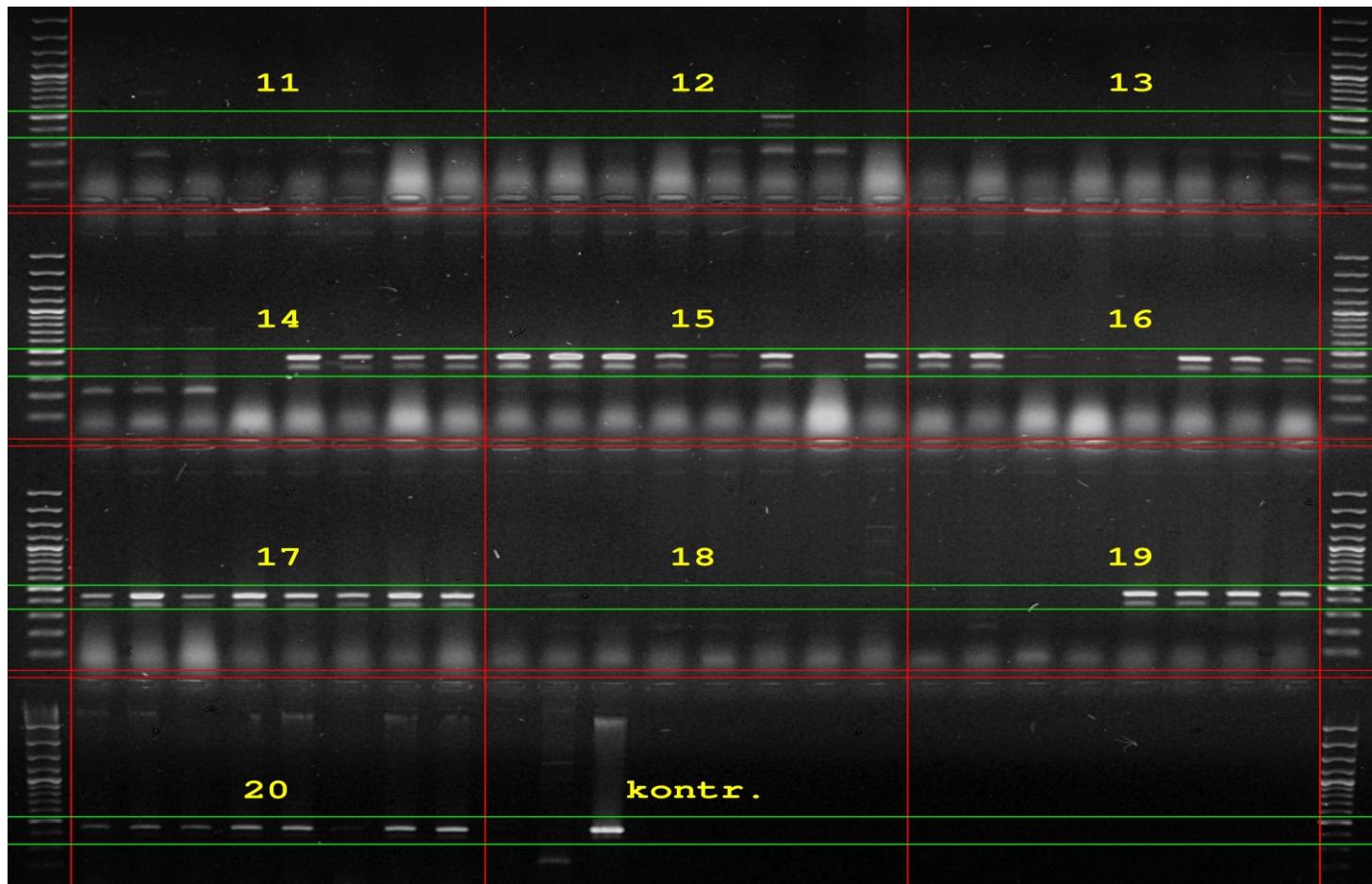
PRILOGA A

Test uspešnosti okuževanja hmelja z glivo *V. albo-atrum*

Števila predstavljajo različne biološke ponovitve (navedeno v prilogi B), zeleni pas predstavlja PCR produkte (svetla lisa) značilne za givno DNA, rdeči pasovi predstavljajo jamice, kamor smo nanesli PCR produkt. Skrajno levo in desno se nahaja dolžinski standard 100 bp.



Pril. A1: Reakcija PCR za potrditev okužbe hmelja z *V. albo-atrum*



Pril. A2: Reakcija PCR za potrditev okužbe hmelja z *V. albo-atrum*

PRILOGA B

Seznam vzorcev izolirane DNA s pripadajočimi koncentracijami ter redčitvami za nadaljnjo analizo glivne kolonizacije

Prvi set vzorcev 1-212 izoliral Švara Anže; Drugi set vzorcev 1-68 izolirala Marton Kristina

ID	Vzorec	Koncentracija DNA [ng/uL]	ug DNA	uL H2O/1 uL DNA
1	12WT-03R	68	136	3,4
2	12WT-09R	94	188	5,5
3	12WT-06R	113	226	7
4	12WT-10R	118	236	7,4
5	12WT-05R	129	258	8,3
6	12WT-07R	283	566	20,6
7	12WT-04R	233	466	16,6
8	12WT-02R	113	226	7
9	18WT-10R	104	208	6,3
10	18WT-07R	100	200	6
11	18WT-08R	40	80	1,2
12	18WT-04R	67	134	3,4
13	18WT-02R	243	486	17,4
14	18WT-03R	124	248	7,9
15	18WT-01R	204	408	14,3
16	18WT-05R	194	388	13,5
17	18WT-06R	40	80	1,2
18	18WT-09R	106	212	6,5
19	06WT+04R	103	206	6,2
20	06WT+11R	87	174	5
21	06WT+01R	191	382	13,3
22	06WT+07R	54	108	2,3
23	06WT+18R	212	424	15
24	06WT+10R	201	402	14,1
25	06WT+02R	209	418	14,7
26	06WT+14R	74	148	3,9
27	12WT+11R	107	214	6,6
28	12WT+14R	215	430	15,2
29	12WT+13R	143	286	9,4
30	12WT+07R	102	204	6,2
31	12WT+09R	112	224	7
32	12WT+19R	324	648	23,9
33	12WT+01R	125	250	8
34	12WT+18R	117	234	7,4

