

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
MEDODDELČNI ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Eva TOMŠIČ

**JASMONSKA IN SALICILNA KISLINA V
KROMPIRJU ODPORNEM NA OKUŽBO S
KROMPIRJEVIM VIRUSOM PVY^{NTN}**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**JASMONIC AND SALICYLIC ACID IN POTATO
RESISTANT TO POTATO VIRUS PVY^{NTN} INFECTION**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2008

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije. Večinoma je bilo opravljeno na Oddelku za rastlinsko fiziologijo in biotehnologijo Nacionalnega inštituta za biologijo v Ljubljani, manjši del pa na Katedri za rastlinsko fiziologijo Univerze Bochum v Nemčiji (Ruhr-Universität Bochum, Germany).

Študijska komisija univerzitetnega študija mikrobiologije je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Majo Ravnikar, za somentorico prof. dr. Majo Kovač in za recenzentko prof. dr. Marino Dermastia.

Mentorica: prof. dr. Maja RAVNIKAR

Somentorica: prof. dr. Maja KOVAČ

Recenzentka: prof. dr. Marina DERMASTIA

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Ines MANDIČ MULEC
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: prof. dr. Marina DERMASTIA
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Maja KOVAČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Maja RAVNIKAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

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

Eva Tomšič

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 632.38:578.864:577.17:633.491(043)=163.6
KG	bolezni rastlin/virusne okužbe krompirja/jasmonska kislina/salicilna kislina/krompir/ <i>Solanum tuberosum</i> L./PVY ^{NTN}
AV	TOMŠIČ, Eva
SA	RAVNIKAR, Maja (mentorica)/KOVAČ, Maja (somentorica)/DERMASTIA, Marina (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2008
IN	JASMONSKA IN SALICILNA KISLINA V KROMPIRJU ODPORNEM NA OKUŽBO S KROMPIRJEVIM VIRUSOM PVY ^{NTN}
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XI, 78 str., 1 pregl., 19 sl., 90 vir.
IJ	sl
JI	sl/en

AI

V okviru diplomskega dela smo skušali ugotoviti ali sta jasmonska (JA) in salicilna kislina (SA) vpleteni v odziv dveh odpornih sort krompirja na virusno okužbo. Za okužbo smo uporabili krompirjev virus Y^{NTN}, ki je v Sloveniji naredil že veliko škode s povzročitvijo prstanaste nekroze gomoljev krompirja. Proučevali smo zgodnji odziv dveh odpornih sort krompirja, 'Sante' in 'Carlingford', in sicer uro in tri ure po slepi inokulaciji in inokulaciji s PVY^{NTN}. Količino SA in JA in fitodienojske kisline (PDA) smo v obeh sortah krompirja določali z metodo GC-MS, medtem ko smo SA v krompirju sorte 'Sante' analizirali tudi s HPLC. Največje povišanje JA smo izmerili uro in tri ure po slepi inokulaciji v spodnjih inokuliranih listih pri obeh sortah krompirja. Podoben trend smo opazili tudi pri analizi PDA. Po okužbi s PVY^{NTN} nismo zasledili značilnih sprememb v količini JA, medtem ko spremembe v PDA kažejo na vlogo jasmonatov pri okužbi s PVY^{NTN}. Bazalni nivo SA ni pokazatelj odpornosti rastlin krompirja na okužbo s PVY^{NTN}. Pri odporni sorti 'Sante' smo z uporabo metode HPLC opazili trend zviševanja proste SA v spodnjih inokuliranih listih tako eno uro kot tri ure po okužbi. Tega nam analiza z metodo GC-MS ni potrdila. 'Sante' in 'Carlingford' sta obe odporni sorti krompirja, odpornost pa je posledica različnih genov.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 632.38:578.864:577.17:633.491(043)=163.6
CX plant diseases/potato virus infection/jasmonic acid/salicylic acid/potato/
(*Solanum tuberosum* L.)/PVY^{NTN}
AU TOMŠIČ, Eva
AA RAVNIKAR, Maja (supervisor)/ KOVAČ, Maja (co-advisor)/DERMASTIA,
Marina (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme
in Microbiology
PY 2008
TI JASMONIC AND SALICYLIC ACID IN POTATO RESISTANT TO
POTATO VIRUS PVY^{NTN} INFECTION
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XI, 78 p., 1 tab., 19 fig., 90 ref.
LA sl
AL sl/en

AB The aim of graduation thesis was to investigate the involvement of jasmonic acid (JA) and salicylic acid (SA) in the early defence of potato plants (*Solanum tuberosum* L.) against potato virus PVY^{NTN}. The plants were infected with potato virus Y^{NTN}, which had already caused a lot of damage to potato crops in Slovenia, causing 'tuber necrosis ring disease'. For the investigation of an early plant response two resistant cultivars of potato plants were used, cv. 'Sante' and cv. 'Carlingford'. To study the role of JA, SA and phytydienoic acid (PDA) in plant-virus interactions the endogenous content and distribution of JA, SA and PDA were determined in both cultivars by GC-MS in intact, mock-inoculated and with potato virus Y^{NTN} infected potato, one 1 and 3 hours post infection. HPLC was used to evaluate the amount of SA in the potato (*Solanum tuberosum* L.) cv. 'Sante'. The amount of JA significantly increased one and three hours after mock inoculation in lower inoculated leafs of both cultivars of potato plants. Similar trends were also recorded for PDA, a precursor of JA. In the case of JA no expected response to infection with PVY^{NTN} was received, although differences in PDA might show a role of jasmonates in the infection. The basal levels of SA are not correlated with the resistance of potato plants to the PVY^{NTN} infection. With HPLC a significant increase of SA 1 and 3 hours post infection were detected in the lower inoculated leafs of extremely resistant cv. 'Sante', however this was not the case with the analysis by GC-MS. Potato cultivars 'Sante' and 'Carlingford' are both resistant on a PVY^{NTN} infection and their resistance is a consequence of different genes.

KAZALO

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VII
KAZALO SLIK	VIII
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 KROMPIRJEV VIRUS PVY ^{NTN}	2
2.1.1 Odziv različnih sort krompirja na okužbo s PVY ^{NTN}	4
2.2 JASMONSKA KISLINA	6
2.2.1 Jasmonati	6
2.2.2 JA kot rastlinski hormon	8
2.2.3 JA in ranitev	10
2.2.3.1 Oktadekanoidna signalna pot in biosinteza JA.....	10
2.2.3.2 Lokalni in sistemski odziv rastlin na ranitev	10
2.2.4 JA in okužba z virusi	12
2.3 SALICILNA KISLINA	13
2.3.1 Biosinteza salicilne kisline	14
2.3.1.1 Fenilpropanoidna pot biosinteze SA	15
2.3.1.2 Korizmat/izokorizmatna pot biosinteze SA.....	16
2.3.2 Metaboliti salicilne kisline	17
2.3.3 Transport SA	18
2.3.4 SA kot rastlinski hormon.....	18
2.3.5 Delovanje SA pri virusni okužbi	19
2.4 GENTISKA KISLINA	20
2.5 OD SA IN JA ODVISNI OBRAMBNI ODZIVI RASTLINE	22
2.6 NAMEN IN HIPOTEZA	23
3 MATERIALI IN METODE	25
3.1 RASTLINSKI MATERIAL	25
3.1.1 Priprava rastlinskega materiala za analizo jasmonske (JA), fitodienojske (PDA), salicilne (SA) in gentiske (GA) kisline v listih in koreninah krompirja.....	25
3.1.2 Sorte krompirja <i>Solanum tuberosum</i> L.	28
3.2 METODE	29
3.2.1 Metoda I – Ekstrakcija in analiza salicilne (SA) in gentiske kisline (GA) s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC).....	29
3.2.1.1 Potek ekstrakcije	29
3.2.1.2 Analiza salicilne in gentiske kisline	31
3.2.2 Metoda II – Ekstrakcija in analiza salicilne (SA), jasmonske (JA) in fito-dienojske kisline (PDA) s plinsko kromatografijo sklopljeno z masno spektrometrijo (GC-MS).32	
3.2.2.1 Potek ekstrakcije.....	32
3.2.2.2 Kolonska kromatografija.....	34
3.2.2.3 Priprava vzorca za GC/MS analizo	34

3.2.2.4 Plinska kromatografija – Masna spektrometrija (GC-MS).....	35
3.2.3 Statistična obdelava podatkov	36
4 REZULTATI	37
4.1 METODA I – HPLC ANALIZA SALICILNE (SA) IN GENTISKE KISLINE (GA) TER NJUNIH KONJUGATOV PRI KROMPIRJU SORTE 'SANTE' 1 IN 3 URE PO OKUŽBI S PVY ^{NTN}	37
4.1.1 Notranji standard.....	37
4.1.2 Analiza salicilne kisline	38
4.1.3 Analiza gentiske kisline	40
4.2 METODA II –ANALIZA SALICILNE (SA), JASMONSKE (JA), IN FITODIENOJSKE KISLINE (PDA) Z GC-MS PRI RAZLIČNO ODPORNIH SORTAH KROMPIRJA 1 IN 3 URE PO OKUŽBI S PVY ^{NTN}	42
4.2.1 Bazalni nivo SA, JA in PDA v listih in koreninah rastlin krompirja sort 'Carlingford' in 'Sante'	42
4.2.2 SA, JA in PDA v listih in koreninah rastlin krompirja sort 'Carlingford' in 'Sante' po slepi inokulaciji ter okužbi s PVY ^{NTN}	44
4.2.2.1 Sorta 'Carlingford' – 1. poskus	44
4.2.2.1.1 Analize salicilne kisline.....	44
4.2.2.1.2 Analize jasmonske in fitodienojske kisline.....	46
4.2.2.2 Sorta 'Carlingford' – 2. poskus	48
4.2.2.2.1 Analize salicilne kisline.....	48
4.2.2.2.2 Analize jasmonske in fitodienojske kisline.....	50
4.2.2.3 Sorta 'Sante'	52
4.2.2.3.1 Analize salicilne kisline.....	52
4.2.2.3.2 Analize jasmonske in fitodienojske kisline.....	54
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	56
5.1 EKSTRAKCIJA IN ANALIZA SALICILNE IN GENTISKE KISLINE IZ RASTLIN KROMPIRJA S HPLC.....	56
5.1.1 Vpliv okužbe na endogeno količino SA in GA.....	58
5.2 ANALIZA JASMONSKE, FITODIENOJSKE IN SALICILNE KISLINE IZ RASTLIN KROMPIRJA SORTE 'SANTE' IN 'CARLINGFORD' Z GC-MS	59
5.2.1 Bazalni nivo JA, SA in PDA v odpornih sortah krompirja	60
5.2.2 Vpliv slepe inokulacije in okužbe s PVY ^{NTN} na količino JA, SA in PDA v odpornih sortah krompirja	61
5.2.2.1 Vpliv slepe inokulacije.....	61
5.2.2.2 Vpliv inokulacije z virusom PVY ^{NTN}	62
5.3. PRIMERJAVA ANALIZE SALICILNE KISLINE S HPLC IN GC-MS	63
5.4 ZAKLJUČEK.....	64
6 POVZETEK.....	66
7 VIRI.....	68

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1 Izkoristek metode analize proste in konjugirane oblike salicilne kisline (SA, kSA) in gentiske kisline (GA, kGA).....	37
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

KAZALO SLIK

Slika 1 Prstanasta nekroza gomoljev krompirja (<i>Solanum tuberosum</i> L.), značilna za okužbo s PVY ^{NTN} (Moran in Rodoni, 2003: 1).....	3
Slika 2 (a) Primarna bolezenska znamenja na s PVY ^{NTN} inokuliranih listih krompirja sorte 'Igor'.(b) Sistemska bolezenska znamenja na listih inficiranih s PVY ^{NTN} iste sorte (Pompe Novak in sod., 2006:238).....	4
Slika 3 Pot biosinteze jasmonske kisline v rastlinah (Hofmann in Pollman, 2008).....	7
Slika 4 Sinteza jasmonske kisline iz linolenske kisline, v odgovor na razvojne in okoljske signale (Creelman in Mullet, 1995).....	9
Slika 5 Oktadekanoidna signalna pot za ekspresijo obrambnih genov v paradižniku (Wasternack in Parthier, 1997:305).....	11
Slika 6 Dve biosintetske poti salicilne kisline. Korizmat/izokorizmatna pot, prvotno opisana v bakterijah, a dokazana tudi v rastlinah na levi in Fenilpropanoidna pot na desni strani (Shah, 2003).....	15
Slika 7 Rastline krompirja (<i>Solanum tuberosum</i> L.) sorte 'Carlingford' pred okužbo s PVY ^{NTN}	26
Slika 8 Rastline krompirja (<i>Solanum tuberosum</i> L.) sorte 'Sante' pred okužbo s PVY ^{NTN}	27
Slika 9 Količina proste salicilne kisline (SA) in konjugatov salicilne kisline (kSA) v zgornjih in spodnjih listih ter koreninah krompirja sorte 'Sante', 1 in 3 ure po okužbi s PVY ^{NTN}	39
Slika 10 Količina proste gentiske kisline (GA) in konjugatov gentiske kisline (kGA) v zgornjih in spodnjih listih ter koreninah krompirja sorte 'Sante', 1 in 3 ure po okužbi s PVY ^{NTN}	41
Slika 11 Povprečna vrednost bazalne količine SA ± SD v dveh sortah intaktnih rastlin krompirja 1h po okužbi, 'Carlingford' (2 seriji) in 'Sante', izražena v pmol/g SM (sveže mase).....	42
Slika 12 Povprečna vrednost bazalne količine JA ± SD v dveh sortah intaktnih rastlin krompirja 1h po okužbi, 'Carlingford' in 'Sante', izražena v pmol/g SM (sveže mase).....	43

Slika 13 Povprečna vrednost bazalne količine PDA \pm SD v dveh sortah intaktnih rastlin krompirja 1h po okužbi, 'Carlingford' in 'Sante', izražena v pmol/g SM (sveže mase).....	44
Slika 14 Količina salicilne kisline (SA) v zgornjih intaktnih in spodnjih inokuliranih listih ter koreninah krompirja sorte 'Carlingford' – 1. poskus, 1 in 3 ure po okužbi s PVY ^{NTN}	45
Slika 15 Količina jasmonske (JA) in fitodienojske kisline (PDA) v zgornjih intaktnih in spodnjih inokuliranih listih ter koreninah krompirja sorte 'Carlingford' – 1. poskus, 1 in 3 ure po okužbi s PVY ^{NTN}	47
Slika 16 Količina salicilne kisline (SA) v zgornjih intaktnih in spodnjih inokuliranih listih ter koreninah krompirja sorte 'Carlingford' – 2. poskus, 1 in 3 ure po okužbi s PVY ^{NTN}	49
Slika 17 Količina jasmonske (JA) in fitodienojske kisline (PDA) v zgornjih intaktnih in spodnjih inokuliranih listih ter koreninah krompirja sorte 'Carlingford' – 2. poskus, 1 in 3 ure po okužbi s PVY ^{NTN}	51
Slika 18 Količina salicilne kisline (SA) v zgornjih intaktnih in spodnjih inokuliranih listih ter koreninah krompirja sorte 'Sante', 1 in 3 ure po okužbi s PVY ^{NTN}	53
Slika 19 Količina jasmonske (JA) in fitodienojske kisline (PDA) v zgornjih intaktnih in spodnjih inokuliranih listih ter koreninah krompirja sorte 'Sante', 1 in 3 ure po okužbi s PVY ^{NTN}	55

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

12-OH-JA	12-hidroksijasmonska kislina
AOC	alenoksid ciklaza
AOS	alenoksid sintaza
BA	benzojska kislina
BA2H	benzojska kislina 2-hidroksilaza
BYDV	virus ki povzroča rumeno pritlikavost ječmena (Barley yellow dwarf virus)
CA	<i>trans</i> -cimetna kislina
CEVd	viroid eksokortisa citrusa
2,3-DHBA	2,3-dihidroksibenzojska kislina
ET	etilen
ELISA	encimskoimunski test
GA	gentiska kislina
GC-MS	plinska kromatografija sklopljena z masno spektrometrijo (gas chromatography-mass spectrometry)
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (high pressure liquid chromatography)
HR	preobčutljivostni odgovor (hipersensitive response)
JA	jasmonska kislina
kGA	konjugirana gentiska kislina
kSA	konjugirana salicilna kislina
LA	linolenska kislina
LAR	lokalno pridobljena odpornost (local acquired resistance)
LOX	lipoksigenaza
MeOH	metanol
PAL	fenilalanin amonij liaza
PDA	fitodienojska kislina
PI	proteinazni inhibitorji
PR-gen	s patogenezo povezan gen
PR-protein	s patogenezo povezan protein

PTNRD	prstanasta nekroza gomoljev krompirja (Potato tuber ring necrosis disease)
PVX	krompirjev virus X
PVY	krompirjev virus Y
PVY ^N	nekrotičen sev virusa PVY
PVY ^{NTN}	krompirjev virus Y, nekrotični različek NTN
RNA	ribonukleinska kislina
RT-PCR	verižna reakcija s polimerazo v realnem času
SA	salicilna kislina
SAR	sistemske pridobljene odpornosti
SM	sveža masa
TMV	virus mozaika tobaka
ToMV	virus mozaika paradižnika
UDP	uridinfosfat

1 UVOD

Jasmonska (JA) in salicilna kislina (SA) sta signalni molekuli v rastlinah in sta pomembna dejavnika pri regulaciji delovanja in razvoja rastlin. JA je vpletena v odziv rastline na stres, katerega lahko predstavlja fizična ranitev ali pa okužba s patogenim mikroorganizmom. Vpletenost JA v odziv rastlin na ranitev je precej dobro raziskana, medtem ko ostaja odprto vprašanje glede odziva na patogene mikroorganizme, predvsem viruse.

V obrambni odgovor rastlin ob napadu patogenih mikroorganizmov je poleg JA vključena tudi SA, odvisno od rastlinske vrste in patogenega mikroorganizma v interakciji. SA je signalna molekula v rastlinah, ki je med drugim odgovorna za sistemsko pridobljeno odpornost rastlin (SAR).

Cilj diplomske naloge je ugotoviti ali sta JA in SA vpleteni v odziv dveh vrst krompirja z različno gensko odpornostjo na okužbo s krompirjevim virusom PVY^{NTN}. Proučevali bomo zgodnji odziv odpornih sort krompirja na virusno okužbo. Krompirjev virus PVY^{NTN} je agresiven in virulenten virusni različek in spada v družino *Potyviriidae* (potivirusi). Povzroča prstanasto nekrozo gomoljev krompirja, ki je slovenskim kmetovalcem povzročila že veliko škode. Sorte krompirja so na okužbo s PVY^{NTN} različno odporne, ena redkih odpornih sort je sorta 'Sante'. Analiza rastlinskih hormonov je težavna, ker so rastlinski hormoni prisotni v zelo nizkih koncentracijah, zato bomo v primeru analize SA primerjali dve različni metodi.

2 PREGLED OBJAV

2.1 KROMPIRJEV VIRUS PVY^{NTN}

Obstaja 36 znanih vrst virusov iz različnih družin, ki inficirajo rastline krompirja, ene najpomembnejših kultur v kmetijstvu. V zadnjem času je precej problematičen krompirjev virus PVY, predvsem zaradi spreminjanja izbora kultivarjev in pojava nekrotičnih sevov in širjenja le teh (Baldauf in sod., 2006).

Krompirjev virus Y ima več različkov, ki jih uvrščamo v 3 skupine, in sicer PVY^O, PVY^C ter PVY^N (Kus, 1994). Nekrotičen sev virusa PVY (PVY^N) je znan po tem, da povzroča letalno nekrozo žil tobaka. Nekateri izolati PVY^N pa so zmožni inducirati nekrotična prstanasta bolezenska znamenja na gomoljih krompirja, kar močno zmanjša kvaliteto in tržno vrednost krompirja. Ta različek se imenuje PVY^{NTN} (Baldauf in sod., 2006).

Krompirjev virus PVY^{NTN} je najbolj agresiven in virulenten virus, spada pa v družino *Potyviriidae* (potivirusi). Po obliki je rahlo upognjen, dolžine 730 nm in širine 11 nm. Genom je linearen, enodelen in sestavljen iz pozitivno orientirane enojne vijačnice RNA (povzeto po Pompe Novak in sod., 2006), velikosti 10 kb (Rolland in sod., 2007). *Potyvirusni* genom je sestavljen iz enojne molekule RNA, ki se prepíše v eno proteinsko molekulo. Posamezni funkcionalni proteini se nato iz tega velikega polipeptida sprostijo s tremi različnimi virusnimi proteazami. Posledica tega je prisotnost več proteinov z različnimi funkcijami, vključno s plaščnim proteinom (Synkova' in sod., 2006).

Nekateri izolati PVY^{NTN} so rekombinante med sevi PVY^O in PVY^N, medtem ko drugi izvirajo iz točkovnih mutacij (Baldauf in sod., 2006). Do sedaj sta bila opisana dva različna izolata PVY^{NTN}, in sicer glede na organizacijo njunega genoma (rekombinanten in nerekombinanten) (Mehle in sod., 2004).

PVY^{NTN} je razširjen po celem svetu in inficira različne ekonomsko pomembne kulture iz družine razhudnikovk (*Solanaceae*) (povzeto po Kogovšek in sod., 2008). Poleg krompirja (*Solanum tuberosum* L.) napada še paradižnik, papriko (Kus, 1994), poper, jajčevce in tobak (Le Romancer in Nedellec, 1997), odkrili pa so jo tudi na plevelu pasje zelišče (Kus, 1994).

PVY^{NTN} povzroča prstanasto nekrozo gomoljev krompirja ('Potato tuber necrosis ring disease' – PTNRD) (slika 1). Bolezen se je v Sloveniji pojavila konec osemdesetih let in se širila tako hitro, da je v treh letih izrinila iz pridelave našo najbolj priljubljeno in razširjeno sorto krompirja 'Igor' (Kus, 1994). Ker širjenja boleznim ne moremo učinkovito preprečiti z nobenim znanim ukrepom, sadimo predvsem odporne sorte kot je 'Santé', ki je povsem odporna proti okužbi s tem virusom (Kus, 1994), skupaj s sorto krompirja 'Carlingford' (Baker in sod., 1997, cit. po Baebler, 2006).



Slika 1 Prstanasta nekroza gomoljev krompirja (*Solanum tuberosum* L.), značilna za okužbo s PVY^{NTN} (Moran in Rodoni, 2003: 1).

Širjenje PVY^{NTN} med rastlinami omogočajo predvsem listne uši iz rodu *Aphis* sp., prenašajo pa ga tako, da zabadajo svoje bodalo v okuženo rastlino, kasneje pa še v zdravo. Gre za neperzistenten prenos, kar pomeni da se virus ob vbodu in sesanju rastlinskega soka sprosti v rastlinska tkiva in ob naslednjem napadu v uši ni več zastopan. Znan je tudi prenos z dotikom, a ima ta način prenašanja manjši pomen (Kus, 1994).

Veliko virusov se v določenem gostitelju širi sistemsko, medtem ko so v drugem omejeni s strani rastline z lokalnimi nekrotičnimi poškodbami. Nekateri virusi, kot je npr. virus ki povzroča rumeno pritlikavost ječmena (Barley yellow dwarf virus, BYDV), so omejeni na floem in se ne morejo premikati v druga tkiva rastline (Jameson in Clarke, 2002). Znotraj rastline se virus premika lokalno iz celice v celico skozi plazmodezme, medtem ko se na daljše razdalje premika po floemu (Revers in sod., 1999).

Pojav in razširjenost virusa PVY^{NTN}, ki povzroča prstanasto nekrozo gomoljev krompirja, je pripeljal do velikih ekonomskih izgub in izrazil potrebo po pravilnem razlikovanju izolatov PVY. Določitev in diferenciacija izolatov PVY je osnovana na kombinaciji tehnik encimskoimunskega testa (ELISA), PCR v realnem času (RT-PCR) in bioloških analiz na testnih rastlinah (Kogovšek in sod., 2008).

