

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Hana URŠIČ

**TESTIRANJE TRANSGENIH LINIJ KROMPIRJA SORTE DÉSIÉE
NA ODPORNOST PROTI ABIOTSKIM STRESNIM DEJAVNIKOM
IN OKUŽBI Z VIRUSOM PVY**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

**TESTING TRANSGENIC LINES OF POTATO cv. DÉSIÉE FOR
ABIOTIC STRESS AND PVY INFECTION RESISTANCE**

GRADUATION THESIS

University studies

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo na Nacionalnem inštitutu za biologijo, na Oddelku za biotehnologijo in sistemsko biologijo.

Po sklepu komisije za dodiplomski študij Oddelka za biologijo z dne 14.10.2011 je bila za mentorico diplomskega dela imenovana prof. dr. Jana Žel.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Marjana REGVAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta,
Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Jana ŽEL
Nacionalni inštitut za biologijo,
Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo

Član: doc. dr. Jasna DOLENC KOCE
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta,
Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Naloga 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 verziji, identična tiskani verziji.

Hana Uršič

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn

DK 581.1:633.491(043.2)=163.6

KG krompir (*Solanum tuberosum*)/abiotski stres/suša/slanost/nizke temperature/biotski stres/PVY

AV URŠIČ, Hana

SA ŽEL, Jana (mentor)

KZ SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111

ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

LI 2012

IN TESTIRANJE TRANSGENIH LINIJ KROMPIRJA SORTE DÉsirÉE
NA ODPORNOST PROTI ABIOTSKIM STRESNIM DEJAVNIKOM IN
OKUŽBI Z VIRUSOM PVY

TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)

OP XI, 72 str., 5 pregl., 26 sl., 40 vir.

IJ sl

JI sl/en

AI Klimatske spremembe in naraščanje človeške populacije povzročata vse večje potrebe po hrani. Kmetijstvo je zato primorano koristiti manj ugodne kmetijske površine za rast kulturnih rastlin, kot je krompir. Biotehnološki pristopi omogočajo izboljšavo odpornosti rastlin in aplikacija s proteznimi inhibitorji, ki imajo v rastlinskem metabolizmu več pomembnih funkcij, veliko obeta. Za proučevanje delovanja gena, moramo imeti učinkovit sistem za preverjanje uspešnosti transgenih rastlin. Namen diplomskega dela je bil vzpostaviti uspešen sistem testiranja gensko spremenjenega krompirja (*Solanum tuberosum*) sorte Désirée na odpornost proti slanosti, suši in nizkim temperaturam. Štiri transgene linije z vnesenimi geni za glivni (GL1, GL2) in krompirjev (KR1, KR2) proteazni inhibitor, ki so del zbirke NIB-a, smo primerjali z netransgeno linijo. Ugotovili smo, da transgene linije z vnesenim genom za krompirjev proteazni inhibitor uspevajo nekoliko bolje kot netransgene rastline. Odpornost na rast v slanem mediju smo testirali v *in vitro* in *in vivo* pogojih, pri različnih koncentracijah NaCl. Toleriranje suše in nizkih temperatur smo ugotavljali z izpostavitvijo rastlin obema omenjenima stresnima dejavnikoma. Za analizo vpliva vseh treh oblik abiotskega stresa smo merili svežo ter suho maso korenin in poganjkov, oz. dolžino korenin in poganjkov, odpornost na nizke temperature pa smo ocenili z razredi, ki so opisovali stanje rastlin. Dve transgeni liniji, ki izražata proteazni inhibitor iz glive (GL1 in GL2), smo testirali na okužbo z virusom PVY^{NTN} in ugotovili, da se virus v transgenih rastlinah razširja počasneje.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn

DC 581.1:633.491(043.2)=163.6

CX potato (*Solanum tuberosum*)/abiotic stress/drought/salinity/low temperatures/biotic stress/PVY

AU URŠIČ, Hana

AA ŽEL, Jana (supervisor)

PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology

PY 2012

TI TESTING TRANSGENIC LINES OF POTATO cv. DÉsirÉE FOR ABIOTIC STRESS AND PVY INFECTION RESISTANCE

DT Graduation Thesis (University studies)

NO XI, 72 p., 5 tab., 26 fig., 40 ref.