35	12WT+04R	206	412	14,5
36	12WT+10R	252	504	18,2
37	12WT+16R	89	178	5,1
38	12WT+20R	56	112	2,5
39	12WT+15R	59	118	2,7
40	12WT+12R	43	86	1,4
41	12WT+03R	66	132	3,3
42	12WT+02R	86	172	4,9
43	12WT+05R	255	510	18,4
44	12WT+08R	44	88	1,5
45	12WT+06R	21	42	-0,3
46	18WT+07R	47	94	1,8
47	18WT+08R	77	154	4,2
48	12WT+17R	50	100	2
49	18WT+10R	151	302	10,1
50	18WT+12R	62	124	3
51	18WT+03R	208	416	14,6
52	18WT+02R	48	96	1,8
53	18WT+05R	50	100	2
54	18WT+18R	50	100	2
55	18WT+14R	55	110	2,4
56	18WT+09R	30	60	0,4
57	18WT+04R	26	52	0,1
58	18WT+15R	111	222	6,9
59	18WT+16R	40	80	1,2
60	18WT+01R	55	110	2,4
61	18WT+06R	42	84	1,4
62	18WT+11R	40	80	1,2
63	18WT+17R	58	116	2,6
64	18WT+13R	57	114	2,6
65	18CE+09R	54	108	2,3
66	18CE+01R	191	382	13,3
67	18CE+06R	104	208	6,3
68	18CE+05R	100	200	6
69	18CE+10R	40	80	1,2
70	18CE+11R	90	180	5,2
71	18CE+13R	122	244	7,8
72	18CE+12R	71	142	3,7
73	18CE+04R	62	124	3
74	18CE+08R	20	40	-0,4
75	18CE+03R	109	218	6,7
76	18CE+02R	57	114	2,6

77	18CE+14R	107	214	6,6
78	18CE+07R	81	162	4,5
79	18CE-01R	104	208	6,3
80	18CE-04R	143	286	9,4
81	18CE-10R	102	204	6,2
82	18CE-08R	206	412	14,5
83	18CE-07R	160	320	10,8
84	18CE-02R	368	736	27,4
85	18CE-03R	203	406	14,2
86	18CE-09R	286	572	20,9
87	18CE-06R	50	100	2
88	18CE-05R	90	180	5,2
89	12CE-07R	90	180	5,2
90	12CE-08R	91	182	5,3
91	12CE-03R	116	232	7,3
92	12CE-04R	100	200	6
93	12CE-05R	120	240	7,6
94	12CE-06R	173	346	11,8
95	12CE-02R	184	368	12,7
96	12CE-09R	135	270	8,8
97	12CE-10R	200	400	14
98	12CE-01R	105	210	6,4
99	06CE-01R	120	240	7,6
100	06CE-02R	106	212	6,5
101	06CE-03R	110	220	6,8
102	06CE-04R	167	334	11,4
103	06CE-05R	156	312	10,5
104	06CE-06R	393	786	29,4
105	06CE-07R	211	422	14,9
106	06CE-08R	321	642	23,7
107	06CE-09R	167	334	11,4
108	06CE-10R	64	128	3,1
109	12CE+10R	118	236	7,4
110	12CE+11R	176	352	12,1
111	12CE+12R	96	192	5,7
112	12CE+13R	111	222	6,9
113	12CE+14R	183	366	12,6
114	12CE+01R	204	408	14,3
115	12CE+02R	198	396	13,8
116	12CE+03R	116	232	7,3
117	12CE+04R	162	324	11
118	12CE+05R	141	282	9,3

119	12CE+06R	35	70	0,8
120	12CE+07R	166	332	11,3
121	12CE+08R	105	210	6,4
122	12CE+09R	198	396	13,8
123	06CE+14R	74	148	3,9
124	06CE+01R	46	92	1,7
125	06CE+02R	115	230	7,2
126	06CE+03R	113	226	7
127	06CE+04R	132	264	8,6
128	06CE+05R	64	128	3,1
129	06CE+06R	98	196	5,8
130	06CE+07R	127	254	8,2
131	06CE+08R	96	192	5,7
132	06CE+09R	159	318	10,7
133	06CE+10R	166	332	11,3
134	06CE+11R	160	320	10,8
135	06CE+12R	229	458	16,3
136	06CE+13R	148	296	9,8
137	06WT-05R	129	258	8,3
138	06WT-08R	148	296	9,8
139	06WT-01R	152	304	10,2
140	06WT-06R	191	382	13,3
141	06WT-10R	169	338	11,5
142	06WT-04R	255	510	18,4
143	06WT-02R	313	626	23
144	06WT-09R	183	366	12,6
145	06WT-07R	168	336	11,4
146	06WT-03R	308	616	22,6
147	12WT-08R	150	300	10
148	12WT-01R	234	468	16,7
149	06WT+03R	292	584	21,4
150	06WT+05R	294	588	21,5
151	06WT+13R	218	436	15,4
152	06WT+19R	157	314	10,6
153	06WT+08R	558	1116	42,6
154	06WT+20R	191	382	13,3
155	06WT+06R	247	494	17,8
156	06WT+09R	321	642	23,7
157	06WT+16R	164	328	11,1
158	06WT+17R	219	438	15,5
159	06WT+12R	209	418	14,7
160	06WT+15R	198	396	13,8