2.1.1 Odziv različnih sort krompirja na okužbo s PVY^{NTN}

Večina krompirjevih sort je dovzetnih za okužbo s PVY^{NTN}, ob infekciji pa razvijejo različna bolezenska znamenja. Kot smo že omenili, krompirjev virus PVY^{NTN} v občutljivih sortah krompirja povzroča prstanasto nekrozo gomoljev. Sorta 'Igor' je ena izmed najbolj na PVY^{NTN} dovzetnih in občutljivih sort krompirja. Bolezenska znamenja, kot so nekrotični obroči, so vidni na vseh gomoljih, prav tako pa ta znamenja opazimo tudi na zelenih delih rastline. Nekaj dni po infekciji se na inokuliranih listih pojavijo primarna bolezenska znamenja, kot so pikam podobne nekroze (lokalne lezije). Virus se širi naprej po rastlini, kar pripelje do gubanja listnih površin neinokuliranih listov in pojava rumenih mozaičnih kloroz – sistemska bolezenska znamenja (Pompe Novak in sod., 2006) (slika 2).



Slika 2 (a) Primarna bolezenska znamenja na s PVY^{NTN} inokuliranih listih krompirja sorte 'Igor'. (b) Sistemska bolezenska znamenja na listih inficiranih s PVY^{NTN} iste sorte (Pompe Novak in sod., 2006: 238).

Rastline rumenijo in predčasno odmirajo. Pri občutljivih sortah se črtaste nekroze pojavijo tudi na listnih pecljih in stebelu, listi se posušijo in visijo ob stebelu ali odpadejo, steblo pa zastane v rasti in predčasno odmre. Rastline, ki zrastejo iz okuženih gomoljev (sekundarne

okužbe), kažejo podobna znamenja kot na novo okužene, vendar pri večini sort v nekoliko milejši obliki (Kus, 1994).

Občutljiva sorta 'Igor' kaže različna primarna bolezenska znamenja nekaj dni po okužbi (4.-5. dan), medtem ko se sistemska pojavijo po 11-ih dneh (Krečič Stres in sod., 2005). Podobno se kaže tudi pri dovzetni sorti 'Desirèe', kjer se bolezenska znamenja v lažji obliki pojavijo nekje med 5. in 8. dnevom po inokulaciji, do sistemskih bolezenskih znamenj pa pride med 9. in 11. dnevom po inokulaciji (Mehle in sod., 2004). Do rumenenja in odpadanja s PVY^{NTN} inokuliranih listov prihaja pri obeh občutljivih vrstah do 10 dni po inokulaciji (Mehle in sod., 2004).

V večini okuženih listov pri različno občutljivih sortah krompirja, je bil virus dokazan s testom ELISA 24 ur po inokulaciji. Verjetno naj bi šlo za ostanke virusnega inokuluma na površini listov. Kasneje, 4-5 dni po inokulaciji, pa je bil virus dokazan predvsem v občutljivih sortah, kot sta 'Igor' in 'Desirèe', prav tako pa je bil prisoten v tolerantni sorti 'Pentland squire', kjer se bolezenska znamenja sploh niso pojavila. Na PVY^{NTN} odporna sorta krompirja 'Sante' ne izraža bolezenskih znamenj, prav tako 24 ur po inokulaciji virus v rastlini ni prisoten (Mehle in sod., 2004).

V rastlinah prihaja do sprememb tudi na celičnem nivoju. Na mestih nekroz so pri sorti 'Igor' ugotovili, da prihaja do nabrekanja kloroplastov, rahljanja tilakoidnih struktur in sprememb v optični gostoti kloroplastov. Na območjih lista okrog nekroz pa so zaznali zmanjšanje velikosti kloroplastov (Pompe Novak in sod., 2006).

Dermastia in sod. (1995) navajajo, da se pri rastlinah krompirja sorte 'Igor', ki je za PVY^{NTN} zelo občutljiv, spremeni endogeni nivo, metabolizem in sestava citokininov. Citokinini, kot pomembni regulatorji razvoja rastlin, sodelujejo pri pospeševanju celične delitve, vplivajo na senescenco, razvoj kloroplastov ali mobilizacijo nutrientov, prav tako pa vplivajo na procese, ki se pojavijo ob virusni infekciji in ki so povezani z razvojem bolezenskih znamenj. Rezultati zgoraj omenjene študije kažejo na povečanje citokinin-9-glukozilacije v koreninah občutljivih sort krompirja, inficiranih s PVY^{NTN}. Prišlo je do premika v koncentraciji biološko aktivnih citokininov v obliki prostih baz in ribozidov v korist neaktivnih citokininov v obliki 9-glikozidov. Te spremembe so še bolj kot pri primarni okužbi opazne pri sekundarni, medtem ko pri sortah krompirja, odpornih na PVY^{NTN} teh sprememb niso opazili.

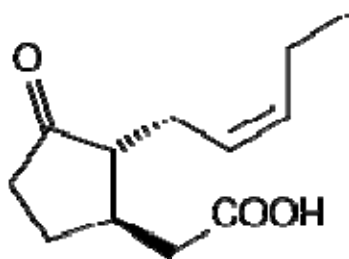
Raziskava bolezenskih znakov pri različno odpornih sortah je pokazala, da med koncentracijo virusa v okuženih rastlinah in občutljivostjo sorte ni povezave, ter da razmnoževanje in premikanje PVY^{NTN} verjetno nista razloga za različno izražanje bolezenskih znakov pri različnih sortah. Pokazalo pa se je, da ima okolje močan vpliv na občutljivost rastlin, saj so bile sorte, ki so *in vivo* zelo občutljive, *in vitro* zelo odporne in obratno. Tudi za sorto 'Igor' se je izkazalo, da je v nasprotju z izredno občutljivostjo *in vivo*, *in vitro* bolj odporna (Ravnikar in sod., 1995).

2.2 JASMONSKA KISLINA

IUPAC ime: (-)-1[alfa], 2[beta]-3-okso-2-(cis-2-pentenil)-ciklopentanocetna kislina

Molekulska formula: C₁₂H₁₈O₃

Molska masa: 210, 27 g/mol

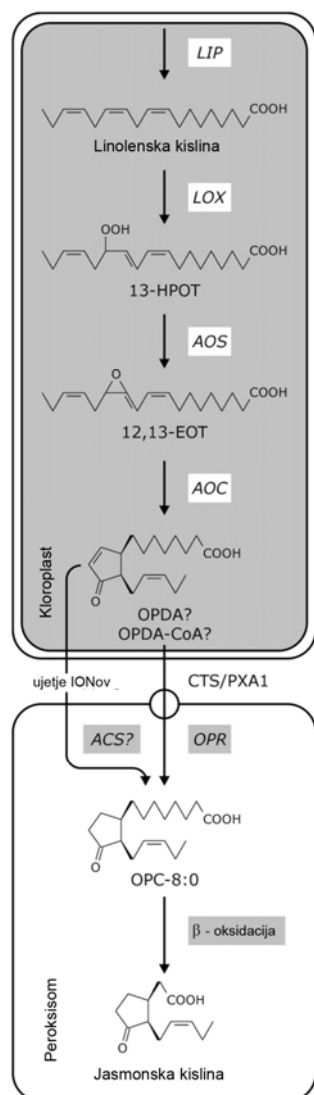


(-)-jasmonska kislina (JA)

2.2.1 Jasmonati

Jasmonati, derivati ciklopentanona, biosintetsko izvirajo iz linolenske kisline. Gre za oksilipine, ki so bioaktivni derivati maščobnih kislin (Peña-Cortés in sod., 2005). Jasmonati so signalne molekule, ki sodelujejo pri razvoju rastlin in pri njihovem odzivu na stres (Brinc, 2003). V skupino jasmonatov spadajo jasmonska kislina (JA), njen metilni ester, njeni aminokislinski konjugati in ostali metaboliti, kot je 12-hidroksijasmonska kislina (12-OH-JA). Oktadekanoidna cis-(+)-12-oksofitodienojska kislina (PDA) pa je prekurzor JA (Stenzel in sod., 2008).

Pot biosinteze gre preko oktadekanoidne poti, sestavljene iz vsaj 7 encimatskih korakov (slika 3). Končni produkt je (+)-7-iso-jasmonska kislina, fiziološko aktivna substanca, ki se hitro preoblikuje v svojo stereoisomero, stabilno (-)-jasmonska kislino (JA). Le to, lahko poleg njenega metil estra, aminokislinskih konjugatov, glukoznih estrov in hidroksiliranih oblik, najdemo v rastlinah.



Slika 3 Pot biosinteze jasmonske kisline v rastlinah. Intermediati: 13-HPOT, 13-hidroperoksi-9,11,15-oktadekatrienojska kislina; 12,13-EOT, 12,13-epoksi-9,11,15-oktadekatrienojska kislina; OPDA, *cis*-(+)-12-oksofitodienojska kislina; OPDA-CoA, *cis*-(+)-12-oksofitodienojska kislina-koencim A; OPC-8:0, 3-okso-2(2'-pentenil)-ciklopentan-1-oktanojska kislina. Encimi: LIP, lipaza; LOX, lipoksigenaza; AOS, alenoksid sintaza; AOC, alenoksid ciklaza; OPR, okso-fitodienojsko kislinska reduktaza; CTS/PXA 1, komatoza, ABC prenašalec za OPDA ali vnos OPDA-CoA; ACS, acil-CoA sintaza (povzeto po Hofmann in Pollmann, 2008).

Glavna struktura, ki jasmonatom zagotavlja fiziološko aktivnost, je pentanonski obroč, ki ima na C7 pripeto pentenilno verigo, na C3 acetilno ali daljše stranske verige, in keto skupino na C6 (Wasternack in Parthier, 1997). Jasmonate lahko zaznamo po celi rastlini, a so v največjih koncentracijah prisotni v rastočih tkivih: v vršičkih poganjkov, v konicah korenin, nezrelem sadju in v mladih listih (Wasternack in Parthier, 1997).

Metil jasmonat je bil leta 1962 izmed jasmonatov izoliran prvi in bil kemično identificiran kot sestavni del esencialnega olja iz rastline jasmina (*Jasminum grandiflorum* L. in rožmarina *Rosmarinus officinalis* L.), medtem ko je bila prosta jasmonska kislina leta 1971 izolirana iz kulture gliv *Lasioidiplodia theobromae*. Creelman in Mullet (1997) navajata tudi, da je metil jasmonat bolj aktiven kot sama jasmonska kislina, morda prav zaradi bolj hlapne oblike in lipofilne narave. Zaradi njihove hlapnosti, naj bi bili metil jasmonati vključeni v komunikacijo med rastlinami (Farmer in Ryan, 1992, cit. po Peña-Cortés in sod., 2005).

Prihaja do različnih pleiotropnih vplivov, povzročenih z zunanjim dodajanjem jasmonatov, s tako indukcijskimi kot inhibicijskimi učinki na fiziološke in biokemijske procese po celi rastlini ali pa le v določenem organu. V večini teh primerov gre za spremenjeno ekspresijo genov (Wasternack in Parthier, 1997).

2.2.2 JA kot rastlinski hormon

Ubikvitarnost jasmonatov in raznolikost njihovih bioloških vplivov kaže na to, da te substance uvrščamo med rastlinske hormone. Poleg tega so ugotovili, da so jasmonati, predvsem jasmonska kislina (JA), del signalne poti pri obrambnem odzivu rastlin.

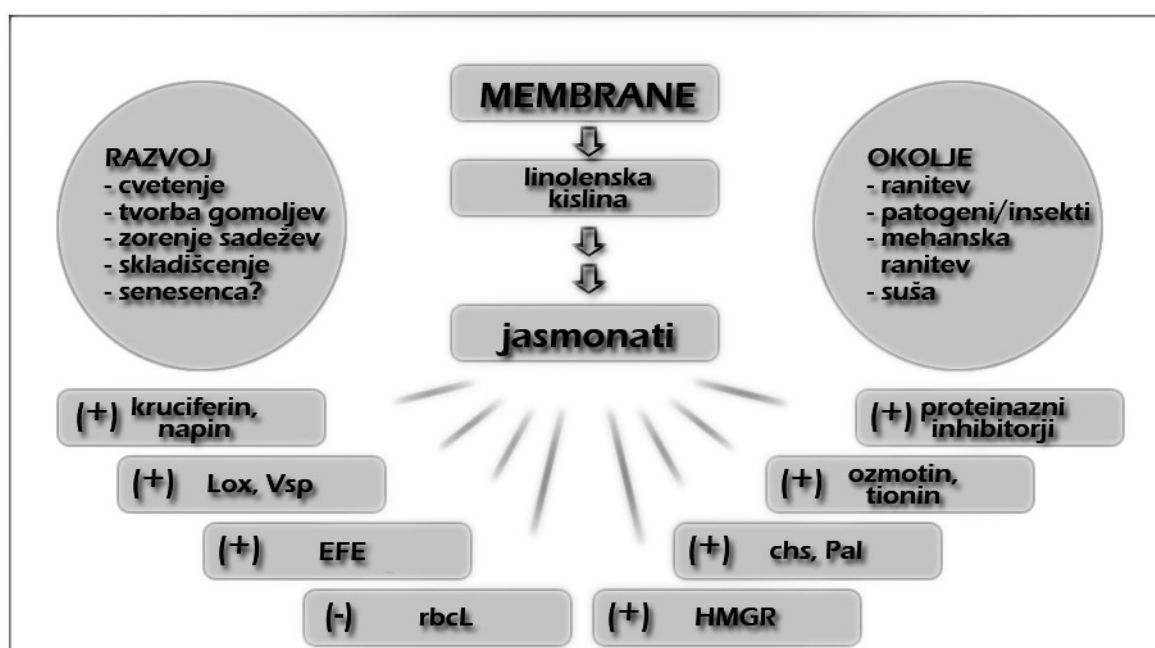
Njihova biosinteza od linolenske kisline preko oktadekanoidne poti je aktivirana pri stresnih pogojih, kot so ranitev, napad patogenih mikroorganizmov, osmotski stres ali poškodba z UV svetlobo, oziroma povsod, kjer pride do poškodbe membrane (Wasternack in Parthier, 1997) (slika 4).

V zadnjem desetletju se je izkazalo, da delujeta JA in PDA kot neodvisna signala, ki delujeta pri odzivu na biotski in abiotski stres, kot so herbivori, napad patogenih mikroorganizmov ali suša. Pri takih okoljskih razmerah pride do povišanja endogene JA in PDA, povzročene z *de novo* biosintezo in sta del kompleksne signalne transdukcijske poti (Stenzel in sod., 2008).

JA lahko vpliva na različne aspekte rasti in razvoja rastlin. Lahko inducira senescenco, abscizijo listov in inhibira kalitev. Sama senescenca vključuje zmanjšanje vsebnosti klorofila, zmanjšanje aktivnosti ribuloze bifosfat karboksilaze in akumulacijo novih proteinov (Creelman in Mullet, 1995) (slika 4). Creelman in Mullet (1995) navajata tudi, da JA inhibira

rast korenin, inducira tvorbo gomoljev in stimulira zorenje sadežev, zadnje najverjetneje preko vpliva na biosintezo etilena (ET).

Jasmonati, uporabljeni v nizkih koncentracijah, lahko inducirajo gene, ki kodirajo proteinazne inhibitorje, encime flavonoidne in seskviterpenoidne biosinteze, tionin, osmotin in lipoksigenazo (povzeto po Petrovič in sod., 1997) (slika 4). JA lahko inducira ekspresijo lipoksigenaze, encima vključenega v biosintezo JA in v rastlinski odziv na patogene mikroorganizme (Creelman in Mullet, 1995). Nizke koncentracije jasmonatov pospešujejo rast rastlin in razvoj koreninskega sistema (Ravnikar, 1991).



Slika 4 Sinteza jasmonske kisline iz linolenske kisline, v odgovor na razvojne in okoljske signale. Navedeni so geni, katere inducirajo jasmonati: *Vsp*-vegetativni skladiščni protein kisljih fosfataz; *Lox*-lipoksigenaza; *EFE*-encim za tvorbo etilena; *rbcl*-velika podenota ribuloza bifosfat karboksilaze; *pinII*-proteinazni inhibitor II; tionin in osmotin-protiglivna proteina; *chs*-kalcon sitnaza; *Pal*-fenilalanin amonij liaza; HMGR-hidroksimetilglutaril CoA reduktaza (povzeto po Creelman in Mullet, 1995).

2.2.3 JA in ranitev

Vloga JA v obrambi rastlin je bila potrjena z odkritjem, da ranitev in elicitorji povzročiteljev boleznih inducirajo akumulacijo JA v rastlinah (Creelman in Mullet, 1995).

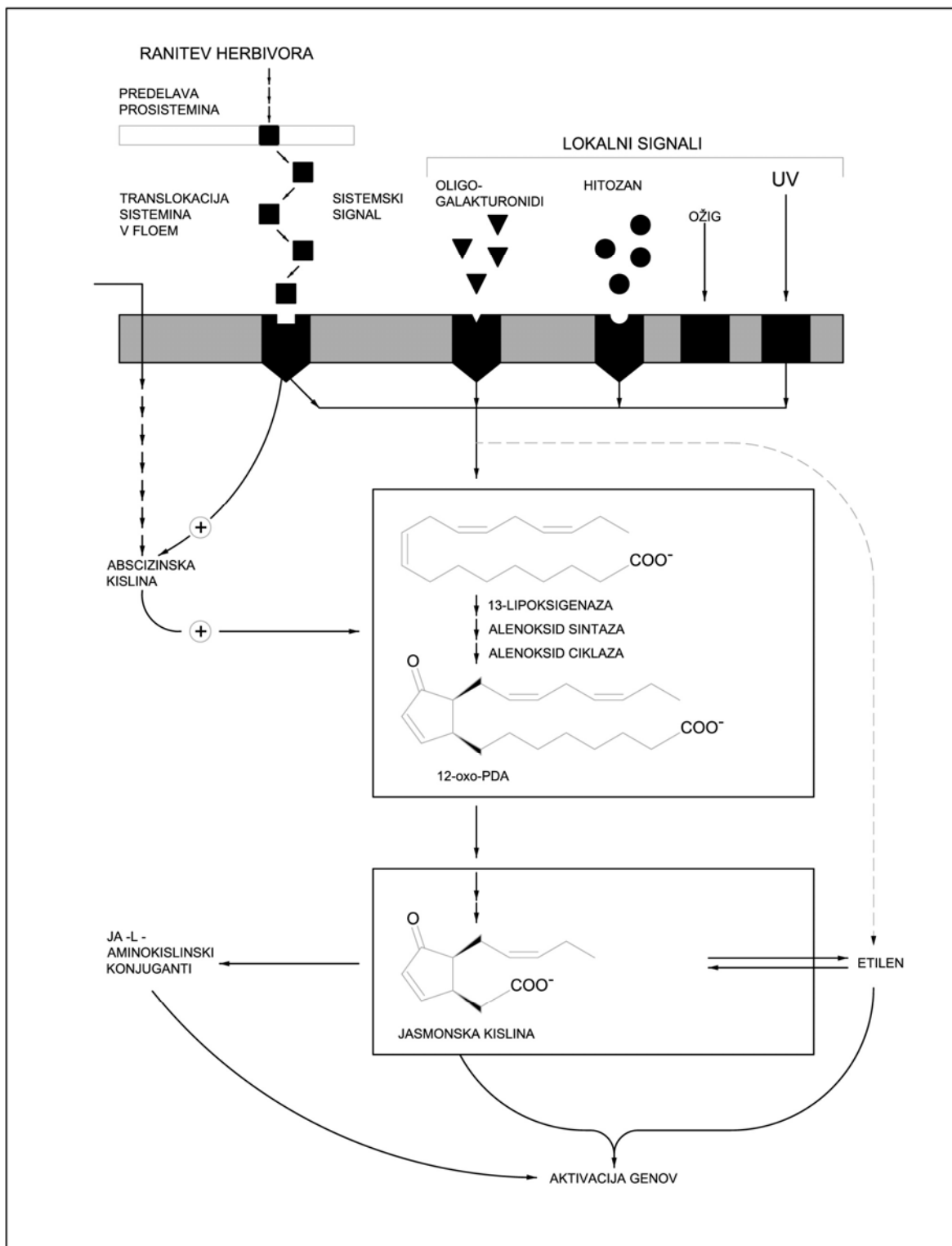
2.2.3.1 Oktadekanoidna signalna pot in biosinteza JA

Po napadu herbivora, se sistemsko inducirani protein iz 200 aminokislin, prosistemin, pretvori v sistemin. Sistemin, peptid iz 18 aminokislin, se prenese vzdolž floema in zaznava tega proteina preko še neznanega kompleksa receptorjev, sproži povišanje koncentracije linolenske kisline (LA) (Wasternack in Parthier, 1997). α -linolenska kislina se namreč ob začetku signalne poti sprosti iz membranskih lipidov s pomočjo encima fosfolipaze A (Creelman in Mullet, 1997). Encim 13-lipoksigenaza (LOX), lociran v kloroplastu, nato pretvori LA v 13-hidroksilinolensko kislino. Ta se nadalje pretvori z encimoma alenoksid sintazo (AOS) in alenoksid ciklazo (AOC) do 12-okso-fitodienojske kisline (PDA). Z redukcijo in trikratno β -oksidacijo v peroksisomu se nato tvori (-)-jasmonska kislina (Wasternack in Parthier, 1997). Ta se lahko kasneje konjugira v aminokislino (slika 5). Poleg žilnega transporta signalnih metabolitov, lahko hlapni metaboliti prav tako igrajo pomembno vlogo pri signaliziranju znotraj rastline. Obe poti lahko v sinergiji pripeljeta do optimalne odpornosti v oddaljenih delih rastline (Heil in Ton, 2008).

2.2.3.2 Lokalni in sistemski odziv rastlin na ranitev

JA in sistemin sta pomembna signala vsaj pri lokalnem odzivu na ranitev (Peña-Cortés in sod., 2005). Etilen je drug pomemben sistemski signal do katerega pride pri ranitvi rastlin paradižnika, kjer deluje skupaj z jasmonati.

Vsi sistemski signali (kot sta sistemin in uporaba električnega toka) in lokalni signali iz okolja (oligogalakturonidi, temperaturni stres kot je ožig in UV svetloba) povzročijo povišano koncentracijo jasmonatov, ki skupaj z etilenom aktivirajo ekspresijo genov (Wasternack in Parthier, 1997).



Slika 5 Oktadekanoidna signalna pot za ekspresijo obrambnih genov v paradižniku (Wasternack in Parthier, 1997:305).

Dobrih 30 let nazaj je Ryan s sodelavci opazil, da se v listih paradižnika po napadu herbivora kopičijo proteinazni inhibitorji PI (*pin1*) in PII (*pin2*). Kasneje so to definirali kot sistemsko indukcijo, kajti ugotovili so, da so listi, ki vsebujejo proteinazne inhibitorje, odporni na prebavne serin proteinaze herbivornih insektov.

Pri preučevanju snovi, ki sproži sintezo proteinaznih inhibitorjev, so identificirali 18 aminokislinski polipeptid sistemin, ki ob ranitvi deluje kot sistemski signal za ekspresijo gena *pin2* (Wasternack in Parthier, 1997).

Poškodba rastlinskega tkiva, ki ga povzroči insekt s hranjenjem, aktivira oktadekanoidno signalno kaskado, ki se konča s sintezo JA in tvorbo proteinaznih inhibitorjev (Peña-Cortés in sod., 2005). Zelo pomembno je to, da se veliko rastlinskih obrambnih odzivov, ki se sprožijo ob ranitvi, pojavi v nepoškodovanih listih, oddaljenih od mesta poškodbe. Sem spadajo PI, ki delujejo na herbivore tako, da zmanjšajo njegovo prehranjevanje na rastlini in sicer z blokiranjem prebavnih proteaz v njihovem črevesju. V paradižniku *Lycopersicon esculentum* so geni za PI sistemsko izraženi v 2 urah po mehanski ranitvi ali ranitvi s strani herbivora (Howe, 2004).

Bücking in sod. (2004) navajajo, da je ob ranitvi listov paradižnika jasmonska kislina signal tako v lokalnem kot v sistemskem odzivu. JA je sintetizirana v žilnem tkivu, medtem ko do ekspresije JA odzivnih genov pride v mezofilnih celicah. Jasmonati, ki se tvorijo v floemu in sproščeni kot odziv na ranitev, so verjetno brez težav prenešeni skozi apoplast in difundirajo do celic, ki obdajajo žile. Tu naj bi bili jasmonati zaznani in naj bi povzročili ekspresijo genov za proteinazne inhibitorje.

2.2.4 JA in okužba z virusi

Clarke in sod. (2000b) ter Dhondt in sod. (2000) navajajo, da nivo JA naraste pozneje tekom virusne infekcije in da verjetno ne sodeluje pri nastopu obrambnega odziva rastline. V nasprotju s tem pa Seo in sod. (2001) navajajo vpletenost JA v signalno transdukcijo med virusno infekcijo. Jameson in Clarke kasneje (2002) navajata, da je povišana endogena količina JA direktna posledica virusne infekcije ter da je dvig JA začasno in prostorsko usklajen z indukcijo preobčutljivostnega odgovora (HR – hypersensitive response).