LA sl

AL sl/en

AB Climate changes and increase of human population cause bigger needs for food. Agriculture is therefore obliged to benefit less favorable agricultural areas for the growth of crops, such as potato. Biotechnological approaches allow improvement of plant resistance. Application of proteinase inhibitors, which have several important functions in plant metabolism, is giving hope. For studying gene activity, we must have an effective system for checking the performance of transgenic plants. The aim of the thesis was to create a successful testing system for genetically modified potato (*Solanum tuberosum*) cv. Désirée resistance to salinity, drought and low temperatures. Four transgenic lines with introduced genes for proteinase inhibitors from fungi (GL1, GL2) and potato (KR1, KR2), which are part of a NIB collection, were compared with a nontransgenic line. We noticed that lines with overexpressed gene of potato proteinase inhibitor grew a little better than nontransgenic plants. Resistance to growth in salted medium was tested *in vitro* and *in vivo* conditions, at different concentrations of NaCl. We determined tolerance of drought and low temperatures, by exposing plants to mentioned conditions. To analyze the impact of all three abiotic stresses, we measured the fresh and dry weight of roots and shoots, or roots and shoots length. Resistance to low temperatures was evaluated with classes. Two transgenic lines, expressing proteinase inhibitor from fungi (GL1 and GL2), were tested for PVY^{NTN} infection resistance and found that the virus in transgenic plants expands slower.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VIII
KAZALO SLIK.....	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA.....	1
1.2 NAMEN DELA	1
1.3 HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 ABIOTSKI STRESNI DEJAVNIKI	3
2.1.1 Zasoljenost tal.....	3
2.1.2 Suša.....	6
2.1.3 Nizke temperature.....	10
2.1.4 Naravna odpornost rastlin proti abiotskim stresnim dejavnikom.....	11
2.2 BIOTSKI STRESNI DEJAVNIKI	12
2.2.1 Krompirjev virus Y.....	14
2.3 KROMPIR	17
2.4 RAZVOJ ODPORNIH RASTLINSKIH SORT	19

3	MATERIALI IN METODE	25
3.1	SESTAVA RASTLINSKIH GOJIŠČ	25
3.2	REAGENTI IN BARVILA	27
3.3	PUFRI IN RAZTOPINE.....	27
3.4	TESTNI KOMPLETI	27
3.5	RASTLINSKI MATERIAL	27
3.6	VIRUSNI MATERIAL.....	28
3.7	LABORATORIJSKA OPREMA	28
3.8	NAMNOŽEVANJE RASTLINSKEGA MATERIALA	29
3.9	PRIPRAVA RASTLINSKEGA MATERIALA ZA UKORENINJANJE IN SAJENJE	29
3.10	TEHTANJE IN SUŠENJE RASTLINSKEGA MATERIALA	29
3.11	PREUČEVANJE ODPORNOSTI PROTI NaCl.....	30
3.11.1	Testiranje v tkivnih kulturah	30
3.11.2	Testiranje v zemlji	30
3.12	PREUČEVANJE ODPORNOSTI PROTI SUŠI	31
3.13	PREUČEVANJE ODPORNOSTI PROTI NIZKIM TEMPERATURAM	31
3.14	PREUČEVANJE ODPORNOSTI PROTI VIRUSU PVY ^{NTN}	32
3.14.1	Okuževanje rastlinskega materiala	32
3.14.2	Pobiranje rastlinskega materiala.....	33
3.14.3	Izolacija RNA	35
3.14.4	Agarozna gelska elektroforeza	36
3.14.5	Merjenje koncentracije in čistosti RNA	37
3.14.6	Reverzna transkripcija	37

3.14.7	Kvantitativni PCR v realnem času	38
3.15	STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV	38
4	REZULTATI.....	39
4.1	PREUČEVANJE ODPORNOSTI PROTI NaCl	39
4.1.1	Testiranje v tkivnih kulturah	39
4.1.2	Testiranje v zemlji	45
4.2	PREUČEVANJE ODPORNOSTI PROTI SUŠI.....	48
4.3	PREUČEVANJE ODPORNOSTI PROTI NIZKIM TEMPERATURAM	51
4.4	PREUČEVANJE ODPORNOSTI PROTI VIRUSU PVY ^{ntn}	54
4.4.1	Izolacija in potrditev izolirane RNA	54
4.4.2	Kvantifikacija celokupne RNA	55
4.4.3	Rezultati PCR v realnem času	55
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	58
5.1	RAZPRAVA	58
5.2	SKLEPI.....	65
6	POVZETEK.....	66
7	VIRI	68

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Sestava rastlinskega gojišča MS 30 (prirejeno po Murashige in Skoog, 1962).....	26
Preglednica 2: Priprava inokuluma za okuževanje rastlinskega materiala.....	33
Preglednica 3: Priprava mešanic Bead Mix, Lysis/Binding Solution in Diluted TURBO™ DNase.	35
Preglednica 4: Sestavine mešanice za reverzno transkripcijo.	37
Preglednica 5: Relativno izražanje PVY ^{NTN} v 2. spodnjem in 2. zgornjem listu ter njuno razmerje.	57