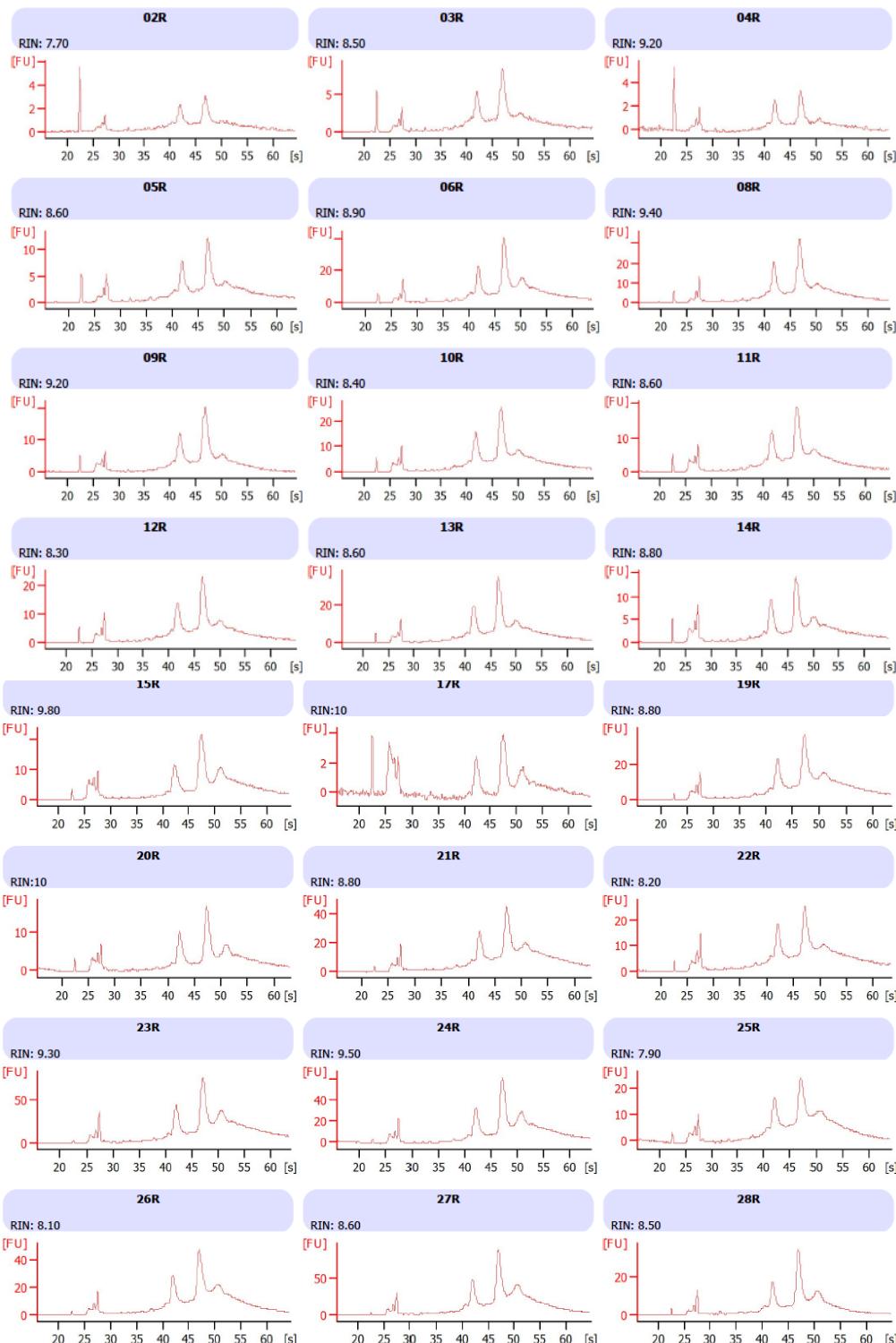
161	18CE+13S	230	460	16,4
162	18CE+01S	320	640	23,6
163	18CE+04S	151	302	10,1
164	18CE+11S	192	384	13,4
165	18CE+09S	313	626	23
166	18CE+03S	304	608	22,3
167	18CE+08S	156	312	10,5
168	18WT+16S	232	464	16,6
169	18WT+02S	211	422	14,9
170	18WT+06S	278	556	20,2
171	18WT+12S	297	594	21,8
172	18WT+17S	183	366	12,6
173	18WT+01S	357	714	26,6
174	18CE+12S	415	830	31,2
175	18CE+06S	232	464	16,6
176	18CE+10S	336	672	24,9
177	18CE+14S	258	516	18,6
178	18CE+02S	334	668	24,7
179	18CE+07S	287	574	21
180	18CE+05S	159	318	10,7
181	18WT+08S	494	988	37,5
182	18WT+10S	300	600	22
183	18WT+09S	289	578	21,1
184	18WT+07S	244	488	17,5
185	18WT+03S	324	648	23,9
186	18WT+05S	232	464	16,6
187	18WT+04S	467	934	35,4
188	18WT+14S	457	914	34,6
189	18WT+18S	458	916	34,6
190	18WT+15S	497	994	37,8
191	18CE-01S	368	736	27,4
192	18CE-05S	443	886	33,4
193	18CE-02S	273	546	19,8
194	18CE-07S	403	806	30,2
195	18CE-10S	362	724	27
196	18CE-03S	517	1034	39,4
197	18CE-06S	413	826	31
198	18CE-08S	593	1186	45,4
199	18CE-09S	503	1006	38,2
200	18CE-04S	620	1240	47,6
201	18WT-05S	524	1048	39,9
202	18WT-02S	578	1156	44,2