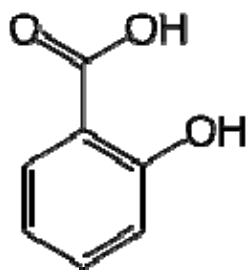
Analiza JA v zdravih in z virusom okuženih rastlinah krompirja sorte 'Igor' je pokazala, da je le ta prisotna tako v poganjkih, kot v koreninah. Na količino in razporeditev endogene JA pa dokazano vpliva virusna infekcija (Petrovič, 1997). Razporeditev endogene JA v koreninah in poganjkih zdravih oziroma s PVY^{NTN} okuženih krompirjevih rastlin sorte 'Igor' gojenih *in vitro* se močno razlikuje. V zdravih rastlinah se približno 2/3 endogene JA nahaja v poganjkih, 1/3 pa v koreninah, medtem ko se pri sistemsko okuženih rastlinah razporeditev obrne. Tako lahko zaključimo, da igra JA pomembno vlogo pri interakciji rastlina-virus (Petrovič in sod., 1997).

Vlogo JA pri interakciji med virusi in rastlinami pa je ugotavljala tudi Milovanovič Jarh (2004), ki je ugotovila, da pride pri sorti krompirja 'Sante' do največjega povečanja endogene JA ob okužbi s PVY^{NTN} v spodnjih inokuliranih listih in sicer eno uro po okužbi. Pri občutljivi sorti 'Desirèe' je bil ta odziv izražen v manjši meri. Podoben trend je opazila tako pri JA kot pri PDA.

Petrovič in Ravnikar (1995) poročata, da eksogeno dodana JA v koncentraciji 100 μ M inhibira replikacijo krompirjevega virusa Y, kar pa ne drži za višje koncentracije dodane JA.

2.3 SALICILNA KISLINA

Salicilna kislina (SA) oz. orto-hidroksibenzojska kislina ali 2-hidroksibenzojska kislina spada v raznoliko skupino rastlinskih fenolov. Že stoletja nazaj so ameriški Indijanci in stari Grki ugotovili, da listi in lubje vrbe pomagajo proti bolečinam in zmanjševanju povišane telesne temperature. Ime je salicilna kislina dobila iz latinske besede *Salix*, kar je ime za vrsto vrbe. Prva komercialna proizvodnja SA pa se je začela leta 1874 v Nemčiji in sicer pod imenom Aspirin oz. acetilsalicilna kislina (Raskin, 1992). V vodi pa je Aspirin spontano podvržen hidrolizi do SA (Popova in sod., 1997).



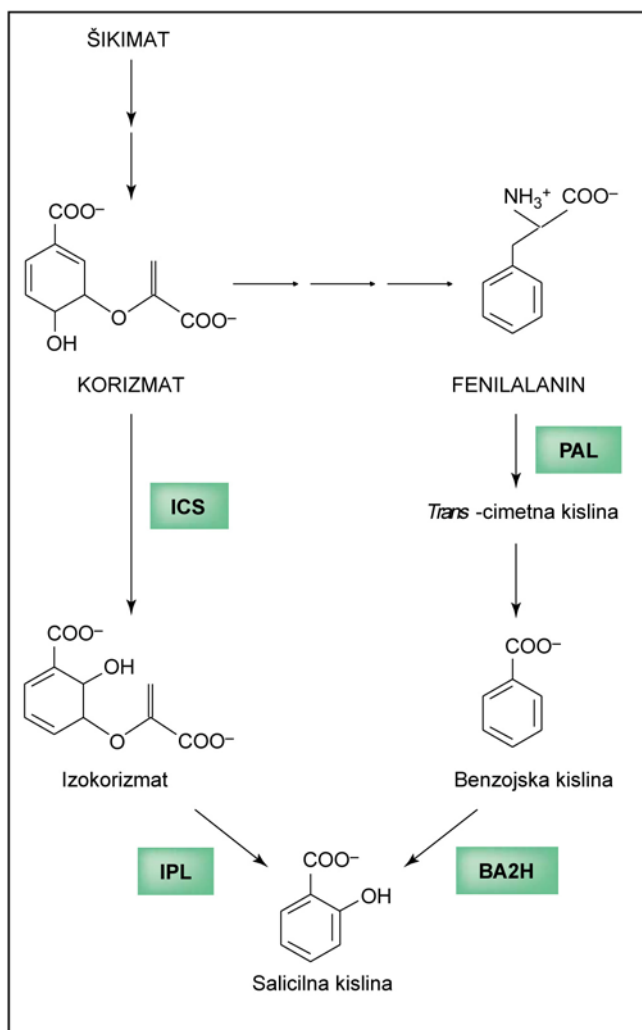
salicilna kislina

Salicilna kislina je ena izmed številnih fenolnih substanc ki jih najdemo v rastlinah. Sestavljena je iz aromatskega obroča, na katerega je vezana hidroksilna skupina ali njen derivat (Raskin, 1992). SA je signalna molekula v lokalnem odzivu in v sistemsko pridobljeni odpornosti (SAR), potrebna pa je tudi za razvoj bolezenskih znamenj. Povišanje endogenega nivoja SA in njenih konjugatov v rastlini, inficirani s patogenim mikroorganizmom, sovpada s povečano ekspresijo s patogenezno povezanih genov (PR-geni) in aktivacijo odpornosti na bolezen (Shah, 2003).

Eksogeno dodana SA navadno povzroči odpornost na viruse, za kar je značilno, da pride do zmanjšanja titra virusa in kasnejšega pojava bolezenskih znamenj (Murphy in sod., 1999; Jameson in Clarke, 2002). Eksogeno dodan aspirin, benzojska kislina ali SA inducirajo odpornost na TMV v tobaku (White, 1979). To povečanje odpornosti je povezano s kopičenjem s patogenezno povezanimi proteini (PR), ki so znaki obrambe rastline. Shulaev in sod. (1995) so kasneje ugotovili, da ob razvoju HR in SAR hkrati pride do dramatičnega povečanja količine endogene SA v inokuliranih listih in v sistemsko zaščitenih tkivih. Količina SA se sistemsko poveča po inokulaciji Xanthi-nc tobaka, odpornega na TMV (vsebuje namreč N odpornostni gen na TMV) s TMV, medtem ko do tega povišanja ne pride v rastlinah občutljivih na TMV (Shulaev in sod., 1995).

2.3.1 Biosinteza salicilne kisline

Najprej so bili strokovnjaki prepričani, da se SA sintetizira iz fenilalanina, vendar ta pot ni skupna sintezi SA v vseh rastlinskih celicah, saj naj bi obstajala alternativna biosintetska pot za SA (Shah, 2003). To so ugotovili, ko je prav tako prišlo do sinteze SA, čeprav je bila fenilpropanoidna pot inhibirana (Wildermuth in sod., 2001). V nekaterih bakterijah se SA sintetizira iz korizmata preko izokorizmata (Shah, 2003) (slika 6).



Slika 6 Dve biosintetske poti salicilne kisline. Korizmat/izokorizmatna pot, prvotno opisana v bakterijah, a dokazana tudi v rastlinah na levi in fenilpropanoidna pot na desni strani. Prisotni encimi: ICS-izokorizmat sintaza, IPL-izokorizmat piruvat liaza, PAL-fenilalanin amonij liaza, BA2H-benzojska kislina 2-hidroksilaza (povzeto po Shah, 2003).

2.3.1.1 Fenilpropanoidna pot biosinteze SA

Fenilpropanoidna pot biosinteze SA najdemo pri rastlinah. Na začetku 60. let so ugotovili, da biosinteza SA iz fenilalanina oz. cimetine kisline (CA) lahko nastane po dveh poteh.

Fenilalanin amonij liaza (PAL) katalizira prvi korak na tej poti, kjer pride do pretvorbe fenilalanina v *trans*-cimetno kislino (Shulaev in sod., 1995).

Možni poti nastanka SA iz cimetine kisline (Popova in sod., 1997):

- dekarboksilacija CA do benzojske kisline (BA) in nato 2-hidroksilacija BA do SA

V rastlini tobaka so ugotovili, da se SA lahko sintetizira iz fenilalanina preko *trans*-CA in benzojske kisline. Z dekarboksilacijo se CA pretvori v benzojsko kislino, encim benzojska kislina 2 hidroksilaza (BA2H), ki deluje kot citokrom P450 monooksigenaza (Shulaev in sod., 1995), pa katalizira zadnji korak, kjer se benzojska kislina pretvori s hidroksilacijo v SA (Shah, 2003). Za BA2H kaže da je patogen-inducirajoč protein s pomembno regulatorno vlogo pri akumulaciji SA med razvojem inducirane odpornosti na TMV v tobaku (León in sod., 1993).

- 2-hidroksilacija CA do *o*-kumarne kisline, ki ji sledi dekarboksilacija le-te do SA.

Obe poti biosinteze SA lahko delujeta neodvisno v isti rastlinski vrsti.

Biosinteza SA preko BA poteka v rižu (Silverman in sod., 1995) in v tobaku (Yalpani in sod., 1993).

2.3.1.2 Korizmat/izokorizmatna pot biosinteze SA

V nekaterih bakterijah (npr. *Pseudomonas aeruginosa*) pride do sinteze SA iz korizmata preko izokorizmata. Encima izokorizmat sintaza (isochorismate synthase – ICS) in izokorizmat piruvat liaza (isochorismate pyruvate lyase – IPL) katalizirata 2 stopnji od korizmata do SA. SA, sintetizirana po tej poti, je potrebna za lokalno pridobljeno odpornost (LAR) in SAR (Wildermuth in sod., 2001).

Zadnje študije so pokazale, da prevelika ekspresija teh dveh bakterijskih encimov v transgenih rastlinah povišajo akumulacijo SA (Shah, 2003).

Šikimatna pot zagotavlja korizmat, ki se lahko pretvori v SA. Glavno skladišče korizmata je v kloroplastu, zato ima ta organ pomembno vlogo pri sintezi SA. Kot so mitohondriji v živalih, naj bi bili tudi kloroplasti v rastlinah vir signalov, ki vplivajo na odziv na patogene mikroorganizme (Shah, 2003).

2.3.2 Metaboliti salicilne kisline

Konjugati SA igrajo pomembno vlogo pri detoksifikaciji in regulaciji proste SA (Lee in sod., 1995).

V različnih rastlinskih vrstah so našli različne konjugate hidroksibenzojske kisline. SA večinoma tvori konjugate z glukozilacijo, redkeje z esterifikacijo ali dodatno hidroksilacijo aromatskega obroča. Pri analizi metabolizma SA v tobaku so ugotovili, da je glavni konjugat SA glukozid (β -O-D-glukozilsalicilna kislina; 80 % celotne SA), medtem ko je SA glukozni ester v manjšini in je počasi tvorjen metabolit. Poleg teh dveh konjugatov SA prihaja tudi do tvorbe metil salicilata in aminokislinskih konjugatov (Lee in sod., 1995).

Del SA, aplicirana eksogeno ali sintetizirana endogeno v rastlini, se med obrambnim odzivom metabolizira v konjugirane oblike, predvsem zaradi glukozilacijskih in metilacijskih aktivnosti v celici (Lee in sod., 1995; Song in sod., 2008)

Eksogeno aplicirana SA metabolizira s pomočjo encima SA glukoziltransferaza v SA glukozni eter in SA glukozni ester (Edwards, 1994; Lee in Raskin, 1998; Yalpani in sod., 2001). Ti konjugati lahko služijo kot uskladiščena SA, od koder se SA zopet lahko po potrebi sprosti z β -glukozidazami (Chen in sod., 1995; Yalpani in sod., 2001).

Predvidevajo, da je encim SA glukoziltransferaza zaradi obsežne specifičnosti na substrat (*trans*-cimetna kislina, benzojska kislina in 4-hidroksibenzojska kislina), vključen v regulacijo nivoja različnih intermediatov v biosintetski poti SA (Yalpani, in sod., 2001).

Velike količine glukozilsalicilne kisline se v tobaku akumulirajo v in okrog HR lezij, povzročenih s TMV, medtem ko so zaznali manjše količine tega SA metabolita v floemu in v sistemsko zaščitenih listih (Enyedi in Raskin, 1993). Konjugati SA pri tobaku ne sodelujejo pri indukciji SAR in proteinov povezanih s patogenezo. Ker jih ne najdemo v floemskem soku, verjetno niso mobilni signal za SAR (Lee in Raskin, 1998).

2.3.3 Transport SA

Da SA lahko funkcionira kot translociran signal, potreben za SAR, se mora prenesti z inokuliranega lista v takih količinah, da bodo zadostne za akumulacijo v zgornjih neinokuliranih listih. Prenos SA iz listov, inokuliranih z različnimi nekrozo povzročajočimi patogenimi mikroorganizmi, je bil dokazan v rastlinah tobaka in kumare, prav tako pa prisotnost SA v floemu. Fizikalno-kemijske lastnosti SA jo delajo primerno za transport na dolge razdalje po floemu (Shulaev in sod., 1995).

Shuleav in sod. (1995) so ugotovili, da 60-70 % SA, akumulirane v zgornjih listih tobaka, pride iz inokuliranega lista. Za del ostale povišane SA domnevajo, da je vir benzojska kislina, ki ima podobne fizikalno-kemijske lastnosti kot SA in je njen direktni prekurzor, prav tako prenesena v zgornje liste. Benzojska kislina se tako skupaj s SA prenese po floemu v zgornje liste, kjer se hitro pretvori v SA, z osnovnim nivojem aktivnosti BA2H. Ugotovili pa so tudi, da je najvišje sistemsko povišanje SA v najmlajših listih, lociranih direktno nad inokuliranim listom, kar potrjuje hipotezo, da SA potuje po floemu.

2.3.4 SA kot rastlinski hormon

Salicilna kislina spada v raznoliko skupino rastlinskih fenolov, ki igrajo osnovno vlogo pri regulaciji rasti in razvoja rastlin ter interakciji le teh z ostalimi organizmi. SA pa je prav tako naravni povzročitelj termogeneze oz. produkcije toplote pri *Arum* kačniku (León in sod., 1993). Pri cvetenju lilij (*Sauromatum guttatum* Schott), pride dan pred cvetenjem do prehodnega 100-kratnega povečanja količine SA, kar sproži povečano aktivnost alternativne respiratorne poti in posledično pride do povišanja temperature do 12 °C nad temperaturo okolja (Cleland in Ajami, 1974; Raskin in sod., 1987, 1989; Yalpani in sod., 1993). Toplota, ki se razvije med samim cvetenjem, izpareva snovi močnega vonja, ki privabljajo oprašitvene insekte (Yalpani in sod., 1993).

Rastline normalno cvetijo v določenem času v letu, odvisno od nihanja dolžine dneva in temperature, lahko pa obidejo sezonsko regulacijo in tako zaradi stresnih pogojev rasti v okolju cvetijo prezgodaj (Martinez in sod., 2004). Martinez in sod. (2004) so dokazali, da z UV-C svetlobo povzročen stres preko sinteze SA aktivira zgodnejše cvetenje *Arabidopsis*

thaliana. Poleg tega SA regulira čas cvetenja tudi v rastlinah, ki niso izpostavljene stresu, saj v rastlinah, kjer primanjkuje SA, le te cvetijo pozneje.

SA je učinkovit, netoksičen in reverzibilen inhibitor biosinteze etilena (hormona, ki regulira zorenje sadežev, senescenco in odgovor na ranitev itd.) (Romani in sod., 1989; povzeto po Popova in sod., 1997). Pod določenimi pogoji pH-ja in koncentracije SA, lahko le ta signifikantno vpliva na mineralno absorpcijo rastlin (Harper in Balke, 1981, povzeto po Popova in sod., 1997). Ugotovili so, da SA inhibira K⁺ absorpcijo v izrezanem tkivu korenin ovsa. Stopnja inhibicije je odvisna tako od koncentracije kot od pH-ja. S padanjem pH-ja se inhibitorni učinek SA poveča.

Glass (1973) in Popova s sod. (1997) so poročali, da SA, eksogeno dodana koreninam ječmena in ovsa, inhibira absorpcijo natrija, zopet v odvisnosti od pH-ja in koncentracije.

SA povzroči porušenje transmembranskega elektrokemijskega potenciala mitohondrija (Macri in sod., 1986; povzeto po Popova in sod., 1997).

2.3.5 Delovanje SA pri virusni okužbi

Dokazano je (Enyedi in sod., 1992), da pride ob virusni infekciji do izrazitega povišanja v koncentraciji salicilne kisline, njenega glukoznega konjugata in metil estra.

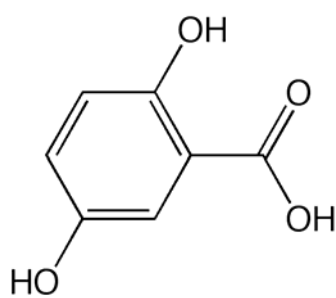
SA inducira izražanje veliko različnih genov, povezanih z obrambo. Za nekaj produktov le teh so Murphy in sod. (1999) ugotovili, da imajo direkten vpliv na glive ali bakterije, vendar za nobenega ni bilo dokazano, da bi imel jasno vlogo pri odpornosti na virus. Na primer, zgodnje študije so namigovale na to, da je sinteza ekstracelularnih, s patogenezo povezanih proteinov – PR, povezana z odpornostjo na TMV v tobaku, za kar se je kasneje izkazalo da nimajo večje vloge pri odpornosti na viruse. Od takrat so ugotovili, da ima več PR proteinov aktivnosti hitinaze, lizocima ali β 1,3-glukanaze in da sodelujejo pri odpornosti na glive in bakterije (Murphy in sod., 1999). Od 17-ih družin PR-proteinov so ugotovili, da je družina PR-10 podobna ribonukleazam in da je njihova vloga verjetno obramba pred virusi (Van Loon in Van Strien, 1999; Liu in Ekramoddoullah, 2006).

Dokazano je, da salicilna kislina v primeru virusov lahko inhibira vse glavne tri faze pri infekciji virusa: replikacijo, razširjanja virusa iz celice v celico in na daljše razdalje (Singh in sod., 2004). Chivasa in sod. so leta 1997 ugotovili, da SA lahko inducira odpornost na TMV in krompirjev virus X (PVX) v inokuliranem tkivu občutljivega tobaka in sicer s preprečevanjem njihove replikacije. Ne le da v tobaku SA zmanjša akumulacijo TMV in PVX RNA, ampak tudi spremeni razmerje med virusno genomsko RNA in mRNA akumulacijo. To kaže na to, da je SA sposobna imeti za tarčo virusno replikacijo in ekspresijo genov. SA pa lahko deluje tudi na druge načine. Lahko npr. inhibira gibanje na daljše razdalje alfa alfa mozaičnega virusa (alfaalfa mosaic virus-AIMV) v tobaku, a vidno ne vpliva na replikacijo tega virusa (Murphy in sod., 1999).

Krečič Stres (2001) navaja, da je dan po okužbi v inokuliranih listih okuženih rastlin krompirja sorte 'Igor' (zelo dovzeten na krompirjev virus Y^{NTN}) glede na slepo inokulirane liste zdravih rastlin izmerila večje količine proste SA. V času sistemskih bolezenskih znakov pa je zasledila povečanje proste in konjugirane SA v zgornjih listih za približno 3-krat. Pri okužbi sort krompirja 'Pentland squire' (toleranten na PVY^{NTN}) in 'Sante' (visoko odporen oz. imun na PVY^{NTN}) se niso pojavili niti primarni niti sistemski bolezenski znaki.

2.4 GENTISKA KISLINA

Iz literature (Yalpani in sod., 2001; Belles in sod., 2006) je znano, da je v primeru paradižnika, v odziv na okužbo s povzročiteljem bolezni, poleg salicilne kisline vključena tudi gentiska kislina. Gentiska kislina (GA) oz. 2,5-dihidroksibenzojska kislina, je metabolni derivat salicilne kisline (SA, 2-hidroksibenzojska kislina) (Bellés in sod., 2006). Ta difenol je pomemben tako pri ljudeh kot pri živalih, saj se precejšen delež salicilata oksidira in izloči v obliki gentizata oz. v obliki soli ali estra GA (Roof and Turner, 1955).



gentiska kislina

Kot vemo, so fenolne molekule v manjši meri v prosti obliki, tako jih največkrat najdemo v konjugirani obliki. Za gentisko kislino so najprej mislili, da se v obliki konjugata nahaja predvsem kot β -glukozid (Bellés in sod., 1999). Kasneje so ugotovili, da je za razliko od fenolnih analogov GA, kot sta benzojska in salicilna kislina, ki so konjugirane z glukozo, GA v konjugirani obliki vezana na ksilozo v 5-O- β -D-ksilopiranozid (Fayos in sod., 2006).

Purnat (2005), je poleg drugih avtorjev (Belles in sod., 1999; Krečič Stres, 2001) pokazala, da v rastlinah najdemo več konjugiranih kot prostih oblik GA. Konjugirane oblike predstavljajo predvsem skladišče SA in GA, ki se po potrebi lahko hitro sprostita (Belles in sod., 1999).

V zdravih listih rastlin se benzojska kislina (BA) in salicilna kislina (SA) hitro pretvorita v gentisko kislino (GA) (Belles in sod., 1999). Schulz in sod. so leta 1993 pri ajdi (*Fagopyrum esculentum*) ugotovili način detoksifikacije SA in sicer z oksidacijo SA v GA ter glukozilacijo GA v njen konjugat.

V rastlinah navadnih kumar in rastlinah pasijonk (*Gynura aurantiaca*), je aktivnost GA kot sprožitvenega signala drugačna od SA. Bellés in sod. so leta 1999 ugotovili, da sta viroid eksokortisa citrusa (CEVd) in tobačni mozaični virus (TMV – tobacco mosaic virus) sprožila v rastlini paradižnika sintezo derivata benzojske kisline, imenovanega 2,5-dihidroksibenzojska kislina oz. GA. Čeprav so dokazali, da je njen direkten metabolni prekurzor SA, je GA v paradižniku inducirala drugo podskupino PR proteinov (Bellés in sod., 1999).

Po drugi strani pa je eksogeno dodana GA sprožila aktivnost peroksidaze v obeh vrstah rastlin, na enak način kot SA ali patogeni mikroorganizmi. V splošnem je dodajanje GA močno induciralo polifenol oksidazno aktivnost v rastlinah kumare, medtem ko je bil ta encim induciran v manjši meri ob dodajanju SA ali ob infekciji s povzročiteljem bolezni. Vseeno pa GA ni inducirala ostalih obrambnih proteinov, ki se inducirajo s SA v teh rastlinah. To kaže na to, da bi lahko GA bila dodaten signal SA pri aktivaciji rastlinske obrambe v rastlinah kumare in rastline pasijonke (*Gynura aurantiaca*) (Bellés in sod., 2006). Isti avtorji so ugotovili, da količina GA naraste po sistemski ali lokalni infekciji kumar brez prisotnosti preobčutljivostne reakcije, do katere pride npr. ob infekciji paradižnika s *P. syringae*, kjer pride do nekroz. V večjih količinah se GA akumulira v sistemskih nenekrotičnih infekcijah,

kot npr. z viroidom eksokortisa citrusa inficirane rastline paradižnika sorte 'Rutgers'. Iz tega lahko sklepamo, da je GA povezana z uspešnimi infekcijami, ne pa s preobčutljivostnimi reakcijami. To potrjuje idejo Bellés in sod. (2006), da je signaliziranje GA omejeno na kompatibilne reakcije. Iz povedanega sledi da ima GA drugačno aktivnost v primerjavi s SA glede indukcije obrambnih proteinov.

Krečič-Stres in sod. (2005) so pri preučevanju endogene količine proste in konjugirane gentiske kisline v 4 različno dovezetnih sortah krompirja (*Solanum tuberosum*) ugotovili, da proste GA, ki je bila zaznana v ostalih sortah, v ekstremno odpornem krompirju sorte 'Sante' ni bilo. Signifikantno povišanje količine proste in konjugirane GA so zaznali 11 dni po okužbi, ko so se pojavila sistemska bolezenska znamenja. Povečanje GA v občutljivem 'Igor'-ju lahko prispeva k splošnemu povečanju koncentracije fenolov pri odzivu na stres v obliki virusne infekcije. Kaže, da endogeni nivo GA v rastlinah krompirja ni povezan z odpornostjo na PVY^{NTN} (Krečič-Stres in sod., 2005).

2.5 OD SA IN JA ODVISNI OBRAMBNI ODZIVI RASTLINE

Glede na opravljene analize na rastlini *Arabidopsis*, lahko obrambne gene klasificiramo v 3 skupine: prva skupina je inducirana z JA in ne s SA, druga s SA in ne z JA ter tretja skupina, katera je inducirana tako s SA kot z JA (Song in sod., 2000).

Od SA odvisen obrambni odziv rastline *Arabidopsis* je učinkovit proti biotrofnim patogenim mikroorganizmom kot je *P. parasitica*. Odpornost na tak tip patogena je pogosto povezan s preobčutljivostnim odgovorom. Gre za nekrozo inficiranih celic gostitelja, ki vodi do omejitve hranil za patogen mikroorganizem. Poleg tega je bilo za biotrofno glivo *Erysiphe orontii* dokazano, da od SA odvisen (in ne od JA) obrambni odziv prispeva k odpornosti rastline (Thomma in sod., 2001).

Rastline naj bi razvile od JA in etilena odvisne obrambne odzive za delovanje proti nekrotrofom, kjer naj bi istočasno prišlo do inhibicije od SA odvisnega obrambnega odziva s strani JA, kar kaže na antagonizem med SA in JA (Pena-Cortes in sod., 1993; Thomma in sod., 2001). Druge raziskave nasprotujejo tej hipotezi. Z uporabo DNA mrež so ugotovili, da obstaja relativno velika skupina genov, ki se sprožijo tako ob prisotnosti SA kot JA (Thomma

in sod., 2001). Preston in sod. (1999) poročajo, da so rastline tobaka okužili s TMV virusom, štiri dni kasneje pa so jih še ranili. Ugotovili so, da je inokulacija s TMV inhibirala tvorjenje ranitvenega signala, najverjetneje zaradi inhibicije biosinteze JA, s strani povišane količine SA zaradi virusne inokulacije.

Thomma in sod. (2001) ugotavljajo, da indukcija programirane celične smrti, kot v primeru preobčutljivostne reakcije, potrebuje intaktno SA, JA in etilen signalno kaskado. Druga študija je pokazala na antagonističen odnos med signalnima molekulama SA in JA, z ozonom kot povzročiteljem celične smrti. Medtem ko SA pospešuje celično smrt, je JA vključena v preprečevanje od superoksida odvisne celične smrti in tako v obseg lezij (povzeto po Thomma in sod., 2001).

Signalne kaskade SA, JA in etilena ne aktivirajo obrambe neodvisno, ampak vzpostavijo kompleksne interakcije, ki določijo odziv pri določenih okoliščinah. Interakcije med SA, JA in ET obrambnimi signalnimi potmi so lahko antagonistične, kooperativne ali sinergistične, odvisno od rastlinske vrste, kombinacije organizmov, ki napadajo rastline, in od razvoja in fiziološkega stanja rastline (Rojo in sod., 2003).

2.6 NAMEN IN HIPOTEZA

Skušali bomo ugotoviti ali sta JA in SA vpleteni v odziv dveh odpornih rastlin krompirja na okužbo s krompirjevim virusom PVY^{NTN}. Proučevali bomo zgodnji odziv dveh odpornih sort krompirja, 'Sante' in 'Carlingford' in sicer uro in tri ure po slepi inokulaciji in inokulaciji s PVY^{NTN}. Obe sorti sta na okužbo s PVY^{NTN} odporni, le da je sorta krompirja 'Sante' odpornejša (imuna) na omenjeni virus. Namen diplomske naloge je ugotoviti razlike glede na intenziteto odziva in mehanizem odpornosti.

Z analizo intaktnih in slepo inokuliranih rastlin bomo skušali dobiti odgovor na vpletenost SA in JA v odziv na slepo inokulacijo, ki predstavlja neke vrste mehansko poškodbo. Glede na predhodne rezultate raziskav interakcij med rastlinami krompirja in PVY^{NTN} (Milovanovič Jarh, 2004), pričakujemo vpletenost JA tako v odziv rastline na slepo inokulacijo kot tudi na okužbo. Glede na odziv pri odporni sorti 'Sante', pričakujemo podoben mehanizem tudi pri

manj odporni sorti krompirja 'Carlingford', medtem ko je vloga SA pri zgodnjem odzivu v tej interakciji manj jasna.

Analiza rastlinskih hormonov je težavna, ker so rastlinski hormoni prisotni v zelo nizkih koncentracijah, zato bomo v primeru analize SA primerjali dve različni metodi, tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) in plinsko kromatografijo sklopljeno z masno spektrometrijo (GC-MS).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 RASTLINSKI MATERIAL

3.1.1 Priprava rastlinskega materiala za analizo jasmonske (JA), fitodienojske (PDA), salicilne (SA) in gentiske (GA) kisline v listih in koreninah krompirja

Za analizo rastlinskih hormonov smo uporabili rastline krompirja (*Solanum tuberosum* L.). Rastlinske hormone smo analizirali v dveh sortah krompirja in sicer 'Carlingford' in 'Sante', ki sta bili gojeni v tkivni kulturi.

Rastline krompirja iz tkivne kulture smo razrezali na nodije in jih vcepili po 10-11 v petrijevko na hranilno gojišče MS (Murashige in Skoog, 1962) in počakali dva tedna, da se zakoreninijo.

Zakoreninjene rastlinice smo presadili v lončke s kremenčevim peskom (MP-1G/S, Termit Domžale) in jih zalivali trikrat tedensko in sicer: enkrat s hranilno raztopino (Johnson in sod., 1994), (po 40 ml/rastlino) in dvakrat z vodo iz pipe (po 20 ml/rastlino).

Priprava hranilne raztopine po Johnson s sod., 1994:

3,0 mM KNO ₄	303mg/l
2,5 mM NH ₄ NO ₃	200mg/l
1,0 mM MgSO ₄ x7H ₂ O	245,5 mg/l
0,5 mM KH ₂ PO ₄	68 mg/l
22,0 μM H ₃ BO ₄	1,36 mg/l
12,0 μM NaFeEDTA	4,4 mg/l
4,0 μM MnSO ₄ xH ₂ O	0,68 mg/l
1,6 μM CuSO ₄ x5H ₂ O	0,39 mg/l
0,4 μM ZnSO ₄ x7H ₂ O	0,107 mg/l
0,05 μM Na ₂ MoO ₄ x2H ₂ O	0,0011 mg/l

pH raztopine mora biti 5,5.

Rastline smo 4 tedne vzgajali v rastni komori pri naslednjih pogojih:

- 16 ur osvetlitve z žarnico Osram L36W77
- 8 ur teme
- gostota pretoka elektronov $120\text{-}150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
- temperatura med osvetlitvijo $22 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$
- temperatura v temi $20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$
- relativna zračna vlaga $75 \pm 2 \%$



Slika 7 Rastline krompirja (*Solanum tuberosum* L.) sorte 'Carlingford' pred okužbo s PVY^{NTN}



Slika 8 Rastline krompirja (*Solanum tuberosum* L.) sorte 'Sante' pred okužbo s PVY^{NTN}

Pri prvem eksperimentu smo analizirali SA in GA v listih in koreninah rastlin krompirja sorte 'Sante', ki so bile inokulirane 18.12.2003.

Pri drugem eksperimentu smo analizirali SA, JA in PDA v listih in koreninah rastlin krompirja sorte 'Carlingford', katere so bile inokulirane 21. in 23.4.2004 (1. in 2. poskus), ter rastlin sorte 'Sante', ki so bile inokulirane 23.4.2004.

V 1. eksperimentu smo rastline sorte 'Sante' razporedili v dve skupini in sicer:

- slepo inokulirane rastline (S)
- okužene oz. s PVY^{NTN} inokulirane rastline (Y)

V 2. eksperimentu pa smo rastline sorte 'Carlingford' in 'Sante' razporedili v tri skupine:

- kontrolne (netretirane, intaktne) rastline (K)
- slepo inokulirane rastline (S)
- okužene oz. s PVY^{NTN} inokulirane rastline (Y)

V skupini slepo inokuliranih in okuženih rastlin smo s fluomastrom označili tri do štiri spodnje liste in jih posuli s karborundom. S tem finim prahom smo liste s prstom nežno podrgnili, da je prišlo do mehanske ranitve, nato pa smo posute liste namazali z rastlinskim

sokom zdravih neokuženih rastlin krompirja sorte 'Pentland squire', vzgojenih v tkivni kulturi – slepa inokulacija. Okuženi rastlinski material smo dobili tako, da smo s karborandom posute liste inokulirali z rastlinskim sokom s PVY^{NTN} okuženih rastlin krompirja 'Pentland squire', prav tako vzgojenih v tkivni kulturi.

Inokulat smo pripravili tako, da smo porezali poganjke rastlin in jih stehali. Nato smo 1g rastlinskega materiala dodali 3 ml 20 mM natrij fosfatnega pufra (2·6 mM NaH₂PO₄, 15·2 mM Na₂HPO₄, 0·1 % DETC, pH=7·6), ter rastlinsko tkivo strli.

Po slepi inokulaciji in inokulaciji rastlin z virusom PVY^{NTN}, smo počakali 15 minut, nato pa smo listke sprali z vodo. Po spiranju smo rastline vrnili v rastno komoro, ter po eni in treh urah pobrali rastlinski material.

Pobirali smo ločeno spodnje inokulirane liste, zgornje neinokulirane liste in pa korenine. Rastlinam smo s škarjami porezali ločeno spodnje in zgornje liste in jih v terilnici s pomočjo tekočega dušika (-196 °C) strli. Korenine smo očistili peska in jih sprali pod vodo ter jih posušili s papirnato brisačo. Nato smo jih s tekočim dušikom strli v fin prah. Strt material smo prenesli v označene petrijevke in jih stehali. Dobro zaprte petrijevke smo hitro shranili v skrinjo na -84 °C, kjer smo material shranili za nadaljno analizo.

3.1.2 Sorte krompirja *Solanum tuberosum* L.

'Carlingford'

Sorta dozoreva srednje pozno. Gomolji so okroglo ovalni s plitvimi očesci. Barva kože in barva mesa je bela. Sorta je primerna za pridelavo glavnega pridelka, saj se odlično skladišči in ne izgublja jedilne kakovosti. Sorta je odporna na PVY^{NTN}.

'Sante'

Sorta dozoreva srednje pozno. Rastline imajo zelo debela stebela s trdimi listi. Gomolji so ovalni s srednje plitkimi očesi in kožo bledorumene barve. Meso je bledorumeno. Sorta ima srednje dolgo dormanco. Pridelek je odličen.

Sorta je zelo odporna na PVY^{NTN} (V okuženi rastlini ni niti virusa niti ne pride do pojava bolezenskih znakov) (povzeto po Dermastia, 1993).

3.2 METODE

3.2.1 Metoda I – Ekstrakcija in analiza salicilne (SA) in gentiske kisline (GA) s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC)

Postopek za ekstrakcijo prostih in konjugiranih oblik salicilne ter gentiske kisline iz rastlinskega materiala smo povzeli po metodi, ki so jo objavili Raskin in sodelavci (1989), in priredili po Krečič Stres (2001).

3.2.1.1 Potek ekstrakcije

1. Pripravili smo terilnico, pestilo, spatulo in označili centrifugirke. Ta material smo ohladili v tekočem dušiku in pazili, da so vsi predmeti, katere smo pri ekstrakciji uporabljali, ves čas na hladnem. V ohlajeno terilnico smo dali večjo količino materiala iz petrijevke, katerega smo hranili na $-84\text{ }^{\circ}\text{C}$ in ga s pomočjo tekočega dušika zdrobili v prah. Nato smo v vsako od centrifugirk zatehtali 300 mg rastlinskega materiala. Za vsak vzorec smo naredili po tri ponovitve.
2. Sledila je homogenizacija z ultraturaksom (IKA – Werke, Ultra-turrax, T25 basic), kjer smo pri 22 000 obratih/min 3 min homogenizirali rastlinski material v 3 ml 90 % metanola (MeOH).
3. Homogenat smo nato centrifugirali (Beckman centrifuga, rotor JA 14) 15 min pri 10 000x g pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Supernatant smo odlili v drugo centrifugirko, oborino pa resuspendirali v 2,5 ml 100% MeOH in ga pri enakih pogojih zopet centrifugirali. Supernatant smo prelili v centrifugirko k prejšnjemu supernatantu, pelet pa zavrgli. Združeni supernatant smo centrifugirali 10 min pri 4500 x g pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ in ga prelili v 5 ml bučko.
4. Supernatant smo v bučki posušili na rotavaporju pri $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Bartelt, Labor & Datentechnik, HEIDOLPH WB 2000).

5. Posušnemu ekstraktu smo dodali 1 ml 5 % (w/v) trikloroocetne kisline in raztopino mešali 1 min z ultrazvočnim mešalom (Bandelin Sonorex TK25).
6. Raztopino smo nato iz bučke prenesli v 1.5 ml ependorfko in jo centrifugirali z Eppendorf centrifugo 10 min pri 3000 x g pri 4 °C.
7. Sledila je ekstrakcija v organski fazi:
Supernatant smo prelili v 3 ml mešanice etilacetat/ciklopentan = 1:1 (v:v) in stresali (stresalnik IKA Labortechnik, KS125 Basic) pri 250 obratih/min za 10 min, na sobni temperaturi. Nato smo zgornjo, organsko fazo, ki je vsebovala proste in konjugirane oblike SA in GA, s pasteurjevo pipeto odpipetirali v 5 ml bučko in preostali vodni fazi ponovno dodali 3 ml mešanice etilacetat/ciklopentan = 1:1 (v:v). Nato smo raztopino zopet stresali 10 min pri istih pogojih kot prvič. Zgornjo, organsko fazo smo odpipetirali v bučko k prejšnji in združen ekstrakt posušili na rotavaporju pri 40 °C.
8. Ekstraktu smo dodali 400 µl 100 % MeOH in raztopino mešali 1 min z ultrazvočnim mešalom, nato pa ga prefiltrirali preko celuloznega filtra (0.22 µl; Millipore). Filter smo sprali z 200 µl 100 % MeOH. Za analizo z HPLC, smo uporabili po 5 ali 10 µl tega vzorca.
9. Hidroliza za pridobitev konjugiranih oblik SA in GA:
Spodnjo, vodno fazo (1 ml), ki je vsebovala konjugirane oblike SA in GA, smo hidrolizirali 1 uro pri 80 °C z 1 ml 8 N klorovodikove kisline (HCl), da smo dobili končno koncentracijo 4 N HCl.
10. Hidrolizat smo centrifugirali 10 min pri 3000 x g pri 4 °C.
11. Supernatant smo obdelali po istem postopku, kot je opisan zgoraj za ekstrakcijo prostih oblik SA in GA (ekstrakcija v organski fazi s stresanjem, ponovitev ekstrakcije v organski fazi s stresanjem, sušenje organske faze na rotavaporju, filtracija).
12. Posušen vzorec smo raztopili v 400 µl 100 % MeOH in raztopino mešali 1 minuto z ultrazvočnim mešalom, nato pa prefiltrirali preko celuloznega filtra (0.22 µm; Millipore). Filter smo sprali z 200 µl 100 % MeOH. Za analizo s HPLC, smo uporabili po 5 ali 10 µl tega vzorca.

Verberne s sod. (2002) so objavili postopek izolacije, ki je podoben zgoraj opisanemu, vključuje le nekaj izboljšav, ki smo jih vključili v izolacijo salicilne in gentiske kisline. Po končani homogenizaciji in centrifugiranju smo namreč združenemu supernatantu pred sušenjem na rotavaporju dodali 40 μ l 0,2 M NaOH. Na rotavaporju le teh nismo posušili do suhega, ampak smo jih sušili do te mere, da je v bučki ostalo 0,5 ml ekstrakta. Namesto filtracije preko celuloznega filtra, smo vzorec centrifugirali 10 min pri 3000 x g pri 4 °C. Obe organski fazi smo raztopili v 600 μ l 100 % MeOH, in ne v 400 μ l.

3.2.1.2 Analiza salicilne in gentiske kisline

Analizo rastlinskih hormonov smo izvedli s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC). Mobilno fazo smo črpali z visokotlačnima črpalkama Waters 510 HPLC. Vrhove smo zaznavali s fluorescenčnim detektorjem Waters 474 (Fluorimetrični detektor SATIN) (valovna dolžina ekstinkcije 305 nm, valovna dolžina emisije 407 nm) ter z detektorjem Waters TM 996 PDA (Photodiode Array detector) pri valovni dolžini 290 nm. Sistem smo vodili z računalniškim programom Waters Millenium 2010 Chromatography Manager, ki smo ga uporabili tudi za določanje količine obeh substanc z uporabo standardov salicilne (Sigma) in gentiske (Sigma) kisline. Za ločevanje SA in GA smo uporabili analitsko kolono reverzne faze Eurospher 100 C-18 tip Valco (velikost 250 x 4.6 mm, premer delcev 5 μ m) (Knauer). Za varovanje analitske kolone smo uporabili 5 cm dolgo predkolono Pelliguard LC-18 Supelcosil. Uporabili smo 2 topila, in sicer topilo A – 20 mM natrijev acetatni pufer (pH=5,5) z 0,02 % natrijevim azidom (Sigma) in topilo B – 100 % metanol (Lichrosolv Merck). Odzračevali smo z odzračevalnikom Knauer. Pretok je bil 1 ml/min. Gradient se je 20 min linearno spreminjal od 10 % do 25 % topila B. Z avtomatskim podajalnikom Waters 717plus smo injicirali po 5 oz. 10 μ l vzorca.

Salicilno in gentisko kislino smo identificirali s pomočjo primerjave retenzijskega časa standardov GA in SA (Sigma) ter njunih značilnih spektrov. Za računanje izkoristka smo za notranji standard uporabili salicilno in gentisko kislino, v vzorec smo ju dodali takoj za homogenizacijo (za določitev izgube proste SA oz. GA) in pred kislno hidrolizo (za določitev izgube konjugiranih oblik SA oz. GA). Vrhovi substanc, ki smo jih določili za SA in GA, so se povečali sorazmerno z dodanimi standardi, spektri pa so pri tem ostali enaki, torej smo v vzorcu pravilno identificirali SA oz. GA.

Na začetku in na koncu analize serije vzorcev, smo za dodatno potrditev prisotnosti salicilne oziroma gentiske kisline, v HPLC sistem injicirali še oba standarda.

3.2.2 Metoda II – Ekstrakcija in analiza salicilne (SA), jasmonske (JA) in fitodienojske kisline (PDA) s plinsko kromatografijo sklopljeno z masno spektrometrijo (GC-MS)

Metoda ekstrakcije rastlinskih hormonov je povzeta po Milavec (2004), medtem ko je bila analiza hormonov narejena po metodi Müller in sod. (2006).

Ekstrakcija je bila narejena na Nacionalnem inštitutu za biologijo v Ljubljani, medtem ko je kolonsko kromatografijo in GC-MS analize opravila Petra Düchting na Katedri za rastlinsko fiziologijo, Univerza Bochum, Nemčija.

3.2.2.1 Potek ekstrakcije

1. Pripravili smo terilnico, pestilo, spatulo in označili centrifugirke. Ta material smo ohladili v tekočem dušiku in pazili, da so vsi predmeti, katere pri ekstrakciji uporabljamo, ves čas na hladnem.

V ohlajeno terilnico smo dali večjo količino materiala iz petrijevke, katerega smo hranili na -84 °C in ga s pomočjo tekočega dušika zdrobili v fin prah. Nato smo v vsako od centrifugirk zatehtali 300 mg rastlinskega materiala. Za vsak vzorec smo naredili po tri ponovitve.

V vsako centrifugirko smo dodali po 20 µl zmesi internih standardov sobne temperature (hranili v hladilniku na -4 °C) in sicer je bila to mešanica standardov: 50 pmol [¹³C]₂-jasmonska kislina, 30 pmol [²H]₆-abscizinska kislina, 30 pmol [²H]₂-indol-3-očetna kislina, 30 pmol [²H]₅-12-oksofitodienojska kislina in 100 pmol [²H]₄-salicilna kislina (standarde nam je poslal dr. Axel Muller, Katedra za rastlinsko fiziologijo, Univerza Bochum, Nemčija; za svojo diplomsko nalogo sem uporabila le podatke za SA, JA in PDA).

Priprava mešanice standardov:

Iz Nemčije smo dobili posušene standarde, katerim smo dodali po 1 ml 100 % metanola in tako dobili naslednje koncentracije standardov:

50 μ M JA

10 μ M ABA, 10 μ M IAA, 10 μ M PDA

10 μ M SA

Tako smo vsakemu vzorcu dodali naslednjo mešanico standardov:

1 μ l 50 μ M JA (50 pmol JA)

3 μ l 10 μ M ABA, IAA, PDA (30 pmol ABA, IAA, PDA)

10 μ l 10 μ M SA (100 pmol JA)

Standard smo dodali ob steni centrifugirke in dodali 2 ml metanola.

Ker smo hkrati delali z več vzorci, smo jih v vmesnih stopnjah ekstrakcije hranili na hladnem (v skrinji na -20 °C).

2. Sledila je homogenizacija s homogenizerjem (IKA – Werke, Ultra-turrax, T25 basic). Začeli smo z minimalnimi obrati (1000 obratov/min) in počasi povečevali do maksimuma (6000 obratov/min), kar je trajalo približno 1 minuto. Po končani homogenizaciji smo nožke homogenizerja sprali z 2 ml metanola. Volumen vsakega vzorčka je bil na tej stopnji 4 ml.
3. Homogenat smo prefiltrirali skozi kolonice s filtri (Alltech, Extract-clean reservoirs, 40 ml, 100/PK), tekočino smo lovili v 10 ml bučke. Na kolonico smo dali majhen lijak, pretok pa smo uravnali tako, da vzoreček ni prehitro stekel skozi. Centrifugirko smo sprali še z 2 ml metanola, premešali s stekleno palčko in filtrirali. Za vsak vzorec smo zamenjali kolonico s filtrom.
4. Sledilo je sušenje vzorčka na rotavaporju (Bartelt, Labor & Datentechnik, HEIDOLPH WB 2000) pri pogojih: 45 °C, 50-70 mbar, 120 obratov/min. Vzoreček smo posušili do 0,5 ml.

5. 0,5 ml tekočine v bučki smo ob steni dodali 0,5 ml metanola in za boljše raztapljanje stresali 1 minuto v ultrasonični kopeli.

Tekočino smo nato prenesli v 1.5 ml Ependorf centrifugirko.

6. Sledilo je sušenje vzorčkov z dušikom do suhega, kar je trajalo cca. 40-50 minut.

Tako posušene vzorčke smo dobro označili in jih v zaprtih Ependorf centrifugirkah hranili v skrinji pri -20 °C.

Od tu naprej je analiza rastlinskih hormonov potekala v Nemčiji na Univerzi v Bochumu, na Katedri za rastlinsko fiziologijo, po metodi Müller in sod. (2006).

3.2.2.2 Kolonska kromatografija

Posušen vzorec se raztopi v 30 µl metanola, nato pa se raztopini doda 200 µl dietil etra. Sledi proces samega čiščenja.

Vzorci so bili čiščeni s pomočjo steklene kapilare, napolnjene z trdnimi delci aminopropila, mikroskopskih velikosti (Polygoprep-NH₂, Darmstadt, Nemčija).

Mikrokolono se najprej uravnoteži s spiranjem le te z začetno raztopino (0,5 ml dietil etra ali izo-heksana). Šele nato se skozi kolonico spusti vzorec. Kolono se nato spere s 150 µl CHCl₃ : 2-propanol = 2:1.

Hormonsko frakcijo eluiramo 2x s po 200µl dietil etra z 2 % očetne kisline.

Eluat se nato posuši do suhega v vakumski centrifugi (1 min na 100 mbar, nato še 10 min na 10 mbar).

3.2.2.3 Priprava vzorca za GC/MS analizo

Vse karboksil vsebujoče hormonske spojine, so analizirane z GC/MS kot metilni estri.

Postopek metiliranja:

Posušene vzorce se raztopi v 50 μ l metanola in doda 100 μ l raztopine diazometana v etru. Volumen celotnega vzorca se zmanjša na 50 μ l z nežnim prepihavanjem z dušikom, nato pa se ga prenese v vialo za avtomatski vzorčevalnik tekočin.

Metiliranemu vzorcu se doda 7 μ l kloroforma.