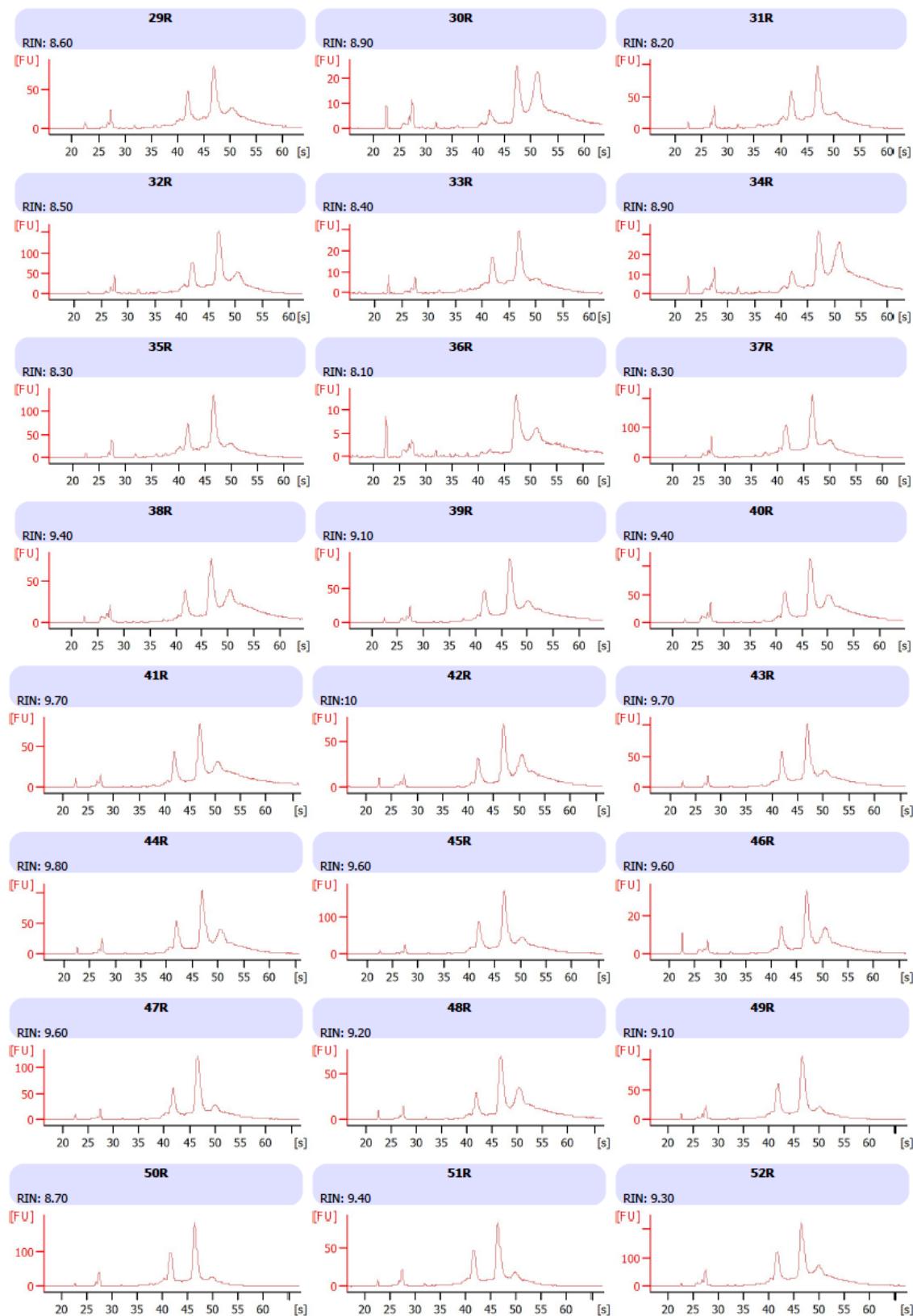
203	18WT-01S	545	1090	41,6
204	18WT-09S	422	844	31,8
205	18WT-06S	559	1118	42,7
206	18WT-10S	418	836	31,4
207	18WT-03S	425	850	32
208	18WT-08S	655	1310	50,4
209	18WT-04S	708	1416	54,6
210	18WT-07S	467	934	35,4
211	18WT+13S	474	948	35,9
212	18WT+11S	469	938	35,5
1	06CE+01S	753,0	753,0	29,72
2	06CE+02S	304,0	304,0	11,76
3	06CE+03S	399,0	399,0	15,56
4	06CE+04S	233,5	233,5	8,94
5	06CE+05S	192,5	192,5	7,3
6	06CE+06S	491,0	491,0	19,24
7	06CE+07S	1064,0	1064,0	42,16
8	06CE+08S	223,0	223,0	8,52
9	06CE+09S	364,0	364,0	14,16
10	06CE+10S	432,0	432,0	16,88
11	06CE+11S	134,0	134,0	4,96
12	06CE+12S	387,0	387,0	15,08
13	06CE+13S	330,5	330,5	12,82
14	06CE+14S	389,0	389,0	15,16
15	12CE+01S	325,0	325,0	12,6
16	12CE+02S	521,5	521,5	20,46
17	12CE+03S	389,5	389,5	15,18
18	12CE+04S	440,0	440,0	17,2
19	12CE+05S	247,5	247,5	9,5
20	12CE+06S	425,0	425,0	16,6
21	12CE+07S	337,0	337,0	13,08
22	12CE+08S	340,0	340,0	13,2
23	12CE+09S	249,0	249,0	9,56
24	12CE+10S	364,5	364,5	14,18
25	12CE+11S	265,5	265,5	10,22
26	12CE+12S	589,0	589,0	23,16
27	12CE+13S	405,0	405,0	15,8
28	12CE+14S	199,5	199,5	7,58
29	06WT+01S	231,0	231,0	8,84
30	06WT+02S	202,0	202,0	7,68
31	06WT+03S	245,0	245,0	9,4
32	06WT+04S	387,5	387,5	15,1