3.2.2.4 Plinska kromatografija – Masna spektrometrija (GC-MS)

Vsi vzorci so bili analizirani z masnim spektrometrom Varian Saturn 2000 tip ionska past, ki je vezan na plinski kromatograf Varian CP – 3800, opremljen z CombiPal avtoinjektorjem.

Pogoji analize

GC nastavitve:

- volumen injiciranega vzorca = 1 μ l
- temperatura injektorja 260 °C
- ZB-50 silika kapilarna kolona (30m, 0.25 mm, debelina filma 0.25 μ l, Phenomenex)
- Nosilni plin-He, 1ml/min
- Temperaturni program: 1 min na 50 °C
 linearno povečevanje za 40 °C/min do 150 °C
 6 min na 150 °C
 linearno povečevanje za 20 °C/min do 250 °C
 4 min na 250 °C
 temperatura prenosa 260 °C

MS nastavitve:

Masni spektrometer dela po programu CI-MRM z metanolom kot reaktantskim plinom in pozitivno ionsko detekcijo. Ta metoda je optimizirana za masne spektrometre z ionsko pastjo.

1 μ l vsakega vzorca se injicira v GC-MS sistem za ločitev in analizo masnih fragmentov.

Količino endogenih komponent se izračuna iz razmerja signalov med neoznačeno komponento (JA $m/z = 225$ $[M+H]^+$, 0.50 V; PDA $m/z = 307$ $[M+H]^+$, 0.60 V) in s stabilnim izotopom označenim standardom ($[^{13}C]_2$ -JA $m/z = 227$ $[M+H]^+$, $[^2H]_5$ -PDA $m/z = 312$ $[M+H]^+$).

(vir: Müller, 2002; Müller in sod., 2006)

Pri tej metodi so bili izkoristki 30 % (ustna informacija dr. Alex Müller).

3.2.3 Statistična obdelava podatkov

Dobljene podatke smo obdelali v programu Microsoft Excel v okolju Windows 98. Izračunali smo povprečne količine ter standardni odklon JA, PDA, proste in konjugirane SA oz. GA v treh paralelah enega vzorca. Količine vseh teh hormonov v različno obdelanih rastlinah smo primerjali s Studentovim t-testom. Uporabili smo Studentov t-test za neenake variance. Test smo računali s 5 % zanesljivostjo.

V grafih smo uporabili naslednje oznake za stopnjo signifikantnosti:

- $p > 0,05$ (neznačilno)
- *..... $p \leq 0,05$
- **..... $p \leq 0,01$
- ***..... $p \leq 0,001$

4 REZULTATI

4.1 METODA I – HPLC ANALIZA SALICILNE (SA) IN GENTISKE KISLINE (GA) TER NJUNIH KONJUGATOV PRI KROMPIRJU SORTE 'SANTE' 1 IN 3 URE PO OKUŽBI S PVY^{NTN}

Z metodo HPLC smo analizirali proste in konjugirane oblike salicilne(SA) in gentiske(GA) kisline. Analizirali smo slepo inokulirane in z virusom inokulirane rastline krompirja sorte 'Sante', odporne na okužbo s PVY^{NTN} in vrednosti prikazali v enotah pmol na gram sveže mase listov ali korenin krompirja (pmol/g SM).

4.1.1 Notranji standard

Notranji standard smo med samo ekstrakcijo uporabili zato, da smo dobili informacijo o izgubah, ki nastanejo tekom postopka ekstrakcije in analize rastlinskih hormonov. Pri analizi SA predstavlja poseben problem sublimacija le te med samo ekstrakcijo.

Za notranji standard smo uporabili hormona SA in GA, katera smo dodali organski fazi, ki je vsebovala proste oblike SA in GA (pred prvim sušenjem) in vodni fazi, ki je vsebovala konjugirane oblike SA in GA (pred kislno hidrolizo).

Za izračun izkoristka smo v eno od paralelk istega vzorca dodali znano količino SA in GA. Izbrana količina notranjega standarda obeh hormonov je bila podobna pričakovanim endogenim količinam SA in GA v rastlinah krompirja. Iz obeh paralelk smo ekstrahirali SA in GA po opisanem postopku (glej poglavje 3.2.1).

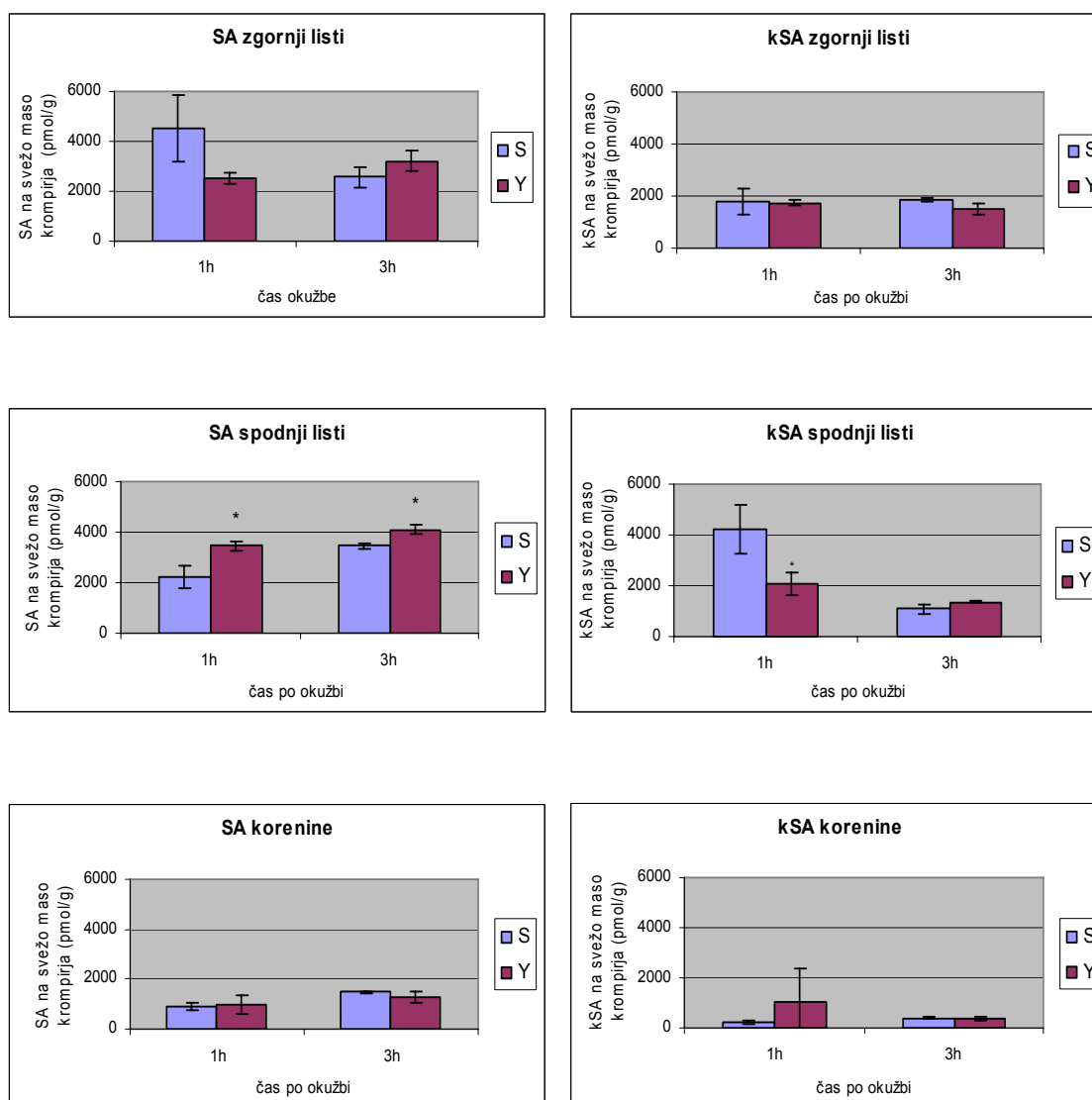
Preglednica 1 Izkoristek metode analize proste in konjugirane oblike salicilne kisline (SA, kSA) in gentiske kisline (GA, kGA)

Poskus	SA(%)	kSA(%)	GA(%)	kGA(%)
1	73.6	67	54.8	45.6
2	81.5	76.3	61.8	60.3
3	81.9	65.7	57.6	45.5
4	60.8	78.2	/	61.6
5	/	83.3	/	60.5
6	79	/	57.3	83.9
Srednja vrednost	75.4	74.1	57.9	59.6
Standardna deviacija	8.8	7.5	2.9	14.1

4.1.2 Analiza salicilne kisline

Vpliv okužbe – Pri analizi prostih oblik salicilne kisline smo opazili, da je le v spodnjih okuženih listih prišlo do statističnih razlik glede na slepo inokulirane rastline, in sicer je zanimivo, da je prišlo pri obeh časih do povišanja količine SA. V zgornjih listih in koreninah ni bilo opaziti bistvenih sprememb (slika 9).

Eno uro po okužbi smo pri spodnjih listih opazili značilno zmanjšanje količine konjugirane SA glede na slepo okužene rastline, medtem ko v zgornjih listih in koreninah nismo zaznali večjih sprememb. Tri ure po okužbi nismo zaznali nobenih značilnih sprememb nikjer po rastlini (slika 9).

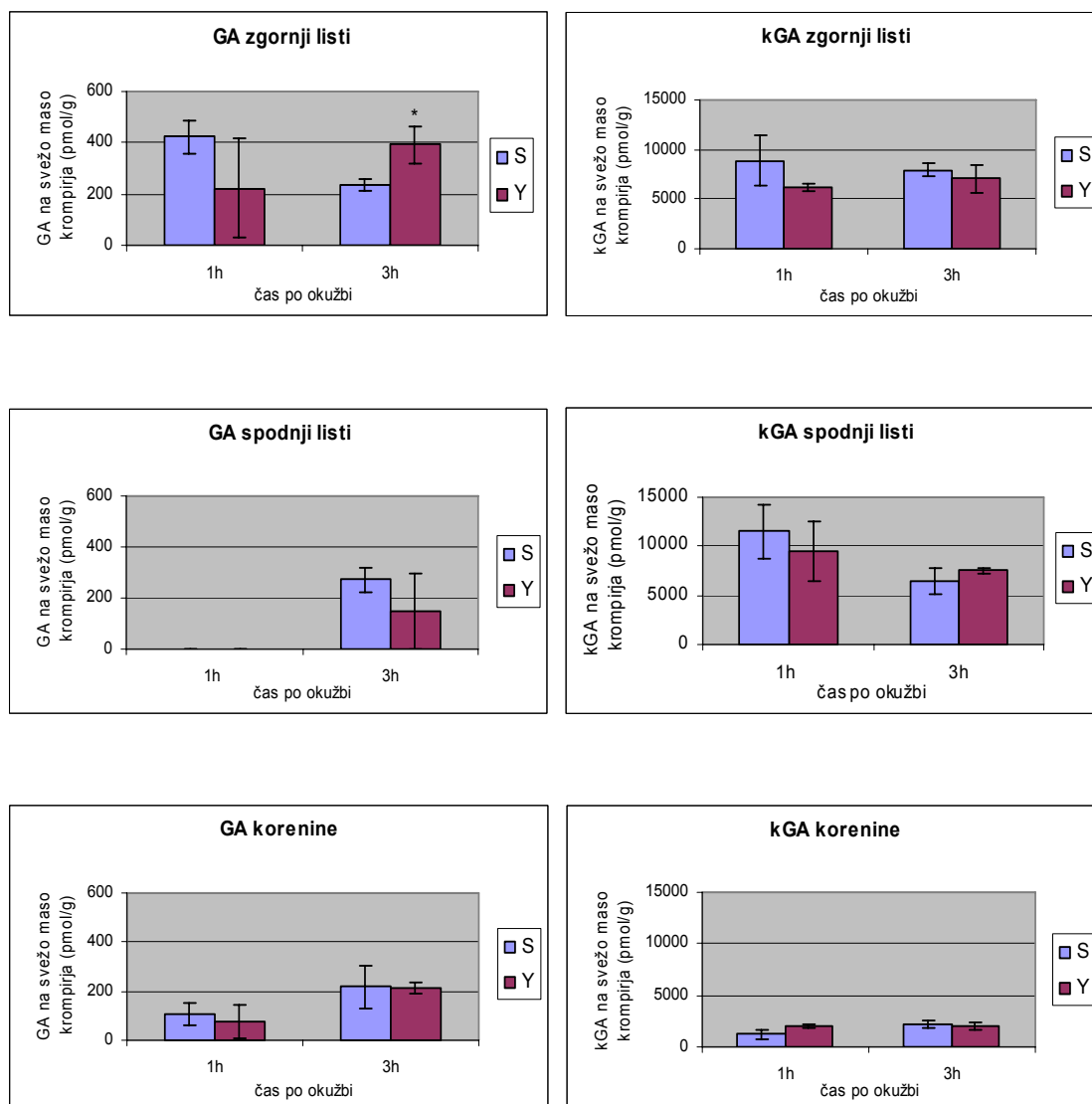


Slika 9 Količina proste salicilne kisline (SA) in konjugatov salicilne kisline (kSA) v zgornjih in spodnjih listih ter koreninah krompirja sorte 'Sante', 1 in 3 ure po okužbi s PVY^{NTN}, izražena v pmol na gram sveže mase. S- slepo inokulirane rastline, Y-okuzene rastline. * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$), *** ($p \leq 0,001$) - statistično značilne razlike med S in Y.

4.1.3 Analiza gentiske kisline

Vpliv okužbe – Proste oblike gentiske kisline se eno uro po okužbi niso signifikantno spremenile niti v zgornjih listih niti v koreninah, medtem ko je v spodnjih listih sploh nismo zaznali. Tri ure po okužbi pa je v zgornjih listih prišlo do statistično značilnega povišanja proste GA, v spodnjih listih in koreninah pa nismo opazili sprememb (slika 10).

Pri analizi konjugiranih oblik GA ni bilo opaziti večjih sprememb nikjer po rastlini (slika 10).



Slika 10 Količina proste gentiske kisline (GA) in konjugatov gentiske kisline (kGA) v zgornjih in spodnjih listih ter koreninah krompirja sorte 'Sante', 1 in 3 ure po okužbi s PVY^{NTN}, izražena v pmol na gram sveže mase. S- slepo inokulirane rastline, Y-okuzene rastline. * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$), *** ($p \leq 0,001$) - statistično značilne razlike med S in Y.

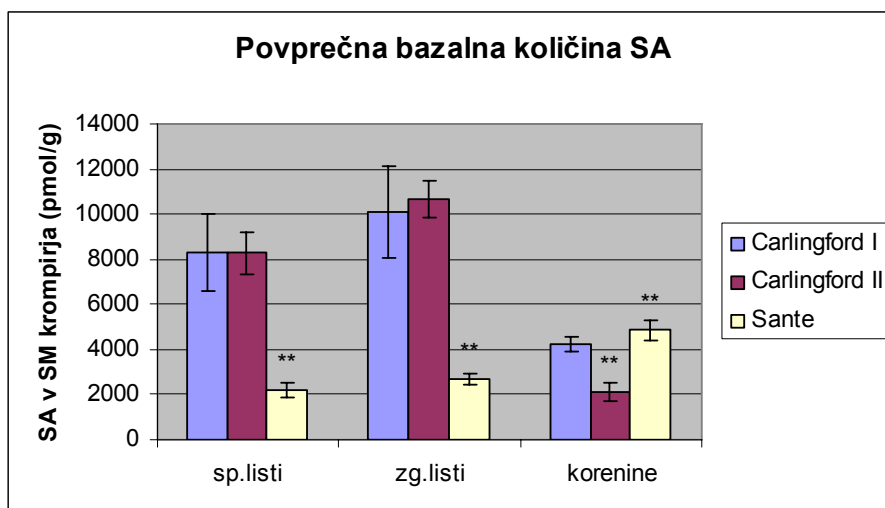
4.2 METODA II –ANALIZA SALICILNE (SA), JASMONSKE (JA), IN FITODIENOJSKE KISLINE (PDA) Z GC-MS PRI RAZLIČNO ODPORNIH SORTAH KROMPIRJA 1 IN 3 URE PO OKUŽBI S PVY^{NTN}

4.2.1 Bazalni nivo SA, JA in PDA v listih in koreninah rastlin

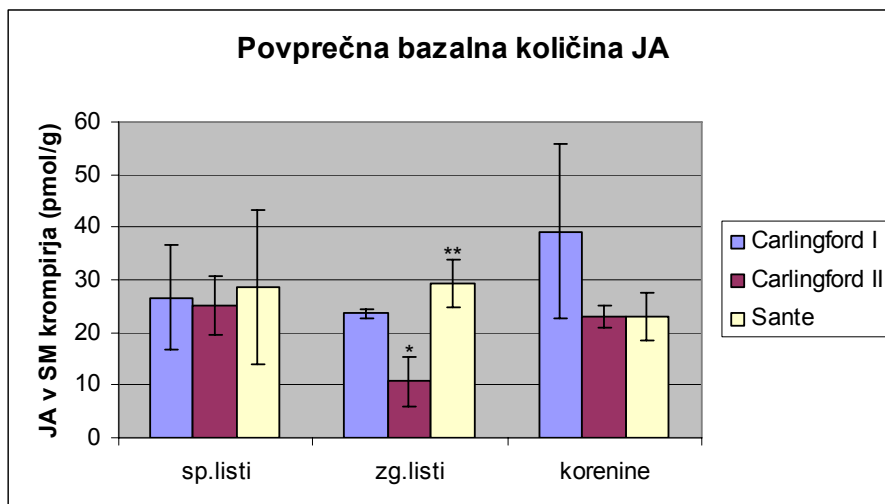
krompirja sort 'Carlingford' in 'Sante'

Merili smo endogeni nivo SA, JA in PDA v spodnjih in zgornjih listih ter koreninah intaktnih rastlin dveh vrst na krompirjev virus PVY^{NTN} odpornega krompirja - 'Carlingford' in 'Sante'. Količino prej omenjenih rastlinskih hormonov smo merili v dveh serijah rastlin sorte 'Carlingford' in eni seriji sorte 'Sante'. Količino substanc smo izrazili v pmol-ih na gram sveže mase listov ali korenin krompirja (pmol/g SM).

SA smo zasledili v obeh sortah krompirja, tako v spodnjih kot zgornjih listih ter koreninah. Količina bazalne SA pri sorti 'Carlingford' je pri obeh serijah dokaj visoka, tako pri zgornjih kot spodnjih listih, medtem ko je v koreninah ta vrednost manjša. Pri sorti 'Sante' so količine bazalne SA v listih manjše kot pri sorti 'Carlingford' (slika 11).



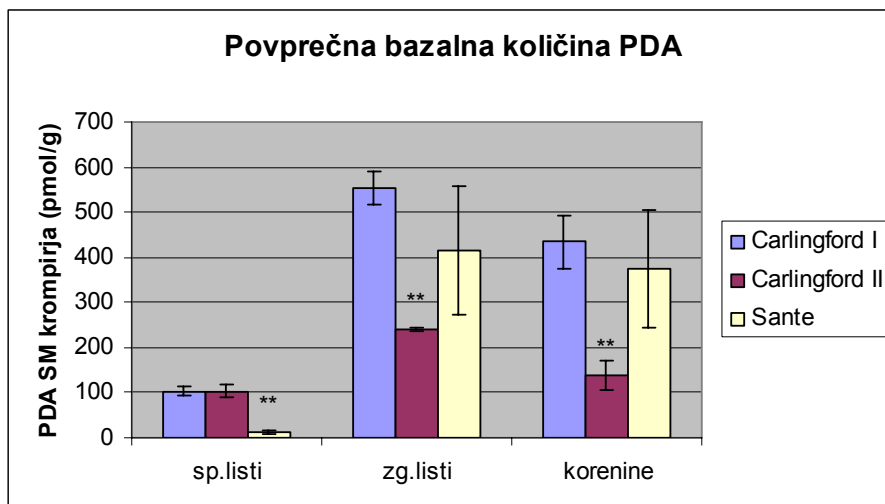
Slika 11 Povprečna vrednost bazalne količine SA ± SD v dveh sortah intaktnih rastlin krompirja 'Carlingford' (2 seriji) in 'Sante', izražena v pmol/g SM (sveže mase)



Slika 12 Povprečna vrednost bazalne količine JA \pm SD v dveh sortah intaktnih rastlin krompirja 'Carlingford' (2 seriji) in 'Sante', izražena v pmol/g SM (sveže mase)

V obeh sortah intaktnih rastlin krompirja smo zasledili JA na meji detekcije, tako v listih kot koreninah. V spodnjih listih je vrednost JA v obeh sortah podobna. Signifikantne razlike so opazne le pri zgornjih listih (slika 12).

PDA smo zaznali v obeh sortah krompirja in je prisotna v večjih količinah v zgornjih listih in koreninah. Zanimivo je, da so količine PDA v zgornjih listih in koreninah najvišje pri 1. seriji krompirja sorte 'Carlingford' in pri sorti 'Sante'. V spodnjih listih obeh serij sorte 'Carlingford' je vrednost PDA enaka, medtem ko je bila v sorti 'Sante' signifikantno manjša in smo jo komaj še zaznali. Signifikantne razlike pa smo opazili med obema serijama krompirja sorte 'Carlingford', kjer je bila pri 2. seriji količina bazalne PDA manjša tako v zgornjih listih kot koreninah (slika 13).



Slika 13 Povprečna vrednost bazalne količine PDA \pm SD v dveh sortah intaktnih rastlin krompirja 'Carlingford' (2 seriji) in 'Sante', izražena v pmol/g SM (sveže mase)

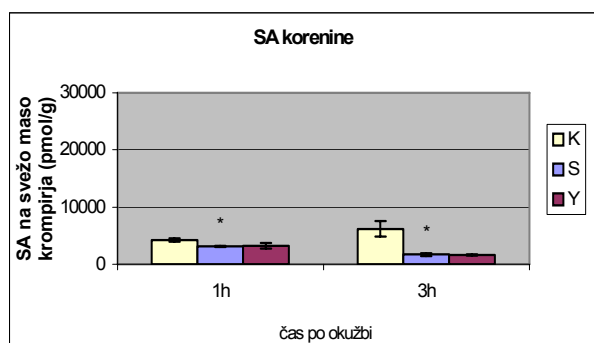
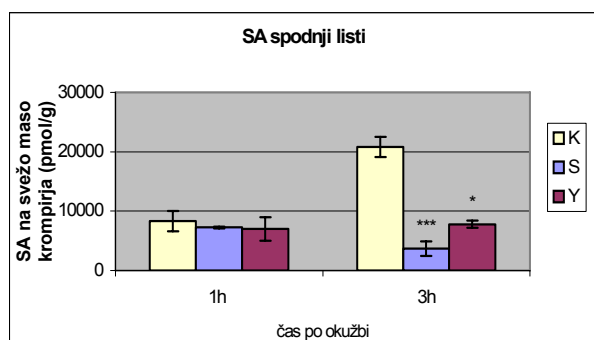
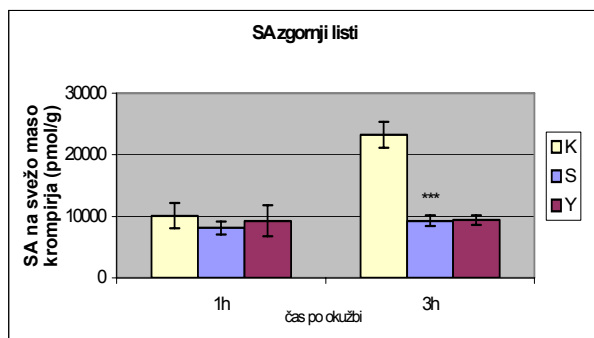
4.2.2 SA, JA in PDA v listih in koreninah rastlin krompirja sort 'Carlingford' in 'Sante' po slepi inokulaciji ter okužbi s PVY^{NTN}

4.2.2.1 Sorta 'Carlingford' – 1. poskus

4.2.2.1.1 Analize salicilne kisline

Vpliv slepe inokulacije – V zgornjih listih smo 3 ure po slepi inokulaciji opazili statistično manj salicilne kisline glede na intaktne rastline, kar pa je verjetno posledica nenavadno velike količine izmerjene SA v kontrolnih rastlinah, medtem ko se 1 uro po slepi inokulaciji nivo SA ni drastično spremenil. Prav tako smo v spodnjih listih statistično manj SA opazili po treh urah. Tudi v koreninah smo po eni in treh urah po slepi inokulaciji izmerili manj SA kot v netretiranih rastlinah. Po eni uri smo v zgornjih in spodnjih listih dobili podobne vrednosti SA, medtem ko je bilo v koreninah manj (slika 14).