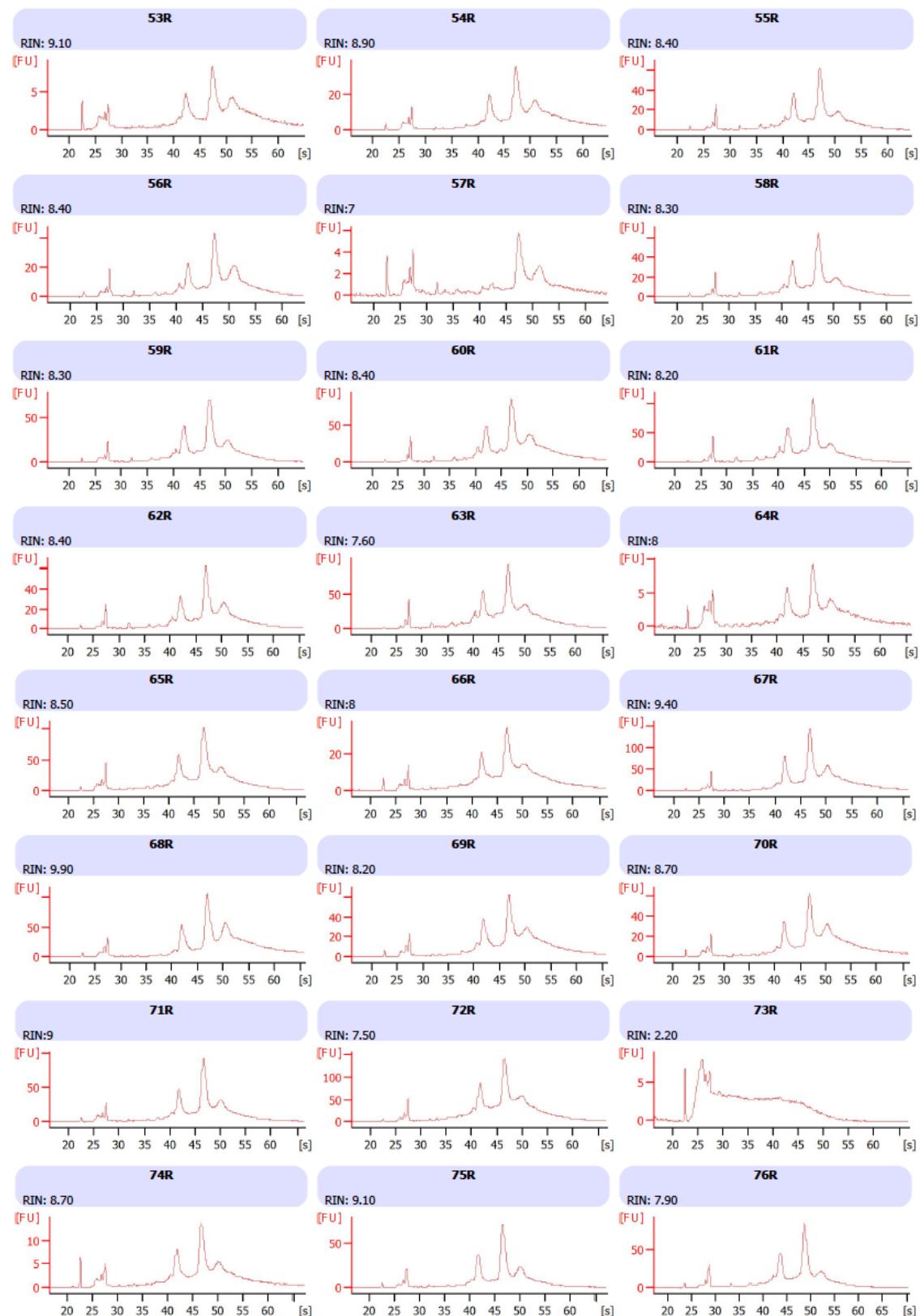
33	06WT+05S	272,5	272,5	10,5
34	06WT+06S	554,5	554,5	21,78
35	06WT+07S	174,0	174,0	6,56
36	06WT+08S	496,0	496,0	19,44
37	06WT+09S	162,5	162,5	6,1
38	06WT+10S	190,5	190,5	7,22
39	06WT+11S	569,5	569,5	22,38
40	06WT+12S	319,0	319,0	12,36
41	06WT+13S	468,5	468,5	18,34
42	06WT+14S	441,0	441,0	17,24
43	06WT+15S	213,5	213,5	8,14
44	06WT+16S	274,0	274,0	10,56
45	06WT+17S	246,5	246,5	9,46
46	06WT+18S	300,5	300,5	11,62
47	06WT+19S	255,0	255,0	9,8
48	06WT+20S	201,5	201,5	7,66
49	12WT+01S	348,0	348,0	13,52
50	12WT+02S	270,0	270,0	10,4
51	12WT+03S	317,5	317,5	12,3
52	12WT+04S	277,5	277,5	10,7
53	12WT+05S	236,5	236,5	9,06
54	12WT+06S	350,0	350,0	13,6
55	12WT+07S	325,5	325,5	12,62
56	12WT+08S	346,5	346,5	13,46
57	12WT+09S	309,5	309,5	11,98
58	12WT+10S	329,5	329,5	12,78
59	12WT+11S	342,5	342,5	13,3
60	12WT+12S	524,5	524,5	20,58
61	12WT+13S	217,5	217,5	8,3
62	12WT+14S	188,0	188,0	7,12
63	12WT+15S	172,5	172,5	6,5
64	12WT+16S	434,0	434,0	16,96
65	12WT+17S	499,0	499,0	19,56
66	12WT+18S	236,0	236,0	9,04
67	12WT+19S	172,5	172,5	6,5
68	12WT+20S	493,0	493,0	19,32

PRILOGA C

RIN test za izolirane RNA vzorce 2-76







PRILOGA D

Podatki za združene vzorce

Koncentracija izolirane RNA združenih vzorcev ter test RIN. Ime združenih vzorcev pove:
Število dni po inokulaciji (6, 12 in 18), Kultivar hmelja (CE - Celeia; WT - Wye Target),
Okužen ali neokužen vzorec (+ okužen; - neokužen), Rastlinski del (R-korenine; S-steblo)

Združeni vzorec	Vzorec 1	Vzorec 2	Vzorec 3	Koncentracija [ng/ul]	Absorban ca 260/230	Absorban ca 260/280	RIN
06CE-R1	06CE-04R	06CE-07R	06CE-10R	171,2	0,289	1,202	8,5
06CE-R2	06CE-09R	06CE-01R	06CE-06R	496,4	1,304	1,961	8,9
06CE-R3	06CE-05R	06CE-02R	06CE-08R	108,2	0,213	1,031	9,2
06CE-S1	06CE-05S	06CE-07S	06CE-08S	252,8	2,469	2,086	8,6
06CE-S2	06CE-10S	06CE-03S	06CE-06S	139,6	1,390	1,876	8,8
06CE-S3	06CE-09S	06CE-04S	06CE-02S	298,8	0,909	1,754	9,8
06CE+R1	06CE+03R	06CE+08R	06CE+13R	309,0	0,708	1,667	9,2
06CE+R2	06CE+05R	06CE+11R	06CE+12R	205,2	0,558	1,474	9,6
06CE+R3	06CE+10R	06CE+06R	06CE+09R	351,6	1,194	1,816	9,6
06CE+S1	06CE+04S	06CE+03S	06CE+12S	546,8	1,543	1,953	8,3
06CE+S2	06CE+11S	06CE+07S	06CE+08S	331,6	1,357	1,846	9,1
06CE+S3	06CE+05S	06CE+06S	06CE+10S	371,2	1,343	1,852	9,4
06WT-R1	06WT-05R	06WT-02R	06WT-10R	210,8	0,193	0,953	8,1
06WT-R2	06WT-08R	06WT-01R	06WT-09R	242,8	1,445	1,903	8,3
06WT-R3	06WT-07R	06WT-03R	06WT-06R	228,4	0,775	1,779	8,9
06WT-S1	06WT-05S		06WT-08S	285,2	1,901	2,067	7,9
06WT-S2	06WT-06S	06WT-01S	06WT-03S	408,8	1,632	2,032	8,1
06WT-S3	06WT-10S	06WT-02S		559,6	1,776	2,030	8,6
06WT+R1	06WT+03 R	06WT+12R	06WT+20 R	686,0	1,849	2,077	7,6
06WT+R2	06WT+16 R	06WT+15R	06WT+19 R	707,6	2,033	2,101	8,2
06WT+R3	06WT+04 R	06WT+05R	06WT+08 R	448,0	1,672	2,082	8,4
06WT+S1	06WT+03 S	06WT+05S	06WT+09 S	580,8	1,546	1,949	7,5

»se nadaljuje«

»nadaljevanje priloge D: Koncentracija izolirane RNA združenih vzorcev ter test RIN.
 Ime združenih vzorcev pove: Število dni po inokulaciji (6, 12 in 18), Kultivar hmelja (CE - Celeia; WT - Wye Target), Okužen ali neokužen vzorec (+ okužen; - neokužen), Rastlinski del (R-korenine; S-steblo)

Združeni vzorec	Vzorec 1	Vzorec 2	Vzorec 3	Koncentracij a [ng/ul]	Absorba nca 260/230	Absorban ca 260/280	RIN
06WT+S2	06WT+08S	06WT+15S	06WT+01S	457,2	1,095	1,856	8,7
06WT+S3	06WT+02S	06WT+10S	06WT+04S	446,4	0,889	1,815	9
12CE-R1	12CE-09R	12CE-03R	12CE-05R	23,0	0,343	1,304	
12CE-R2	12CE-02R	12CE-01R	12CE-10R	136,8	0,172	0,934	7,7
12CE-R3	12CE-09R	12CE-03R	12CE-05R	372,8	1,983	2,090	7,9
12CE-R1	12CE-07R	12CE-08R	12CE-04R	181,2	1,228	1,911	8,6
12CE-S1	12CE-04S	12CE-08S	12CE-03S	67,6	1,565	1,837	
12CE-S2	12CE-07S	12CE-05S	12CE-02S	27,6	0,486	1,302	
12CE-S2	12CE-07S	12CE-05S	12CE-02S	119,6	1,574	2,034	2,2
12CE-S1	12CE-04S	12CE-08S	12CE-03S	74,0	0,774	1,623	8,7
12CE-S3	12CE-10S	12CE-09S	12CE-01S	93,6	1,367	1,786	10
12CE+R1	12CE+14R	12CE+07R	12CE+05R	331,6	1,417	1,969	9,6
12CE+R2	12CE+13R	12CE+02R	12CE+03R	363,6	2,230	1,870	9,7
12CE+R3	12CE+01R	12CE+12R	12CE+09R	355,6	1,106	1,796	9,8
12CE+S1	12CE+08S	12CE+13S	12CE+11S	456,0	1,615	1,922	9,4
12CE+S2	12CE+12S	12CE+09S	12CE+01S	391,6	1,561	1,942	9,7
12CE+S3	12CE+02S	12CE+05S	12CE+13S	293,6	2,050	2,073	10
12WT-R1	12WT-10R	12WT-09R	12WT-02R	247,2	1,493	1,850	8,2
12WT-R2	12WT-07R	12WT-06R	12WT-01R	196,0	0,636	1,696	8,4
12WT-R3	12WT-04R	12WT-05R	12WT-03R	619,2	1,562	1,969	8,5
12WT-S1	12WT-02S	12WT-01S	12WT-04S	294,8	2,059	2,036	8,2
12WT-S2	12WT-05S	12WT-08S	12WT-10S	451,6	1,991	2,023	8,8
12WT-S3	12WT-03S	12WT-09S	12WT-07S	735,6	2,229	2,095	9,3
12WT+R1	12WT+04R	12WT+07R	12WT+14R	636,0	1,911	2,092	8,3