Vpliv okužbe – Pri zgornjih listih in koreninah po eni uri kot treh urah ni bilo večjih razlik v nivoju SA glede na slepo inokulirane rastline. V spodnjih listih pa smo 3 ure po okužbi opazili značilno več SA, kot v slepo inokuliranih rastlinah (slika 14).



Slika 14 Količina salicilne kisline (SA) v zgornjih intaktnih in spodnjih inokuliranih listih ter koreninah krompirja sorte 'Carlingford' – 1. poskus, 1 in 3 ure po okužbi s PVY^{NTN}, izražena v pmol na g sveže mase. K-kontrola, intaktne rastline, S-slepo inokulirane rastline, Y-okuzene rastline. * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$), *** ($p \leq 0,001$) - statistično značilne razlike med K in S ter S in Y.

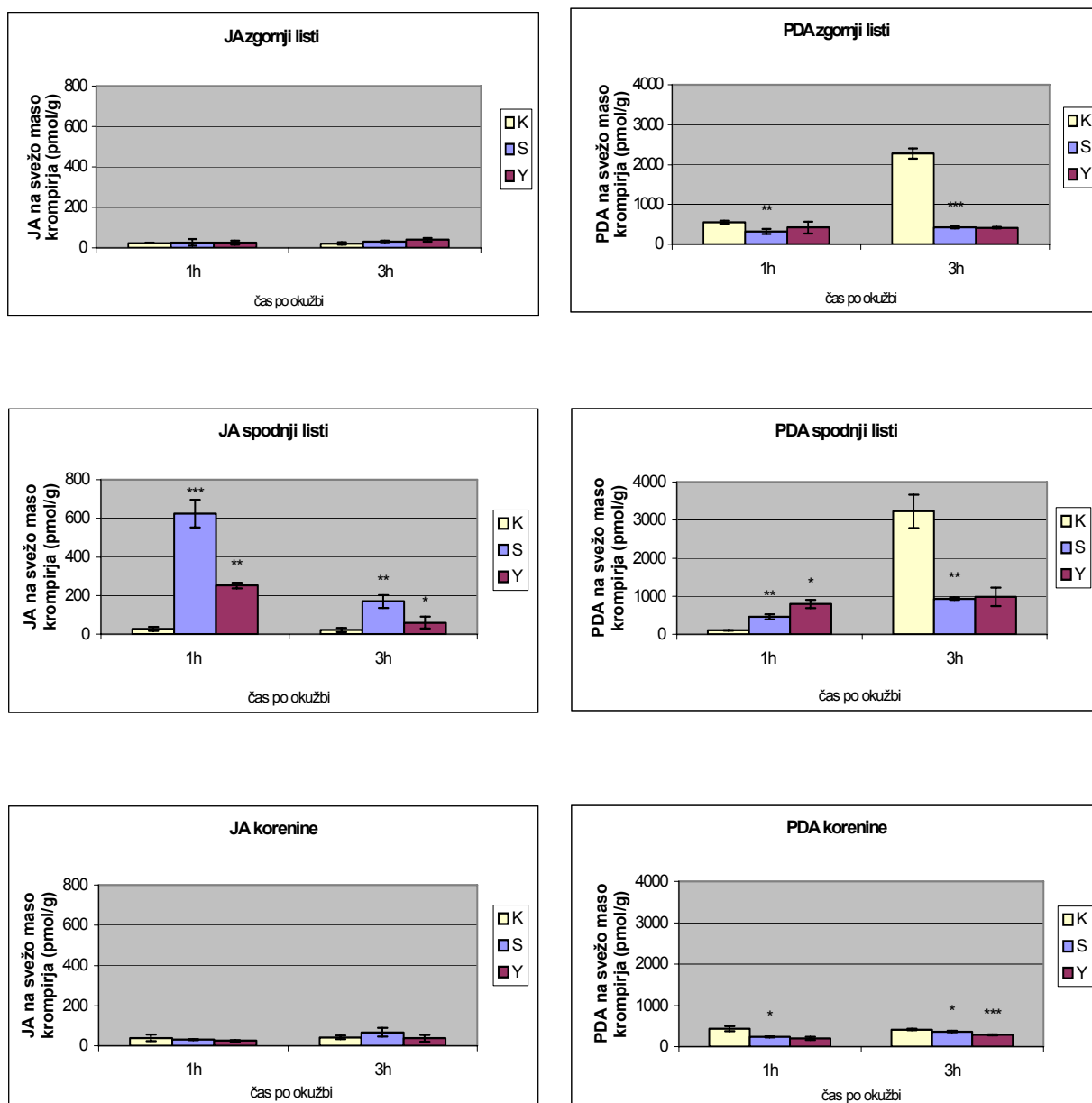
4.2.2.1.2 Analize jasmonske in fitodienojske kisline

Vpliv slepe inokulacije – Opazili smo statistično povišanje količine JA v spodnjih listih – eno uro po slepi inokulaciji je prišlo do drastičnega povišanja, medtem ko so 3 ure po njej še vedno statistično višje vrednosti glede na netretirane rastline. Do signifikantnih sprememb v količini JA ni prišlo niti v zgornjih listih, niti v koreninah (slika 15).

Vrednosti PDA po slepi inokulaciji so statistično manjše tako po eni uri kot po treh urah v zgornjih listih in v koreninah. Edina izjema so spodnji listi, kjer je eno uro po slepi inokulaciji prišlo do statistično značilnega povišanja PDA (slika 15).

Vpliv okužbe – Statistično značilne razlike JA glede na slepo inokulirane rastline smo opazili pri spodnjih listih, in sicer je prišlo do zmanjšanja nivoja JA tako po eni kot po treh urah. V zgornjih listih in koreninah nismo opazili večjih sprememb v vrednosti JA (slika 15).

Do statistično pomembnih razlik v vrednosti PDA je prišlo le v spodnjih listih 1 uro po okužbi in sicer je prišlo do signifikantnega povečanja v količini PDA in pa v koreninah po 3 urah, kjer je prišlo do značilnega zmanjšanja v količini PDA (slika 15).



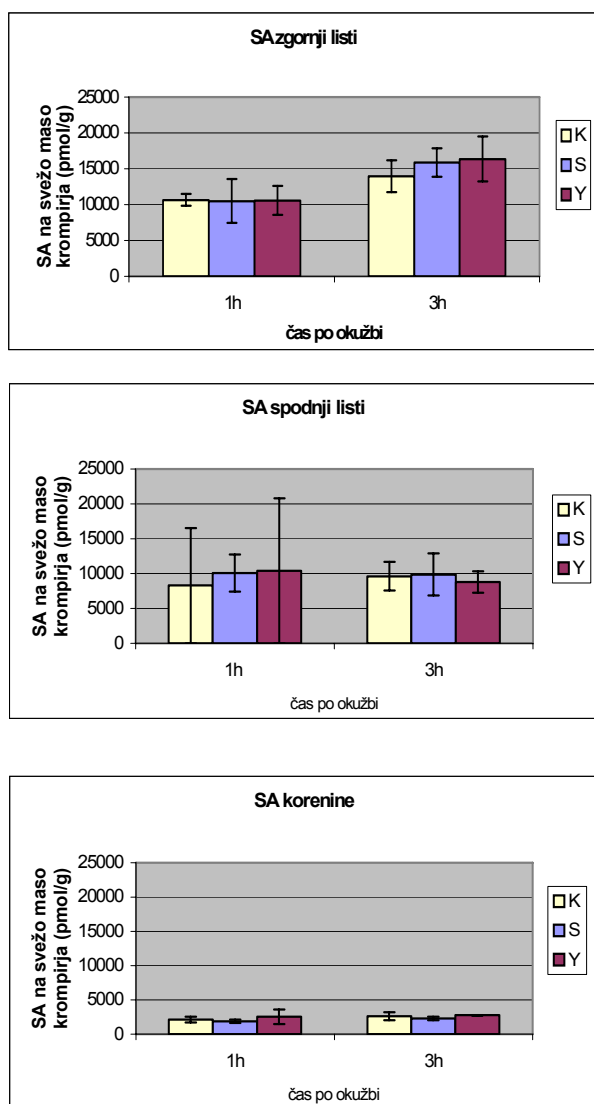
Slika 15 Količina jasmonske (JA) in fitodienojske kisline (PDA) v zgornjih intaktnih in spodnjih inokuliranih listih ter koreninah krompirja sorte 'Carlingford' – 1. poskus, 1 in 3 ure po okužbi s PVY^{NTN}, izražena v pmol na g sveže mase. K-kontrola, intaktne rastline, S-slepo inokulirane rastline, Y-okuzene rastline. * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$), *** ($p \leq 0,001$) - statistično značilne razlike med K in S ter S in Y.

4.2.2.2 Sorta 'Carlingford' – 2. poskus

4.2.2.2.1 Analize salicilne kisline

Vpliv slepe inokulacije – V tem poskusu po slepi inokulaciji nismo nikjer v rastlini opazili statistično značilnih razlik v SA (slika 16).

Vpliv okužbe – Tudi v okuženih rastlinah nismo opazili statistično pomembnih razlik v vsebnosti SA (slika 16).



Slika 16 Količina salicilne kisline (SA) v zgornjih intaktnih in spodnjih inokuliranih listih ter koreninah krompirja sorte 'Carlingford' – 2. poskus, 1 in 3 ure po okužbi s PVY^{NTN}, izražena v pmol na g sveže mase. K-kontrola, intaktne rastline, S-slepo inokulirane rastline, Y-okuzene rastline. * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$), *** ($p \leq 0,001$) - statistično značilne razlike med K in S ter S in Y.

4.2.2.2 Analize jasmonske in fitodienojske kisline

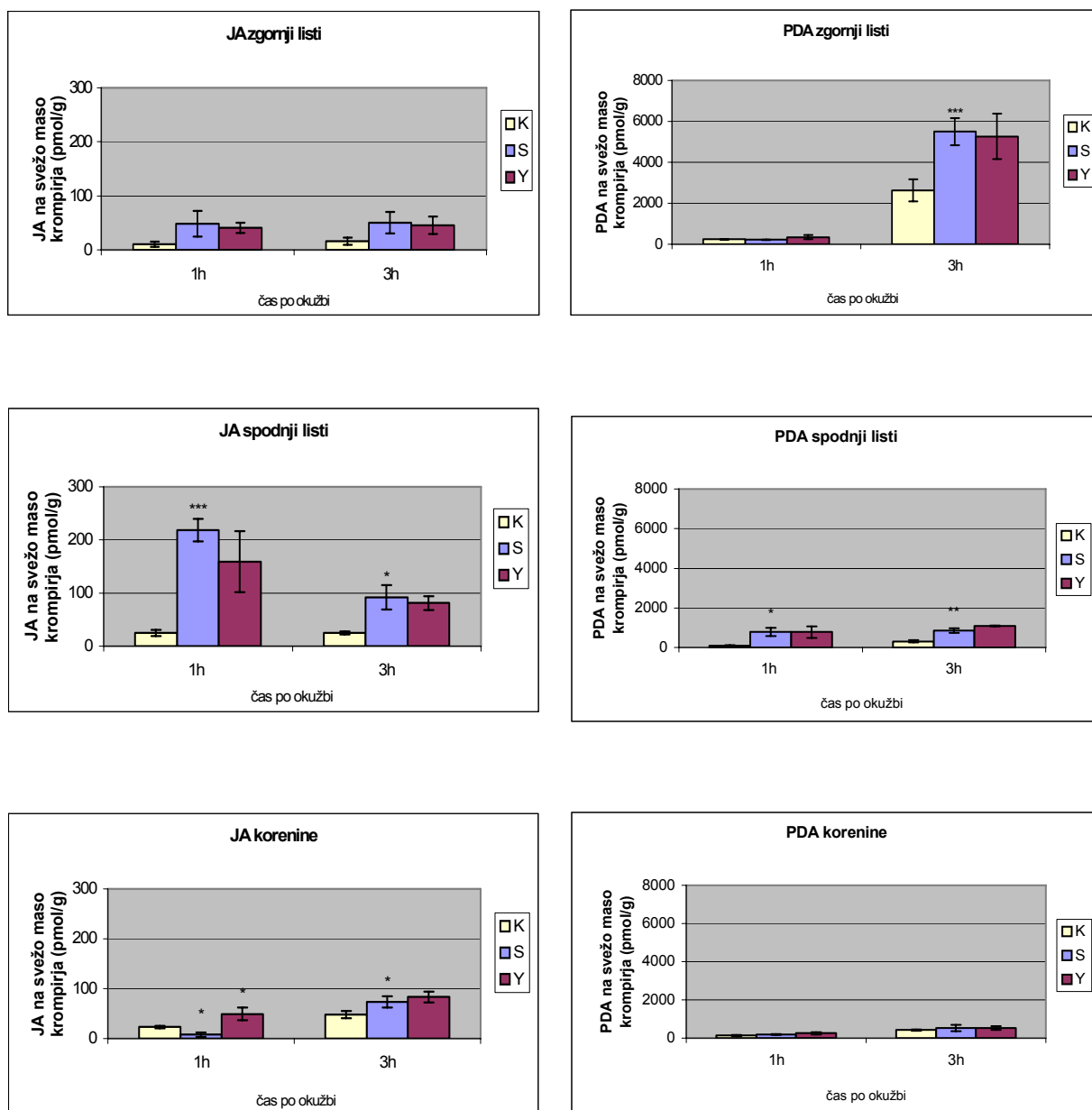
Vpliv slepe inokulacije – Pri zgornjih listih ni bilo opaziti večjih sprememb v količini JA, saj se vrednosti le te tako pri eni kot pri treh urah gibljejo okrog 40 pmol/g SM, kar je podobno vrednostim iz 1. poskusa. Za razliko od zgornjih listov, smo pri spodnjih dobili pri obeh časih statistično značilno povečanje JA, do česar je prišlo tudi pri prvem poskusu. Pri koreninah se je količina JA po eni uri statistično zmanjšala, po treh urah pa statistično povečala, kar sovпада s 1. poskusom, le da pri tem spremembe niso bile statistično značilne (slika 17).

Tri ure po slepi inokulaciji je v zgornjih neinokuliranih listih prišlo do statističnega povišanja PDA glede na netretirane rastline, medtem ko eno uro po njej ni prišlo do sprememb.

V spodnjih inokuliranih listih smo pri obeh časih dobili statistično povišanje PDA glede na intaktne rastline. Pri koreninah nismo opazili nobenih signifikantnih sprememb (slika 17).

Vpliv okužbe – Zanimivo, da tu nismo izmerili statistično pomembnih razlik v količini JA, ki bi jih lahko pripisali vplivu okužbe, medtem ko so bile te razlike očitne pri ranitvi oz. slepi inokulaciji. V zgornjih listih ni bilo nobenih sprememb v količini JA, prav tako v zgornjih listih 1. poskusa krompirja sorte 'Carlingford'. V inokuliranih spodnjih listih je prišlo po okužbi pri obeh časih do opaznega zmanjšanja JA glede na slepo inokulirane rastline, a ne do statistično značilnega kot pri 1. poskusu. Do statističnega povišanja JA je prišlo eno uro po okužbi v koreninah, medtem ko po treh urah ni bilo opaznih sprememb (slika 17).

V celotni rastlini po okužbi ni prišlo do statistično značilnih razlik v količini PDA. V zgornjih listih eno uro po okužbi ni prišlo do sprememb, medtem ko je po treh urah prišlo do rahlega zmanjšanja količine PDA glede na slepo inokulirane rastline, kot se je zgodilo tudi pri 1. poskusu, le da so tu vrednosti 10x višje. V spodnjih listih in koreninah ni prišlo do bistvenih sprememb, vrednosti PDA so dokaj podobne vrednostim iz 1. poskusa (slika 17).



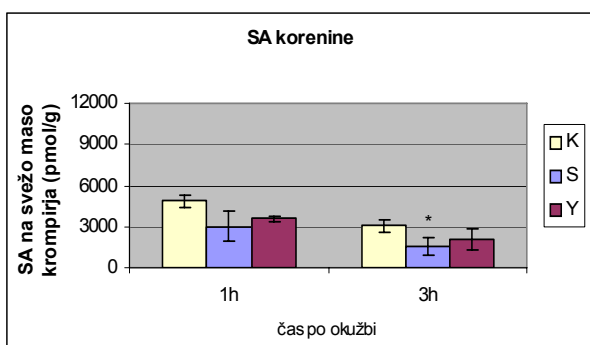
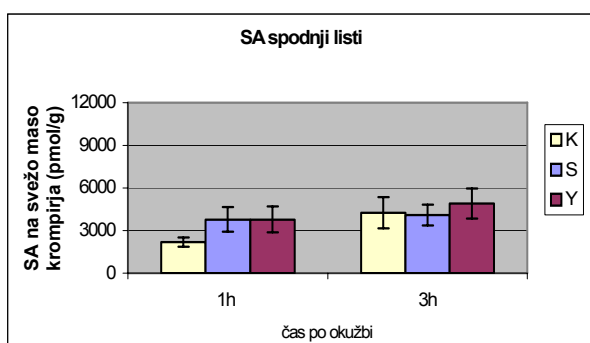
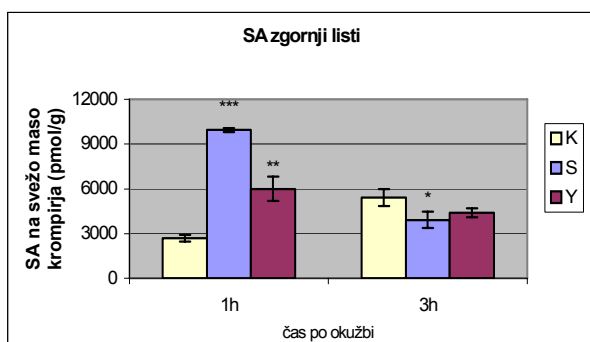
Slika 17 Količina jasmonske (JA) in fitodienojske kisline (PDA) v zgornjih intaktnih in spodnjih inokuliranih listih ter koreninah krompirja sorte 'Carlingford' – 2. poskus, 1 in 3 ure po okužbi s PVY^{NTN}, izražena v pmol na g sveže mase. K-kontrola, intaktne rastline, S-slepo inokulirane rastline, Y-okuzene rastline. * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$), *** ($p \leq 0,001$) - statistično značilne razlike med K in S ter S in Y.

4.2.2.3 Sorta 'Sante'

4.2.2.3.1 Analize salicilne kisline

Vpliv slepe inokulacije – Eno uro po slepi inokulaciji je v zgornjih listih prišlo do statistično značilnega povišanja SA glede na intaktne rastline, medtem ko se je tri ure po slepi inokulaciji količina SA signifikantno zmanjšala. V spodnjih listih nismo opazili statistično pomembnih razlik, medtem ko smo v koreninah 3 ure po slepi inokulaciji opazili statistično zmanjšanje količine SA glede na intaktne rastline (slika 18).

Vpliv okužbe – Statistično značilne razlike v SA smo opazili le eno uro po okužbi v zgornjih listih, in sicer je prišlo do znižanja v količini SA. V spodnjih listih in koreninah nismo zaznali signifikantno pomembnih razlik v količini SA (slika 18).



Slika 18 Količina salicilne kisline (SA) v zgornjih intaktnih in spodnjih inokuliranih listih ter koreninah krompirja sorte 'Sante', 1 in 3 ure po okužbi s PVY^{NTN}, izražena v pmol na g sveže mase. K-kontrola, intaktne rastline, S-slepo inokulirane rastline, Y-okuzene rastline. * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$), *** ($p \leq 0,001$) - statistično značilne razlike med K in S ter S in Y.

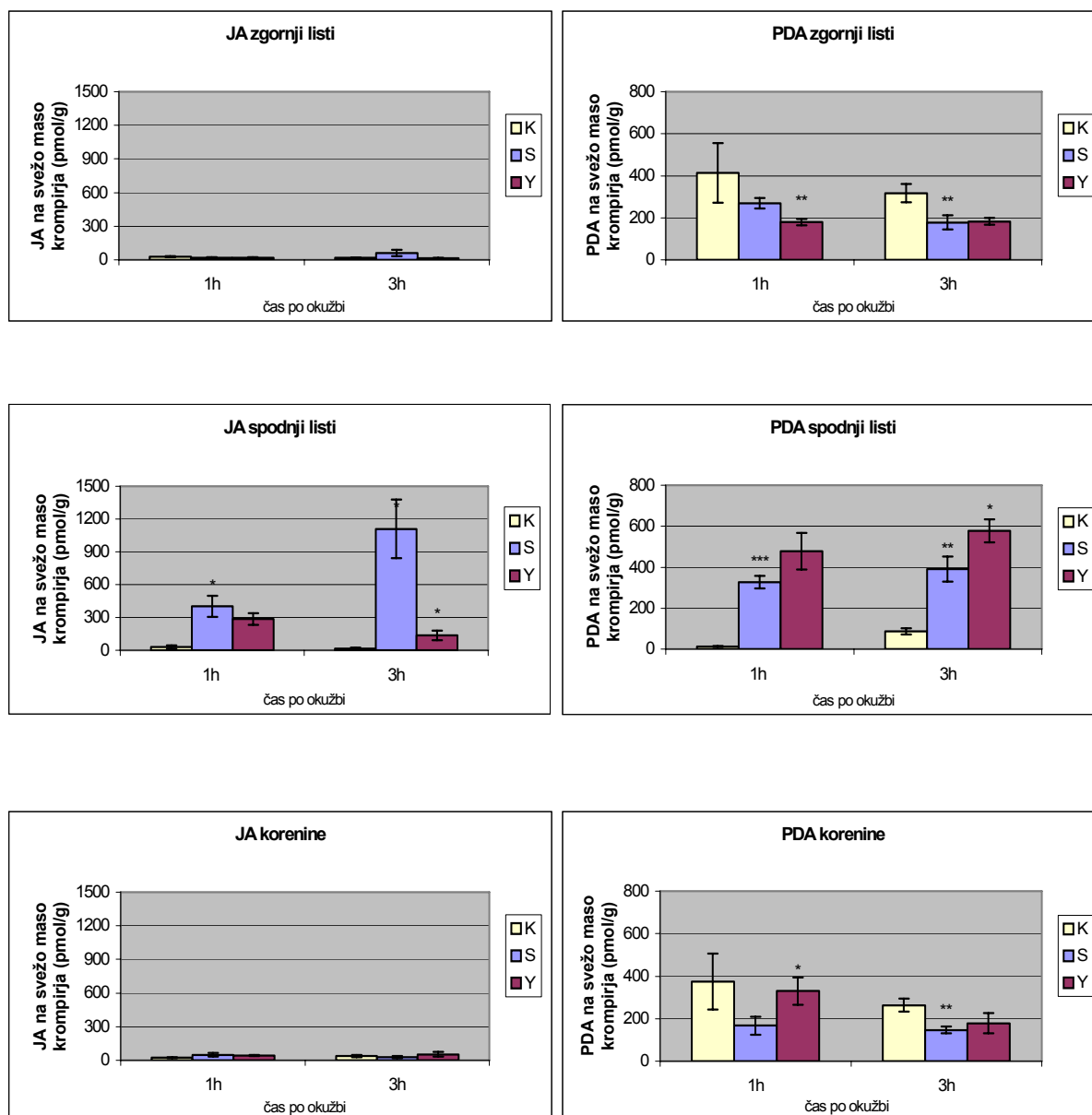
4.2.2.3.2 Analize jasmonske in fitodienojske kisline

Vpliv slepe inokulacije – V zgornjih listih in koreninah smo v intaktnih in slepo inokuliranih rastlinah komaj zaznali JA. Prisotna je v zelo majhnih količinah in sicer se vrednosti gibljejo od 20-60 pmol/g SM. Do statističnega povišanja JA je prišlo le v spodnjih listih tako eno uro kot tri ure po slepi inokulaciji, vrednosti po treh urah pa so skoraj trikrat višje (slika 19).

V zgornjih listih in koreninah je tako eno uro kot tri ure po slepi inokulaciji prišlo do zmanjšanja količine PDA glede na intaktne rastline, le da so razlike po treh urah statistično značilne. V spodnjih listih pa smo pri PDA opazili podoben trend kot pri JA, saj je prišlo do statističnega povišanja PDA tako eno uro kot tri ure po okužbi (slika 19).