»se nadaljuje«

»nadaljevanje priloge D: Koncentracija izolirane RNA združenih vzorcev ter test RIN.
Ime združenih vzorcev pove: Število dni po inokulaciji (6, 12 in 18), Kultivar hmelja (CE - Celeia; WT - Wye Target), Okužen ali neokužen vzorec (+ okužen; - neokužen), Rastlinski del (R-korenine; S-steblo)

Združeni vzorec	Vzorec 1	Vzorec 2	Vzorec 3	Koncen- tracija [ng/µl]	Absorba- nca 260/230	Absorba- nca 260/280	RIN
12WT+R2	12WT+10R	12WT+11R	12WT+05R	559,6	1,959	2,091	8,3
12WT+R3	12WT+01R	12WT+13R	12WT+19R	891,6	1,853	2,081	8,4
12WT+S1	12WT+01S	12WT+02S	12WT+07S	369,6	1,061	1,863	8,2
12WT+S2	12WT+10S	12WT+04S	12WT+05S	668,0	1,594	1,998	9,4
12WT+S3	12WT+13S	12WT+14S	12WT+11S	930,8	1,764	2,047	9,9
18CE-R1	18CE-05R	18CE-01R	18CE-04R	44,0	0,315	1,170	
18CE-R2	18CE-05R	18CE-01R	18CE-04R	266,8	1,088	1,788	9,1
18CE-R3	18CE-08R	18CE-09R	18CE-06R	160,8	0,914	1,787	9,2
18CE-R4	18CE-10R	18CE-07R	18CE-03R	323,6	1,113	1,899	9,4
18CE-S1	18CE-05S	18CE-06S	18CE-04S	214,0	2,624	2,082	8,3
18CE-S2	18CE-09S	18CE-08S	18CE-01S	198,0	2,570	2,080	8,4
18CE-S3	18CE-07S	18CE-10S	18CE-03S	171,6	1,625	1,997	8,6
18CE+R1	18CE+04R	18CE+13R	18CE+11R	457,6	1,663	2,096	8,7
18CE+R2	18CE+03R	18CE+06R	18CE+05R	358,4	1,524	2,032	9,1
18CE+R3	18CE+10R	18CE+07R	18CE+09R	280,0	1,362	2,006	9,4
18CE+S1	18CE+12S	18CE+06S	18CE+14S	499,6	1,922	2,085	8,9
18CE+S2	18CE+05S	18CE+07S	18CE+13S	130,0	1,540	2,070	9,1
18CE+S3	18CE+01S	18CE+03S	18CE+11S	705,6	2,164	2,110	9,3
18WT-R1	18WT-03R	18WT-02R	18WT-01R	262,8	0,615	1,672	8,5
18WT-R2	18WT-07R	18WT-09R	18WT-05R	438,8	1,136	1,935	8,6
18WT-R3	18WT-08R	18WT-10R	18WT-04R	261,6	0,497	1,450	8,9
18WT-S1	18WT-01S	18WT-03S	18WT-07S	241,6	1,598	1,948	8,8
18WT-S2	18WT-09S	18WT-02S	18WT-05S	538,0	2,183	2,085	9,5
18WT-S3	18WT-10S	18WT-04S	18WT-08S	219,6	1,102	1,880	10

»se nadaljuje«

»nadaljevanje preiloge D: Koncentracija izolirane RNA združenih vzorcev ter test RIN.
Ime združenih vzorcev pove: Število dni po inokulaciji (6, 12 in 18), Kultivar hmelja (CE - Celeia; WT - Wye Target), Okužen ali neokužen vzorec (+ okužen; - neokužen), Rastlinski del (R-korenine; S-steblo)

Združeni vzorec	Vzorec 1	Vzorec 2	Vzorec 3	Koncentracija [ng/ul]	Absorban ca 260/230	Absorban ca 260/280	RIN
18WT+ R1	18WT+01 R	18WT+08 R	18WT+11R	163,6	0,131	0,776	7
18WT+ R2	18WT+09 R	18WT+13 R	18WT+R04	616,4	1,999	2,097	8,4
18WT+ R3	18WT+14 R	18WT+06 R	18WT+18R	353,6	0,526	1,596	8,4
18WT+S 1	18WT+05 S	18WT+09 S	18WT+10S	120,8	0,493	1,589	8
18WT+S 2	18WT+08 S	18WT+07 S	18WT+13S	384,4	1,434	1,930	8
18WT+S 3	18WT+01 S	18WT+11 S	18WT+14S	806,8	2,209	2,121	8,5

PRILOGA E

Prikaz vrednosti povprečij diferencialnega izražanja tarčnih genov

Rezultat diferencialnega izražanja tarčnih genov izražen kot log-2 izračuna v primerjavi med okuženimi in neokuženimi vzorci pri sortah Celeia (CE) in Wye Target (WT) v koreninah (R) in steblih (S) v časovnih točkah 6, 12 in 18 dpi. Izračuni prikazujejo povprečje treh bioloških ponovitev ter standardno deviacijo

	HO059224			HO059063			HO059122			HO059225			HO059229			HO059238		
	6dpi	12dpi	18dpi															
CE, R	-3,35	-0,72	1,27	-1,97	-2,05	0,44	-0,93	3,59	-0,92	-1,41	-0,91	-1,24	-2,38	-0,93	-1,56	-2,52	-0,48	-1,60
WT, R	-0,90	-2,00	1,54	-0,80	-1,84	1,34	1,46	1,23	-2,06	1,96	0,21	4,88	1,46	-0,89	0,45	-1,30	-1,03	-0,77
CE, S	-0,39	-0,54	-3,41	0,17	-0,55	-2,71	0,17	1,91	0,56	0,37	0,31	1,02	0,82	-1,01	1,17	0,48	0,45	0,76
WT, S	2,24	0,24	1,41	1,90	0,08	1,21	1,63	2,18	0,04	3,33	0,38	1,78	2,93	0,75	0,74	1,97	-0,22	-0,33
stdev																		
CE, R	0,44	0,05	0,94	0,29	0,55	0,57	0,26	0,30	0,17	0,94	0,32	0,09	0,81	0,11	0,30	0,40	0,03	0,32
WT, R	0,14	0,02	1,53	1,11	0,25	1,49	0,12	0,09	1,41	0,72	0,02	3,43	0,90	1,00	0,12	0,04	0,86	0,49
CE, S	0,21	0,16	0,66	0,03	0,32	1,04	0,09	0,44	0,15	0,17	0,01	0,12	0,78	0,07	0,47	0,01	0,17	0,40
WT, S	0,01	0,07	1,03	0,18	0,14	0,96	0,39	0,19	0,01	0,01	0,02	0,67	0,36	0,57	0,41	0,31	0,27	0,40