Vpliv okužbe – Sama okužba rastlin ni bistveno vplivala na količino JA v listih in koreninah. Statistično značilno razliko smo dobili le v spodnjih listih tri ure po okužbi, kjer je prišlo do zmanjšanja JA, medtem ko drugje ni opaziti bistvenih sprememb. Omenimo še, da je v spodnjih listih uro po okužbi vrednost JA manjša kot pri slepi inokulaciji (slika 19).

Vrednost PDA se je v zgornjih listih uro po okužbi statistično zmanjšala, tri ure po okužbi pa ni bilo bistvenih sprememb. Pri spodnjih listih in koreninah pa je pri obeh časih prišlo do povišanja v količini PDA. Statistično značilne razlike smo opazili v spodnjih listih tri ure po okužbi in pa uro po okužbi v koreninah (slika 19).



Slika 19 Količina jasmonske (JA) in fitodienojske kisline (PDA) v zgornjih intaktnih in spodnjih inokuliranih listih ter koreninah krompirja sorte 'Sante', 1 in 3 ure po okužbi s PVY^{NTN}, izražena v pmol na g sveže mase. K-kontrola, intaktne rastline, S-slepo inokulirane rastline, Y-okuzene rastline. * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$), *** ($p \leq 0,001$) - statistično značilne razlike med K in S ter S in Y.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Namen našega dela je bilo ugotoviti ali sta JA in SA vpleteni v odziv dveh odpornih sort krompirja na okužbo s krompirjevim virusom PVY^{NTN}. Proučevali smo zgodnji odziv odpornih sort krompirja 'Sante' in 'Carlingford', na virusno okužbo. V odpornih sortah krompirja 'Sante' in 'Carlingford' odpornost izhaja iz vrste *Solanum stoloniferum*, saj ima ta vrsta več genov za odpornost. Pri sorti 'Carlingford' je odpornost verjetno poligenska, na kar kažejo rezultati križanja sorte 'Carlingford' z občutljivo sorto, pri čemer je le nekaj odstotkov potomcev odpornih. Geni za rezistenco med drugim kodirajo z glicinom bogate proteine in nukleotid-vezavne proteine, ki sodelujejo pri prepoznavanju povzročitelja bolezni in odgovoru rastline na okužbo (Baker in sod., 1997). Na PVY^{NTN} rezistentna sorta 'Sante' pa ima s klasičnim križanjem vnesen dominanten gen za rezistenco $R_{y_{sto}}$, ki je bil izoliran iz vrste *Solanum stoloniferum* (Hinrichs in sod., 1998).

Analiza rastlinskih hormonov je težavna predvsem zaradi nizkih koncentracij hormonov prisotnih v rastlini. V primeru analize SA smo primerjali dve različni metodi, HPLC in GC-MS.

5.1 EKSTRAKCIJA IN ANALIZA SALICILNE IN GENTISKE KISLINE IZ RASTLIN KROMPIRJA S HPLC

Vpliv okužbe s PVY^{NTN} na endogeni nivo SA in GA ter njunih metabolnih derivatov smo proučevali v odpornih rastlinah krompirja sorte 'Sante'. Sprva smo hoteli ugotoviti ali obstaja povezava med odpornostjo rastlin na ta virus in med bazalno količino proste in konjugirane salicilne oz. gentiske kisline. Z namenom, da ugotovimo ali sta SA in GA vključeni v zgodnji obrambni odziv rastline na okužbo, smo njuno količino merili eno uro in tri ure po okužbi. Poznano je, da SA deluje kot aktivator obrambnih mehanizmov v številnih rastlinah (Yalpani in sod., 1993; Leon in sod., 1993). Belles in sod. (1999) pa so v paradižniku odkrili, da pri indukciji obrambe na patogene mikroorganizme sodeluje poleg SA tudi GA.

Rastlinski hormoni so naravno prisotne organske spojine, ki so aktivne pri nizkih koncentracijah. Za njihovo analizo smo potrebovali občutljivo in prilagodljivo metodo, ki bi omogočila zaznavo količin pod 50 ng. Tako smo pri prvi metodi za analizo količine hormonov, kot sta SA in GA, uporabili HPLC, med drugim bi z uporabo te metode lahko naše rezultate primerjali s preliminarnimi (Purnat, 2005). Ker pri analizi s HPLC lahko prisotnost nečistoč močno ovira identifikacijo in kvantifikacijo hormonov, je pred analizo s HPLC potrebno intenzivno čiščenje vzorcev.

Za ekstrakcijo in analizo hormonov smo uporabili že dalj časa znano metodo (Raskin in sod., 1989; Belles in sod., 1999; Verberne in sod., 2002), katero je priredila že Krečič Stres (2001) in jo je Purnat (2005) še izboljšala z dodatkom notranjih standardov SA in GA ter z uporabo NaOH med ekstrakcijo za preprečevanje sublimacije SA.

Sama analiza salicilne kisline je težavna. Poleg tega da je prisotna v rastlini v nizkih koncentracijah, je največji problem v njeni sublimaciji pri višjih temperaturah ter v vakuumu. Metoda izolacije SA vključuje evaporacijo v organskih topilih, zato rezultati variirajo. Za rešitev tega problema in za ugotavljanje izkoristkov, smo uporabili notranji standard, katerega lastnosti morajo biti podobne kot SA in GA. Imeti mora podobne kemijske in fizikalne lastnosti, vključno s hlapnostjo in med ekstrakcijo se mora izgubljati enako kot SA in GA.

Naši predhodniki (Verberne in sod., 2002; Krečič Stres, 2001) so kot notranji standard uporabljali *orto*-anisko kislino (*o*-ANI) in 3,4 – dihidroksibenzojsko kislino (3,4-DHBA).

Uporaba *orto*-aniske kisline se je izkazala za neprimerno, saj naj rezultati ne bi bili ponovljivi (Verberne in sod., 2002), poleg tega pa so razlike med različno tretiranimi rastlinami celo bolj statistično značilne brez uporabe *o*-ANI (Krečič Stres, 2001). Tudi uporaba 3,4-DHBA kot notranji standard se ni izkazala za primerno, saj moti detekcijo GA, poleg tega pa so Verberne in sod. (2002) ugotovili, da se med kislno hidrolizo nekaj 3,4-DHBA sprosti iz rastlinskega materiala, zato naj ne bi bila primerna pri določanju konjugiranih oblik SA in GA. Tako smo se poslužili metode, katero je uporabljala že Purnat (2005), ki je za ugotavljanje izgub pri izolaciji in analizi SA in GA, uporabljala metodo, pri kateri je v eno od paralelk istega vzorca dodala približno toliko SA in GA, kot ju vsebuje sam vzorec. Na ta način smo rešili problem, ki se pojavlja pri uporabi drugih standardov, saj se dodani SA in GA med ekstrakcijo

izgubljata enako kot endogena SA in GA. Na podlagi dobljenih rezultatov obeh paralelk smo izračunali izkoristke (tabela 1).

Boljše rezultate in izkoristke pa smo dosegli tudi z uporabo NaOH med ekstrakcijo in sicer za preprečevanje sublimacije SA. Z dodatkom NaOH salicilno kislino spremenimo v natrijev salicilat, ki je manj hlapen, s čimer dobimo boljšo ponovljivost rezultatov in višje izkoristke. Slednje smo skušali še izboljšati tako, da metanolnih ekstraktov na koncu nismo posušili do suhega, ampak smo v bučki pustili približno 20 µl ekstrakta.

Povprečni izmerjeni izkoristek za prosto SA je bil 75 %, za konjugirano SA pa 74 %, kar sovпада s predhodno izmerjenimi izkoristki: Verberne in sod. (2002) (71-91 % za prosto SA in 65-79 % za konjugirano SA) in Krečič Stres (2001) (z uporabo *o*-ANI kot notranji standard) (prosta in konjugirana SA 65-80 %) ter Purnat (2005) (79 % prosta SA in 67 % konjugirana SA).

5.1.1 Vpliv okužbe na endogeno količino SA in GA

Pri odporni sorti 'Sante' smo za razliko od Purnat (2005) opazili trend zviševanja proste SA v spodnjih inokuliranih listih tako eno uro kot tri ure po okužbi. Kar se tiče konjugatov SA, pa smo izmerili statistično zmanjšanje le teh v spodnjih listih rastlin eno uro po okužbi. Ti rezultati ne potrjujejo preliminarne raziskave (Purnat, 2005), kjer so opazili trend zviševanja tako proste kot konjugirane SA v zgornjih listih in koreninah okuženih rastlin uro po okužbi. Do statistično značilnega povečanja GA je prišlo v zgornjih listih tri ure po okužbi, medtem ko pri konjugatih GA ni bilo opaziti večjih sprememb, medtem ko je Purnat (2005) izmerila statistično značilno več celokupne GA v zgornjih listih uro po okužbi in značilno manj v koreninah tri ure po okužbi. V obeh primerih je bilo torej opaziti več GA v zgornjih listih okuženih rastlin, kar kaže na sistemski odziv rastline na okužbo s PVY^{NTN}.

Pravih razlogov za razlike v rezultatih ne poznamo, do razlik pa lahko prihaja zaradi več dejavnikov. Ena od možnosti da pride do razlik v rezultatih, je že samo gojenje rastlin v različnih letnih časih. Druge razloge bi lahko našli v sami ekstrakciji in analizi. Potek ekstrakcije je težaven, še posebej zaradi prej omenjene sublimacije SA. Možno je, da so razlike ki smo jih izmerili premajhne, da bi imele fiziološki učinek v rastlini.

Glede na omenjene razlike v rezultatih bi težko ovrednotili vlogo SA in GA v odzivu odporne sorte 'Sante' na okužbo s PVY^{NTN}. Rezultati Krečič Stres in sod. (2005) kažejo na to, da SA in GA nista udeleženi v odziv na PVY^{NTN} ekstremno rezistentne transgene sorte 'Igor'. Najnižje količine proste in konjugirane SA je zaznala v močno odporni sorti 'Sante', medtem ko proste GA tu ni bilo zaznati. Ekstremno odporna transformanta sorte 'Igor' je vsebovala najvišje bazalne količine celokupne SA in najnižje količine celokupne GA. Virusna okužba ni povzročila sprememb v količini SA in GA.

5.2 ANALIZA JASMONSKE, FITODIENOJSKE IN SALICILNE KISLINE IZ RASTLIN KROMPIRJA SORTE 'SANTE' IN 'CARLINGFORD' Z GC-MS

Glede na podatke iz literature, ki kažejo vpletenost JA in SA v odpornost rastlin na patogene mikroorganizme, smo pričakovali spremembo v metabolizmu teh dveh substanc tudi po virusni okužbi s PVY^{NTN}. Preliminarni rezultati (Milovanovič Jarh, 2004) so pokazali na povečanje endogene količine JA pri odporni sorti krompirja 'Sante' že eno uro po virusni okužbi.

Količino jasmonske, salicilne in fitodienojske kisline smo izmerili z GC-MS metodo. Uporabljeno metodo odlikuje visoka občutljivost in natančnost ter zmožnost rutinskih analiz kar 60 rastlinskih vzorcev, z maso med 20 mg do 5 g, na dan. Poleg tega je metoda prilagojena za kvantitativne analize kislinskih hormonov rastlin in sorodnih spojin. Pri tej metodi so bili izkoristki le 30 % (ustna informacija dr. Axel Müller). GC-MS je za analizo rastlinskih hormonov uporabnejša metoda od HPLC, saj se snovi ločijo in so zaznane z masnim spektrom tudi v prisotnosti nečistoč. Z GC-MS lahko analiziramo tudi več hormonov istočasno.

5.2.1 Bazalni nivo JA, SA in PDA v odpornih sortah krompirja

Bazalni nivo jasmonske, fitodienojske in salicilne kisline pred samo okužbo s PVY^{NTN} smo določali v intaktnih rastlinah krompirja sorte 'Sante' in 'Carlingford'. Ker smo pri obeh sortah določili tako JA, PDA kot SA, pomeni, da so ti hormoni prisotni v rastlinah v večjih ali manjših količinah, ne glede na to, ali je rastlina podvržena stresu ali ne.

Ugotovili smo, da so bazalne količine JA v obeh sortah krompirja najnižje od vseh treh analiziranih hormonov. Glede na rezultate ne moremo zaključiti da je v kateri od odpornih sort krompirja statistično več oz. manj bazalne JA.

Milovanovič Jarh (2004) ni ugotovila razlik v količini bazalne JA v odporni sorti 'Sante' in občutljivi sorti 'Desirée', kar kaže na to, da bazalni nivo JA ne vpliva na občutljivost oz. odpornost sorte.

Bazalno količino JA (pod 30 pmol/g SM) sem izmerila v vseh delih rastline pri obeh sortah krompirja. Drugi avtorji navajajo, da je bazalni nivo JA različen v različnih rastlinskih tkivih. Količina hormona je precej odvisna od tipa tkiva, faze rasti in zunanjih dražljajev (Sembdner in Parthier, 1993). Ugotovili pa so tudi, da je najnižji nivo bazalne JA v koreninah in v razvitih listih (Creelman in Mullet, 1995).

Bazalne količine PDA, ki je predhodnik sinteze JA, so za razliko od količin JA precej večje, v obeh odpornih sortah v povprečju 263 ng/g SM, največ smo jo izmerili v zgornjih listih in koreninah.

V primerjavi z JA in PDA je SA prisotna v obeh odpornih sortah krompirja v največjih količinah, v povprečju kar 5931 ng/g SM, kar je 180-krat več kot zastopanost hormona JA. Prisotnost SA je signifikantno večja v obeh serijah manj odpornega krompirja sorte 'Carlingford' v spodnjih in zgornjih listih, kot v odpornejši sorti 'Sante', pri slednji je količina bazalne SA statistično večja le v koreninah.

Večina rastlin v katerih so analizirali SA, ne vsebuje velikih količin bazalne SA, izjeme so riž, krompir, paradižnik in soja (Yu in sod., 1997). Izmerjene količine bazalne SA v sorti

krompirja 'Sante' sovpadajo z vrednostmi, ki so jih določili v rastlinah krompirja (Coquoz in sod., 1995; Krečič Stres, 2001). Za razliko od naših rezultatov, so najvišji endogeni nivo SA izmerili v mladih listih (Krečič Stres, 2001; Vučak, 2002).

Coquoz in sod. (1995) so v odpornih sortah krompirja na glivo *Phytophthora infestans* izmerili več bazalne SA v primerjavi z neodpornimi sortami na ta patogen mikroorganizem. Prav tako je ekstremno odporna transformanta krompirja sorte 'Igor' vsebovala višje bazalne količine celokupne SA, odporna sorta 'Sante' pa nižje kot občutljiva in tolerantna sorta (Krečič Stres in sod., 2005). Glede na naše rezultate in rezultate drugih avtorjev lahko zaključimo, da bazalni nivo SA ni pokazatelj odpornosti rastlin krompirja na okužbo s PVY^{NTN}.

5.2.2 Vpliv slepe inokulacije in okužbe s PVY^{NTN} na količino JA, SA in PDA v odpornih sortah krompirja

5.2.2.1 Vpliv slepe inokulacije

Kot je znano, ranitev inducira akumulacijo JA v rastlinah (Creelman in Mullet, 1995). Bücking in sod. (2004) navajajo, da je ob ranitvi listov paradižnika jasmonska kislina signal tako v lokalnem kot v sistemskem odzivu. Največ induciranih odgovorov se zgodi nekaj minut oz. ur po ranitvi.

Pri sorti 'Sante' smo eno in tri ure po slepi inokulaciji izmerili povišanje JA in PDA v spodnjih listih. Prav tako je do statistično pomembnih razlik prišlo pri obeh serijah sorte 'Carlingford', kjer je uro po slepi inokulaciji v spodnjih listih prišlo do statistično značilnega povišanja v količini JA in PDA. Ta trend pa smo opazili tudi v času treh ur. Ti rezultati se ujemajo s preliminarnimi rezultati Milovanovič Jarh (2004), ki je pri odporni sorti krompirja 'Sante' v spodnjih listih prav tako izmerila signifikantno povišanje v količini JA in PDA eno uro po slepi inokulaciji. Ti rezultati kažejo na vpletenost JA in PDA v zgodnji odziv rastlin krompirja na ranitev.

Glede na naše rezultate ne moremo sklepati ali je SA udeležena v zgodnji odziv rastlin krompirja na slepo inokulacijo (ranitev) ali ne. Pri merjenju SA smo namreč ugotovili, da je prišlo pri prvi seriji sorte 'Carlingford' do signifikantnega zmanjšanja v količini SA tri ure po

slepi inokulaciji tako v zgornjih listih kot koreninah. Te meritve pa povsem izničijo rezultati druge serije rastlin krompirja sorte 'Carlingford', kjer significantnih razlik nikjer po rastlini ni bilo opaziti. Pri sorti 'Sante' smo v zgornjih listih kot koreninah dobili podobne rezultate kot pri 1. seriji krompirja sorte 'Carlingford', dodatno smo opazili še značilno povišanje SA v zgornjih listih uro po slepi inokulaciji.

V rastlini obstaja mnogo različnih signalnih poti, ki vodijo do indukcije genske ekspresije. Tako ranitev rastline vodi do aktivacije od JA-odvisne poti in inhibira od SA odvisno indukcijo obrambnih genov (Thomma in sod., 2001), česar pa naši rezultati ne potrjujejo.

5.2.2.2 Vpliv inokulacije z virusom PVY^{NTN}

Krompir sorte 'Sante' je ekstremno odporen na okužbo z virusom PVY^{NTN} in tako ne izraža bolezenskih znamenj, kar velja tudi za manj odporno sorto krompirja 'Carlingford'. Odpornost sorte 'Carlingford' je verjetno poligenska, na kar kažejo križanja sorte 'Carlingford' z občutljivo sorto. Pompe Novak (2002) je z metodo ELISA ugotovila, da je bilo okuževanje uspešno pri odporni sorti 'Carlingford', saj je bil virus PVY^{NTN} prisoten pri rastlinah vzgojenih v tkivni kulturi, medtem ko ga v rastlinah rezistentne sorte 'Sante' ni bilo .

Vlogo JA pri interakciji med virusom PVY^{NTN} in rastlinami krompirja je pred nami proučevala Milovanovič Jarh (2004), ki je ugotovila, da pride pri sorti krompirja 'Sante' do največjega povečanja JA na okužbo s PVY^{NTN} v spodnjih inokuliranih listih in sicer eno uro po okužbi. Ti rezultati se ne ujemajo z našimi, ko pri sorti 'Sante' tako eno kot tri ure po okužbi s PVY^{NTN} nismo izmerili povišanja JA. V prvi seriji sorte 'Carlingford' smo v obeh časih po okužbi izmerili statističen padec količine JA v spodnjih listih. Druga serija iste sorte krompirja nam tega ni potrdila. V tej je namreč prišlo do odziva le v koreninah, prišlo je do povišanja JA in sicer eno uro po okužbi. Ugotovili smo, da na okužbo ni bilo pričakovanega odziva v količini endogene JA. Za razliko od JA pa spremembe v PDA nakazujejo možno vlogo jasmonatov pri okužbi rastlin s PVY^{NTN}.

Endogena količina SA v sorti 'Sante' se je uro po okužbi s PVY^{NTN} v zgornjih listih rastlin krompirja significantno zmanjšala.

Do povečanja v količini SA je prišlo le v prvi seriji krompirja sorte 'Carlingford' in sicer v spodnjih listih tri ure po okužbi, v drugi seriji nismo niti uro niti tri ure po okužbi zaznali posebnih sprememb v količini SA. Zaradi razlik v rezultatih ne moremo domnevati o vključenosti SA v zgodnji odziv rastlin na okužbo s PVY^{NTN}.

Pri interpretaciji naših rezultatov moramo upoštevati, da podatki iz analiz izvirajo iz več serij rastlin krompirja, ki so bile vzgojene v različnih letnih časih. Ob nabiranju rastlinskega materiala smo opazili, da se serije rastlin med seboj in tudi posamezne rastline razlikujejo po morfologiji in velikosti. Do razlik bi lahko prišlo tudi pri sami ranitvi oz. okužbi. Spodnje liste rastlin krompirja smo posuli s karborundom in jih ročno ranili oz. okužili z virusom, tako je nemogoče da bi bil način oziroma obseg ranitve oz. okužbe enakomeren pri vseh rastlinah. V tem pogledu so razlike, ki smo jih opazili pri primerjavi rezultatov analiz v vsebnosti različnih hormonov v različnih serijah, lažje razumljive.

5.3. PRIMERJAVA ANALIZE SALICILNE KISLINE S HPLC IN GC-MS

Analize salicilne kisline pri krompirju sorte 'Sante' smo se lotili z dvema različnima metodama. Pri prvi metodi smo ekstrahirali prosto in konjugirano SA po metodi , ki so jo objavili Raskin in sod. (1989). Za analizo SA smo uporabili tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC). Pri drugi metodi pa smo se po ekstrakciji hormonov po metodi Milavec (2004), analize hormonov lotili po metodi Müller in sod. (2006), z uporabo plinske kromatografije sklopljene z masno spektrometrijo (GC-MS).

Prva metoda, kjer smo SA najprej ekstrahirali, nato pa jo analizirali z metodo HPLC, je precej težavna, predvsem zaradi dolžine postopka, med katerim prihaja do izgub. Izkoristek je bil kljub temu dober in primerljiv s predhodnimi (75 % za prosto SA). Po drugi strani pa zaradi dolgotrajnega postopka ekstrakcije in čiščenja dobimo vzorce z manj nečistočami. To je še kako pomembno pri analizi snovi, prisotnih v majhnih količinah, z metodo HPLC.

Pri drugi metodi smo z uporabo GC-MS identificirali spojine na podlagi dejstva, da vsaka spojina razpade na svojevrsten način. Tako dobimo značilen fragmentni masni spekter. V tem primeru je lahko postopek čiščenja bolj enostaven. Kljub temu pa so izkoristki precej nizki (30 %).

Ko primerjamo signifikantne razlike v vrednostih SA izmerjene s HPLC ali GC-MS ugotovimo, da ne sovpadajo. Pri prvi metodi z uporabo HPLC smo namreč signifikantno povišane vrednosti SA izmerili pri eno in tri ure po okužbi v spodnjih listih. Pri drugi metodi z uporabo GC-MS, pa je do signifikantne razlike v količini SA prišlo eno uro po okužbi v zgornjih listih. Razlike med meritvami lahko razlagamo na več načinov. Ena od možnosti je različna sezona rasti, saj sta seriji rasli v drugih letnih časih.

Ob primerjavi obeh metod pa smo v vseh delih rastlin krompirja izmerili večje vrednosti SA z uporabo GC-MS v primerjavi z vrednostmi pri metodi HPLC. GC-MS naprava je občutljivejša od metode HPLC, je pa res, da pri GC-MS, ki smo jo uporabili, dobimo manj informacij o salicilatih, saj tu nismo merili konjugatov. Zaradi večje občutljivosti in selektivnosti je metoda GC-MS bolj primerna za analizo rastlinskih hormonov, ki so v rastlini prisotni v zelo majhnih količinah, kot metoda HPLC.

5.4 ZAKLJUČEK

Ugotovili smo, da bazalni nivo SA ni pokazatelj odpornosti rastlin krompirja na okužbo s PVY^{NTN}. V odpornejši sorti krompirja 'Sante' je manj bazalne SA kot v nekoliko manj odporni sorti 'Carlingford'.

Analize so pokazale največji odziv v količini JA na slepo inokulacijo v spodnjih inokuliranih listih obeh sort krompirja, tako pri cv. 'Sante' kot pri cv. 'Carlingford'. Do signifikantnega povišanja JA je prišlo uro in tri ure po slepi inokulaciji, medtem ko po okužbi ni bilo bistvenih sprememb. Za razliko od JA pa spremembe v PDA kažejo na vlogo jasmonatov pri okužbi rastlin s PVY^{NTN}.

Meritve SA s HPLC so pri odporni sorti 'Sante' pokazale trend zviševanja proste SA v spodnjih inokuliranih listih tako eno uro kot tri ure po okužbi s PVY^{NTN}, česar pa analize SA z metodo GC-MS ne potrjujejo. Zaradi razlik v meritvah bi težko ovrednotili vlogo SA v zgodnjem odzivu rastlin krompirja na okužbo s PVY^{NTN}.

Mehanizem delovanja in preplet signalnih poti med JA in SA v interakciji med krompirjem in virusom zaenkrat še ni dovolj raziskan. Odprtih ostaja še mnogo vprašanj, predvsem kar se tiče delovanja SA v zgodnjem odzivu na virusno okužbo.

6 POVZETEK

Ugotavljali smo vpletenost JA in SA v odziv dveh odpornih rastlin krompirja (*Solanum tuberosum* L.) na okužbo s PVY^{NTN}. Proučevali smo zgodnji odziv dveh različno odpornih sort krompirja, 'Sante' in 'Carlingford'. Sorta krompirja 'Sante' je na okužbo s PVY^{NTN} dobro odporna, medtem ko je sorta 'Carlingford' nekoliko manj. Za določanje količine rastlinskih hormonov smo uporabili dve različni metodi, HPLC in GC-MS.

Ugotovili smo, da je bazalna količina JA v obeh sortah krompirja najnižja izmed vseh treh analiziranih hormonov. Iz naših analiz ne moremo zaključiti, da je v kateri od odpornih sort krompirja statistično več oz. manj bazalne JA.

Izmerili smo signifikantno večjo prisotnost SA v obeh serijah manj odpornega krompirja sorte 'Carlingford' v spodnjih in zgornjih listih, kot v odpornejši sorti 'Sante'. Glede na naše rezultate in rezultate drugih avtorjev ne moremo zaključiti, da je bazalni nivo SA pokazatelj večje ali manjše odpornosti rastlin krompirja na okužbo s PVY^{NTN}.

Rezultati našega dela so pokazali, da ima JA vlogo v zgodnjem odzivu odpornih rastlin krompirja, saj se vrednost hormona predvsem po slepi inokulaciji signifikantno spremeni.

V obeh sortah krompirja je namreč prišlo do signifikantnega povečanja v količini JA tako uro kot tri ure po slepi inokulaciji.

Pri sorti 'Sante' tako eno kot tri ure po okužbi s PVY^{NTN} nismo izmerili povišanih količin JA, medtem ko smo v prvi seriji manj odporne sorte 'Carlingford' eno in tri ure po okužbi v spodnjih listih izmerili signifikanten padec. V drugi seriji ni bilo opaziti sprememb. Za razliko od JA pa nam spremembe v PDA kažejo na možno vlogo jasmonatov pri okužbi rastlin s PVY^{NTN}.

Glede na naše rezultate ne moremo zaključiti ali je SA udeležena v zgodnji odziv rastlin krompirja na slepo inokulacijo ali ne. Ugotovili smo namreč, da je prišlo pri prvi seriji sorte 'Carlingford' do signifikantnega zmanjšanja v količini SA tri ure po slepi inokulaciji tako v zgornjih listih kot koreninah, česar pa nam rezultati druge serije rastlin krompirja iste sorte ne potrjujejo, saj signifikantnih razlik nikjer po rastlini ni bilo opaziti. Pri sorti 'Sante' smo v zgornjih listih kot koreninah dobili podobne rezultate kot pri prvi seriji krompirja sorte

'Carlingford', dodatno smo opazili še značilno povišanje SA v zgornjih listih uro po slepi inokulaciji.

Pri uporabi HPLC metode smo za odporno sorto 'Sante' opazili trend zviševanja proste SA v spodnjih inokuliranih listih tako eno uro kot tri ure po okužbi, pri analizi z metodo GC-MS pa smo v zgornjih listih zaznali padec v količini SA uro po okužbi. Do povečanih količin SA je prišlo le v prvi seriji krompirja sorte 'Carlingford' in sicer v spodnjih listih tri ure po okužbi, v drugi seriji nismo zaznali nobenih signifikantnih sprememb v količini SA. Do razlik v rezultatih prihaja lahko zaradi gojenja rastlin v različnih letnih časih, zaradi heterogenosti rastlinskega materiala, še bolj verjetno pa zaradi uporabe dveh različnih metod ekstrakcije in analize. Glede na to, bi težko ovrednotili vlogo SA v zgodnjem odzivu rastlin krompirja na okužbo s PVY^{NTN}.

7 VIRI

Baebler Š. 2006. **Izražanje genov pri občutljivi in odporni sorti krompirja (*Solanum tuberosum* L.) v zgodnjem odzivu na okužbo s krompirjevim virusom Y^{NTN}**. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni podiplomski študij biotehnologije: 109 str.

Baker B., Zambryski P., Staskawicz B., Dinesh-Kumar S.P. 1997. **Signalling in plant-microbe interactions**. *Science*, 276: 726-733.

Baldauf P. M., Gray S. M., Perry K. L. 2006. **Biological and serological properties of *Potato virus Y* isolates in northeastern United States potato**. *Plant Disease*, 90:559-566.

Bellés J.M., Garro R., Fayos J., Navarro P., Primo J., Conejero V. 1999. **Gentisic acid as a pathogen-inducible signal, additional to salicylic acid for activation of plant defenses in tomato**. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 12, 3: 227-235.

Belles J.M., Garro R., Pallas V., Fayos J., Rodrigo I., Conejero V. 2005. **Accumulation of gentisic acid as associated with systemic infections but not with the hypersensitive response in plant-pathogen interactions**. *Planta*, 223: 500-511.

Brinc R. 2003. **Jasmonska kislina v rastlinah podvrženim stresu**. Diplomaska naloga. Ljubljana, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo: 41 str.

Bücking H., Förster H., Stenzel I., Miersch O., Hause B. 2004. **Applied jasmonates accumulate extracellularly in tomato, but intracellularly in barley**. *FEBS Letters*, 562: 45-50.

Chen Z., Malamy J., Henning J., Conrath U., Sanches-Casas P., Silva H., Ricigliano J., Klessing D.F. 1995. **Induction, modification and transduction of salicylic acid signal in plant defense responses**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92: 4134-4137.

Chivasa S., Murphy A.M., Naylor M., Carr J.P. 1997. **Salicylic acid interferes with tobacco mosaic virus replication via a novel salicylhydroxamic acid-sensitive mechanism.** *Plant Cell*, 10: 1489-1498.

Clarke S.F., Guy P.L., Jameson P.E., Schmierer D., Burrit D.J. 2000b. **Influence of white clover mosaic potyvirus infection on the endogenous levels of jasmonic acid and related compounds in *Phaseolus vulgaris* L. seedlings.** *Journal of Plant Physiology*, 156: 433-437.

Cleland C.F., Ajami A. 1974. **Identification of the flower-inducing factor isolated from aphid honeydew as being salicylic acid.** *Plant Physiology*, 54:904-906.

Coquoz J.L., Buchala A., Meuwly P., Metaux J.P. 1995. **Arachidonic acid induces local but not systemic synthesis of salicylic acid and confers systemic resistance in potato plants to *Phytophthora infestans* and *Alternaria solani*.** *Phytopathology*, 85, 10: 1219-1224.

Creelman R.A., Mullet J.E. 1997. **Biosynthesis and action of jasmonates in plants.** *Annual Review in Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48:355–381.

Creelman R.A., Mullet J.E. 1995. **Jasmonic acid distribution and action in plants: Regulation during development and response to biotic and abiotic stress.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*, 92: 4114-4119.

Dermastia M. 1993. **Citokinini v zdravih in z virusi okuženih sortah krompirja (*Solanum tuberosum* L.).** Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 91 str.

Dermastia M., Ravnikar M., Kovač M. 1995. **Increased cytokinin-9-glucosylation in roots of susceptible *Solanum tuberosum* cultivar infected by potato virus Y^{NTN}.** *Molecular Plant – Microbe Interactions*, 8, 2: 327-333.

Dhondt S., Geoffroy P., Stelmach B.A., Legrand M., Heitz T. 2000. **Soluble phospholipase A(2) activity is induced before oxylipin accumulation in tobacco mosaic virus-infected tobacco leaves and is contributed by patatin-like enzymes.** *Plant Journal*, 23: 431-440.

Edwards R. 1994. **Conjugation and metabolism of salicylic acid in tobacco.** Journal of Plant Physiology, 143:609–614.

Enyedi A.J., Raskin I. 1993. **Induction of UDP-glucose: salicylic acid glucosyltransferase activity in tobacco mosaic virus-inoculated tobacco (*Nicotiana tabacum*) leaves.** Plant Physiology, 101: 1375-1380.

Enyedi A.J., Yalpani N., Silverman P., Raskin I. 1992. **Localization, conjugation and function of salicylic acid in tobacco during the hypersensitivity reaction to tobacco mosaic virus.** Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America, 89: 2480-2484.

Farmer E.E., Ryan A.C. 1992. **Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors.** Plant Cell, 4: 129-134.

Fayos J., Bellés J.M., López-Gresa M.P., Primo J., Conejero V. 2006. **Induction of gentisic acid 5-O-β-D-xylanopyranoside in tomato and cucumber plants infected by different pathogens.** Phytochemistry, 67: 142-148.

Glass A.D.M. 1973. **Influence of phenolic acids on ion uptake.** Plant Physiology, 51:1037-1041.

Hinrichs J., Berger S., Shaw J.G. 1998. **A hypersensitive response-like mechanism is involved in resistance of potato plants bearing the *Ry_{sto}* gene to the potyviruses potato virus Y and tobacco etch virus.** Journal of General Virology, 79: 167-176.

Harper J.R., Balke N.E. 1981. **Characterization of the Inhibition of K⁺ absorption in oat roots by salicylic acid.** Plant Physiology, 68:1349-1353.

Heil M., Ton J. 2008. **Long-distance signalling in plant defence.** Trends in Plant Science, 13, 6: 264-272.

Hofmann E., Pollmann S. 2008. **Molecular mechanism of enzymatic allene oxide cyclization in plants.** Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 46: 302-308.

Howe G.A. 2004. **Jasmonates as signals in the wound response.** Journal of Plant Growth Regulation, 23: 223–237.

Jameson P.E., Clarke S.F., 2002. **Hormon-virus interactions in plants.** Critical Reviews in Plant Sciences, 21, 3: 205-228.

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

Kovač M., Müller A., Milovanovič Jarh D., Milavec M., Düchtig P., Ravnikar M. 2009. **Multiple hormone analysis indicates involvement of jasmonate signalling in the early defence response of potato to potato virus Y^{NTN}.** Biologia Plantarum (sprejeto v tisk).

Krečič Stres H. 2001. **Vloga salicilne in gentiske kisline pri odzivu krompirja (*Solanum tuberosum* L.) na okužbo s krompirjevim virusom Y^{NTN}.** Magistrsko delo. Ljubljana, Medicinska fakulteta, Interfakultetni podiplomski študij biokemije in molekularne biologije: 95 str.

Krečič Stres H., Vučak C., Ravnikar M., Kovač M. 2005. **Systemic *Potato virus Y^{TNT}* infection and levels of salicylic and gentisic acids in different potato genotypes.** Plant Pathology, 54: 441-447.

Kus M. 1994. **Krompir.** Ljubljana, ČZP Kmečki glas: 225 str.

Lee H., León J., Raskin I. 1995. **Biosynthesis and metabolism of salicylic acid.** Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America, 92: 4076-4079.

Lee H., Raskin I. 1998. **Glucosylation of salicylic acid in *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi-nc.** Phytopathology, 88, 7: 692-697.

León J., Yalpani N., Raskin I., Lawton M.A. 1993. **Induction of benzoic acid 2-hydroxylase in virus-inoculated tobacco.** Plant Physiology, 103: 323-328.

Le Romancer M., Nedellec M. 1997. **Effect of plant genotype, virus isolate and temperature on the expression of the potato tuber necrotic ringspot disease (PTNRD).** Plant Pathology, 46: 104-111.

Liu J.J., Ekramoddoullah A.K.M. 2006. **The family 10 of plant pathogenesis-related proteins: Their structure, regulation, and function in response to biotic and abiotic stresses.** Physiological and Molecular Plant Pathology, 68, 1-3: 3-13.

Macri F., Vianello A., Pennazio S. 1986. **Salicylate-collapsed membrane potential in pea stem mitochondria.** Physiologia Plantarum, 67:136-140.

Martinez C., Pons E., Prats G., Leon J. 2004. **Salicylic acid regulates flowering time and links defence responses and reproductive development.** Plant Journal, 37, 2: 209-217.

Mehle N., Kovač M., Petrovič N., Pompe Novak M., Baebler Š., Krečič Stres H., Gruden K., Ravnikar M. 2004. **Spread of potato virus Y^{NTN} in potato cultivars (*Solanum tuberosum* L.) with different levels of sensitivity.** Physiological and Molecular Plant Pathology, 64: 293-300.

Milavec M. 2004. **Peroksidaze in jasmonska kislina v različnih sortah krompirja (*Solanum tuberosum* L.) po okužbi s krompirjevim virusom Y^{NTN}.** Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 148 str.

Milovanovič Jarh D. 2004. **Jasmonska kislina v zdravih in s krompirjevim virusom Y^{NTN} okuženih rastlinah krompirja (*Solanum tuberosum* L.).** Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 61 str.

Moran J., Rodoni B. 2003. **Potato virus Y.** Victoria, Department of Primary Industries. Agriculture Notes, AG1196, julij 2003

[http://www.dpi.vic.gov.au/DPI/nreninf.nsf/9e58661e880ba9e44a256c640023eb2e/57d0f1fbf3317ceaca256f170007034d/\\$FILE/AG1196.pdf](http://www.dpi.vic.gov.au/DPI/nreninf.nsf/9e58661e880ba9e44a256c640023eb2e/57d0f1fbf3317ceaca256f170007034d/$FILE/AG1196.pdf) (avgust 2008): 2 str.

- Murphy A.M., Chivasa S., Singh D.P., Carr J.P. 1999. **Salicylic acid-induced resistance to viruses and other pathogens: a parting of the ways?** Trends in Plants Science, 4:155-160.
- Müller A., Dücking P., Weiler E.W. 2006. **Hormone profiling in arabidopsis.** Methods in Molecular Biology, 323: 449-457.
- Müller A. 2002. **A multiplex GC-MS/MS technique for the sensitive and quantitative single-run analysis of acidic phytohormones and related compounds and its application to *Arabidopsis thaliana*.** Planta, 216: 44-56.
- Peña-Cortés H., Albrecht T., Prat S., Weiler E.W., Willmitzer L. 1993. **Aspirin prevents wound-induced gene expression in tomato leaves by blocking jasmonic acid biosynthesis.** Planta, 191: 121-128.
- Peña-Cortés H., Barrios P., Dorta F., Polanco V., Sánchez C., Sánchez E., Ramírez I. 2005. **Involvement of jasmonic acid and derivatives in plant responses to pathogens and insects and in fruit ripening.** Journal of Plant Growth Regulation, 23:246–260.
- Petrovič N. 1997. **Vloga jasmonske kisline pri odzivu rastlin krompirja na okužbo s krompirjevim virusom Y^{NTN}.** Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 110 str.
- Petrovič N., Miersch O., Ravnikar M., Kovač M. 1997. **Potato virus Y^{NTN} alters the distribution and concentration of endogenous jasmonic acid in potato plants grown *in vitro*.** Physiological and Molecular Plant Pathology, 50: 273-244.
- Petrovič N., Ravnikar M. 1995. **Interactions between jasmonic acid and potato virus PVY^{NTN} in potato grown *in vitro*.** Aspects of Applied Biology, 42: 337-340.
- Pompe Novak M., Gruden K., Baebler Š., Krečič-Stres H., Kovač M., Jongsma M., Ravnikar M. 2006. **Potato virus Y induced changes in the gene expression of potato (*Solanum tuberosum* L.).** Physiological and Molecular Plant Pathology, 67: 237-247.

Pompe Novak M. 2002. **Razlike v izražanju genov med zdravimi in s krompirjevim virusom Y^{NTN} okuženimi rastlinami krompirja (*Solanum tuberosum* L.)** Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni podiplomski študij biotehnologije: 240 str.

Popova L., Pancheva T., Uzunova A. 1997. **Salicylic acid: properties, biosynthesis and physiological role.** Bulgarian Journal of Plant Physiology, 23, 1-2: 85-93.

Preston C.A., Lewandowski C., Enyedi A.J., Baldwin I.T. 1999. **Tobacco mosaic virus inoculation inhibits wound-induced jasmonic acid-mediated responses within but not between plants.** Planta, 209: 87-95.

Purnat A. 2005. **Salicilna in gentiska kislina v zgodnjem odzivu krompirja na okužbo z virusom PVY^{NTN}.** Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 79 str.

Raskin I., Ehmann A., Melander W.R., Meeuse B.J.D. 1987. **Salicylic acid - a natural inducer of heat production in *Arum* lilies.** Science, 237: 1601-1602.

Raskin I., Turner I.M., Melander W.R. 1989. **Regulation of the heat production in the inflorescens of an *Arum* lily by endogenous SA.** Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America, 86: 2214-2218.

Raskin I. 1992. **Salicylate, a new plant hormone.** Plant Physiology, 99: 799-803.

Ravnikar M. 1991. **Fiziološka in anatomsko-morfološka študija vpliva jasmonske kisline na rast in razvoj rastlin v tkivni kulturi.** Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 101 str.

Ravnikar M., Petrovič N., Dermastia M., Kovač M. 1996. **The physiology of potato plants infected with the slovenian isolate of PVY^{NTN} grown *ex vitro* in *in vitro*.** V: Proceedings of the 9th EAPR Virology Section Meeting, Ribno, Bled, Slovenia, June, 18th-22th 1995. Kranj: M-KŽK Kmetijstvo: 155-158.

Revers F., Le Gall O., Candresse T., Maule A.J. 1999. **New advances in understanding the molecular biology of plant/potyvirus interactions.** *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 12, 5:367-376.

Reymond P., Farmer E.E. 1998. **Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression.** *Current Opinion in Plant Biology*, 1: 404-411.

Rojo E., Solano R., Sánchez-Serrano J.J., 2003. **Interactions between signalling compounds involved in plant defense.** *Journal of Plant Growth Regulation*, 22: 82–98.

Rolland M., Glais L., Kerlan C., Jacquot E. 2008. **A multiple single nucleotide polymorphisms interrogation assay for reliable Potato virus Y group and variant characterisation.** *Journal of Virological Methods*, 147, 1: 108-117.

Romani R.J., Hess B.M., Leslie C.A. 1989. **Salicylic acid inhibition of ethylene production by apple disks and other plant tissues.** *Journal of Plant Growth Regulation*, 8:63-69.

Roof B.S., Turner J.C. 1955. **Protein interactions of gentisic acid and certain of its oxidation products.** *Journal of Clinical Investigation*, 34, 11: 1647-1652.

Rushton P.J., Somssich I.E. 1998. **Transcriptional control of plant genes responsive to pathogens.** *Current Opinion in Plant Biology*, 1: 311:315.

Schulz M., Schnabl H., Manthe B., Schweinofen B., Casser I. 1993. **Uptake and detoxification of salicylic acid by *Vicia faba* and *Fagopyrum esculentum*.** *Phytochemistry*, 33, 2: 291-294.

Sembdner G., Parthier B. 1993. **The biochemistry and the physiological and molecular actions of jasmonates.** *Plant Physiology*, 44: 569-89.

Seo S., Seto H., Yamakawa H.I., Ohashi Y. 2001. **Transient accumulation of jasmonic acid during the synchronized hypersensitive cell death in tobacco mosaic virus-infected tobacco leaves.** *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 14: 261-264.

Shah J. 2003. **The salicylic acid loop in plant defense.** *Current Opinion in Plant Biology*, 6: 365:371.

Shulaev V., Leon J., Raskin I. 1995. **Is salicylic acid a translocated signal of systemic acquired resistance in tobacco?** *Plant Cell*, 7: 1691-1701.

Silverman P., Seskar M., Kanter D., Schweizer P., Métraux J.P., Raskin I. 1995. **Salicylic acid in rice.** *Plant Physiology*, 108: 633-639.

Singh D.P., Moore C.A., Gilliland A., Carr J.P. 2004. **Activation of multiple antiviral defence mechanisms by salicylic acid.** *Molecular Plant Pathology*, 5, 1:57-63.

Song S.K., Choi Y., Moon Y.H., Kim S.G., Choi Y.D., Lee J.S. 2000. **Systemic induction of a *Phytolacca insularis* antiviral protein gene by mechanical wounding, jasmonic acid and abscisic acid.** *Plant Molecular Biology*, 43: 439-450.

Song J.T., Koo Y.J., Seo H.S., Kim M.C., Choi Y.D., Kim J.H. 2008. **Overexpression of AtSGT1 an *Arabidopsis* salicylic acid glukosyltransferase, leads to increased susceptibility to *Pseudomonas syringae*.** *Phytochemistry*, 69: 1128-1134.

Stenzel I., Hause B., Proels R., Miersch O., Oka M., Roitsch T., Wasternack C. 2008. **The AOC promoter of tomato is regulated by developmental and environmental stimuli.** *Phytochemistry*, 69, 9: 1859-1869.

Synková H., Semorádová Š., Schnablová R., Müller K., Pospíšilová J., Ryšlavá H., Malbeck J., Čeřovská N. 2006. **Effect of biotic stress caused by *Potato virus Y* on photosynthesis in *ipt* transgenic and control *Nicotiana tabacum* L.** *Plant Science*, 171: 607-616.

Thomma B.P.H.J., Penninckx I.A.M.A., Cammue B.P.A., Broekaert W.F. 2001. **The complexity of disease signaling in *Arabidopsis*.** *Current Opinion in Immunology*, 13, 1: 63-68.

Van Loon L.C. in Van Strien F.A. 1999. **The families of pathogenesis-related proteins, their activities and comparative analysis of PR-1 type proteins.** *Physiology And Molecular Plant Pathology*, 55: 85-97.

Verberne M.C., Brouwer N., Delbianco F., Lindthorst H.J.M., Bol J.F., Verpoorte R. 2002. **Method for the extraction of the volatile compound salicylic acid from tobacco leaf material.** *Phytopathology Analles*, 13: 45-50.

Vučak C. 2002. **Salicilna in gentiska kislina v listih krompirja (*Solanum tuberosum* L.) sorte 'Igor' po okužbi s krompirjevim virusom Y^{NTN}.** Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 79 str.

Wasternack C. in Parthier B. 1997. **Jasmonate signalled plant gene expression.** *Trends in Plant Science*, 2, 8: 302-307.

White R.F. 1979. **Acetylsalicylic acid (aspirin) induces resistance to tobacco mosaic virus in tobacco.** *Virology*, 99, 2: 410-412.

Wildermuth M.C., Dewdney J., Wu G., Ausubel F.M. 2001. **Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence.** *Nature*, 29, 414: 562-565.

Yalpani N., Altier D.J., Barbour E., Cigan A.L., Scelonge C.J. 2001. **Production of 6-methylsalicylic acid by expression of a fungal polyketide synthase activates disease resistance in tobacco.** *Plant Cell*, 13, 6: 1401-1410.

Yalpani N., León J., Lawton M.A., Raskin I. 1993. **Pathway of salicylic acid biosynthesis in healthy and virus-inoculated tobacco.** *Plant Physiology*, 103: 315-321.

Yu D., Liu Y., Fan B., Klessing D.F., Chen Z. 1997. **Is high basal level of salicylic acid important for disease resistance in potato?** *Plant Physiology*, 115: 343-349.

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem:

Prof. dr. Maji Kovač za vso pomoč tekom izdelave diplomske naloge in za vse koristne nasvete, predvsem pa za njen temeljit pregled in za vse vzpodbudne besede, katere sem še kako potrebovala.

Prof. dr. Maji Ravnikar, ker mi je omogočila opravljanje diplomskega dela na Nacionalnem inštitutu za biologijo, kjer sem nabrala ogromno znanja in izkušenj ter za hiter in temeljit pregled diplomske naloge.

Prof. dr. Marini Dermastia za strokovno recenzijo diplomskega dela.

Lidiji Matičič za vedno pozitivno vzdušje v laboratoriju in za vso pomoč, katero sem potrebovala v času praktičnega dela diplomske naloge.

Darji Milovanovič Jarh in **Aniti Purnat** za uvajanje v nove metode in za vso začetno pomoč.

Vsem zaposlenim na Nacionalnem inštitutu za biologijo v Ljubljani na Oddelku za biotehnologijo in sistemsko biologijo, ki so mi na kakršenkoli način pomagali in so poskrbeli, da je bilo delo v laboratoriju vedno prijetno in zanimivo.

Največja zahvala gre moji družini, ki me je tekom študija vzpodbujala, mi stala ob strani in nikoli obupala nad mano.

Hvala **Darji** in **Katarini** za nepozabna študijska leta, **Poloni** in **Mojci** za vso podporo, ko sem jo res potrebovala in **Andražu** za vso računalniško pomoč.

Hvala