»se nadaljuje«

»nadaljevanje priloge E: Rezultat diferencialnega izražanja tarčnih genov izražen kot log-2 izračuna v primerjavi med okuženimi in neokuženimi vzorci pri sortah Celeia (CE) in Wye Target (WT) v koreninah (R) in steblih (S) v časovnih točkah 6, 12 in 18 dpi.
 Izračuni prikazujejo povprečje treh bioloških ponovitev ter standardno deviacijo

HO059256				HO059263				HO059234				HO059267				PAL1_ARATH1156			PRX5217103		
	6dpi	12dpi	18dpi	6dpi	12dpi	18dpi	6dpi	12dpi	18dpi	6dpi	12dpi	18dpi	6dpi	12dpi	18dpi	6dpi	12dpi	18dpi			
CE, R	1,00	0,32	-1,76	0,01	1,76	-0,26	-5,90	-0,49	-1,30	3,33	1,23	2,95	-1,17	0,63	0,44	-0,08	-0,86	-0,46			
WT, R	-0,56	0,85	1,77	-0,35	-0,99	-0,76	-3,36	-1,85	1,65	-0,88	-0,92	-3,43	-2,02	1,28	-0,54	-1,38	1,38	-1,85			
CE, S	1,65	-0,69	-1,46	1,53	-1,45	2,41	1,27	-1,55	0,30	3,43	0,48	1,91	1,37	-0,84	0,63	0,41	0,37	-0,55			
WT, S	3,79	-1,85	-0,74	1,20	3,43	-0,31	0,97	0,69	-0,07	3,46	-1,40	-2,01	-1,07	-2,15	-1,01	-1,14	-1,56	-1,00			
stdev																					
CE, R	1,11	0,16	0,29	0,08	1,71	0,19	1,20	0,57	0,09	0,29	0,14	0,07	0,24	0,14	0,32	0,59	0,29	0,57			
WT, R	0,77	0,68	0,48	0,13	0,89	0,86	0,73	0,22	0,14	1,21	0,33	0,00	2,23	0,67	0,00	1,86	0,22	0,00			
CE, S	0,80	0,82	0,54	0,03	0,77	0,07	0,13	0,50	0,36	1,13	0,01	0,13	0,22	0,68	0,31	0,12	0,24	0,63			
WT, S	0,14	0,20	0,32	0,24	0,86	0,34	0,07	0,75	0,05	0,41	0,14	1,12	0,93	1,52	0,65	0,77	0,37	0,00			
PRX346815				GER34511				MPK116136				MPK17621				PRXIIF8556					
	6dpi	12dpi	18dpi	6dpi	12dpi	18dpi	6dpi	12dpi	18dpi	6dpi	12dpi	18dpi	6dpi	12dpi	18dpi	6dpi	12dpi	18dpi			
CE, R	-2,26	-0,07	-1,57	0,00	0,00	-2,18	-1,59	-1,26	-1,47	-1,24	-0,63	-1,65	-1,63	-0,30	-1,51						
WT, R	-1,07	-1,14	-0,61	0,00	0,00	2,45	0,66	-1,12	0,60	-1,63	-1,01	-0,42	-0,32	1,17	0,41						
CE, S	0,29	-0,69	0,75	0,53	-1,04	-0,80	0,19	0,07	0,22	0,62	0,31	0,30	0,57	0,44	0,60						
WT, S	2,01	-0,51	-0,48	0,03	1,10	1,16	0,22	0,37	0,21	2,56	-0,86	-0,54	2,25	-0,26	0,40						
stdev																					
CE, R	1,06	1,35	0,74	0,00	0,00	0,99	0,19	0,07	0,22	0,11	0,13	0,18	0,65	0,02	0,32						
WT, R	0,22	0,40	0,00	0,00	0,00	7,07	0,22	0,37	0,21	0,07	0,41	0,37	0,22	0,47	0,52						
CE, S	0,09	0,49	0,75	1,09	0,27	0,65	0,03	0,58	0,05	0,13	0,17	0,17	0,37	0,06	0,10						
WT, S	0,54	0,20	0,35	1,82	1,44	3,43	0,17	0,17	0,14	0,73	0,23	0,20	0,33	0,05	0,40						

PRILOGA F

Vrednosti relativne količine glivne DNA za posamezne vzorce v koreninah (R) in steblih (S) sorte Wye Target (WT) in Celeia (CE) v treh časovnih točkah (6, 12 in 18 dpi)

Rastlinski del Vzorec	Časovna točka		
	6 dpi	12 dpi	18 dpi
CE,S1	0,024	0,053	0,195
CE,S2	0,020	0,049	0,179
CE,S3	0,017	0,034	0,556
CE,R1	1,000	0,842	1,000
CE,R2			0,408
CE,R3	0,198	0,951	0,047
WT,R1	0,212	0,334	0,003
WT,R2	0,112	0,114	0,012
WT,R3	0,136	0,666	0,010
WT,S1	0,002	0,005	0,161
WT,S2	0,003	0,111	0,147
WT,S3	0,016	0,011	0,232