KAZALO SLIK

Slika 1: Odgovor rastlin na stres zaradi nizkega vodnega potenciala (Ψ_w).....	12
Slika 2: Rastlina krompirja okužena s PVY ^{NTN} . A: znamenja okužbe na inokuliranem listu B: odpadanje listov in nastanek »palmovega drevesa«..	16
Slika 3: Virus Y ^{NTN} ; obročkaste nekroze na krompirju cv. Désirée.....	19
Slika 4: Kompleksen odgovor rastlin na abiotске stresne dejavnike.	20
Slika 5: Razvoj rastlin tolerantnih na stres.	21
Slika 6: Spodnji okuženi (inokulirani) listi in zgornji (neokuženi) listi.....	34
Slika 7: Rastline petih linij v vrstnem redu od leve proti desni, pri poskusu v tkivnih kulturah: NT, GL1, GL2, KR1 in KR2. A: kontrolne rastline v gojišču MS 30. B: rastline v gojišču MS 30 s 60 mM koncentracijo NaCl. C: rastline v gojišču MS 30 s 120 mM koncentracijo NaCl.....	39
Slika 8: Višina poganjkov v odvisnosti od koncentracije NaCl po 5 tednih rasti.	40
Slika 9: Delež rastlin s koreninami, daljšimi od 2 cm v kontrolnem gojišču MS 30..	41
Slika 10: Delež rastlin s koreninami, daljšimi od 2 cm v gojišču s 60 mM koncentracijo NaCl.....	42
Slika 11: Masa svežih poganjkov v odvisnosti od koncentracije NaCl po 5 tednih rasti, pri poskusu v tkivnih kulturah..	43
Slika 12: Masa suhih poganjkov v odvisnosti od koncentracije NaCl po 5 tednih rasti, pri poskusu v tkivnih kulturah..	44
Slika 13: Rastline petih linij v vrstnem redu od leve proti desni, pri poskusu v zemlji: NT, GL1, GL2, KR1 in KR2. A: kontrolne rastline, ki smo jih zalivali z vodo iz pipe. B: rastline zalivane z vodno raztopino 200 mM koncentracije NaCl. C: rastline, ki smo jih zalivali z vodno raztopino 400 mM koncentracije NaCl.....	45
Slika 14: Masa svežih poganjkov v odvisnosti od koncentracije NaCl po 5 tednih rasti, pri poskusu v zemlji..	46
Slika 15: Masa suhih poganjkov v odvisnosti od koncentracije NaCl po 5 tednih rasti, pri poskusu v zemlji..	47

Slika 16: Rastline petih linij v vrstnem redu od leve proti desni, pri poskusu v zemlji: NT, GL1, GL2, KR1 in KR2. A: kontrolne rastline, ki smo jih zalivali z vodo iz pipe. B: rastline izpostavljene suši.	48
Slika 17: Masa svežih poganjkov v odvisnosti od suše.....	49
Slika 18: Masa suhih poganjkov v odvisnosti od suše..	49
Slika 19: Rastline petih linij v vrstnem redu od leve proti desni, pri poskusu v zemlji: NT, GL1, GL2, KR1 in KR2. A: kontrolne rastline, ki smo jih zalivali z vodo iz pipe. B: rastline izpostavljene suši ter nato zalite.	50
Slika 20: Rastline petih linij v vrstnem redu od leve proti desni: NT, GL1, GL2, KR1 in KR2, pred testom za preučevanje odpornosti proti nizkim temperaturam.....	51
Slika 21: Reprezentativne rastline razredov..	52
Slika 22: Stanje mrazu izpostavljenih rastlin po 6 dneh rasti.....	53
Slika 23: Potrditev izolirane RNA iz nekaterih vzorcev z elektroforezo..	54
Slika 24: Delež okuženih rastlin posamezne linije, pri kateri se je virus v 7 dneh razširil do zgornjih listov.....	55
Slika 25: Relativno izražanje virusa PVY ^{NTN} glede na hišni gen <i>Cox</i> v 2. spodnem (okuženem) listu..	56
Slika 26: Relativno izražanje virusa PVY ^{NTN} glede na hišni gen <i>Cox</i> v 2. zgornjem (neokuženem) listu..	56

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ABA	abscizinska kislina (ang; abscizic acid)
ELISA	ang; Enzyme-linked immunosorbent assay
DPI	dnevi po inokulaciji
PI	proteazni inhibitor
ROS	reaktivne kisikove spojine (ang; reactive oxygen species)
PTNRD	obročasta nekroza gomoljev (ang; potato tuber necrotic ringspot disease)
RT-PCR	verižna reakcija s polimerazo (ang; reverse transcription polymerase chain reaction)
RT-qPCR	verižna reakcija s polimerazo v realnem času (ang; quantitative reverse transcription polymerase chain reaction)
PVY	krompirjev virus Y (ang; potato virus Y)

1 UVOD

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Z globalnim segrevanjem vremenske razmere postajajo vse bolj ekstremne. Poletja so bolj vroča, padavin je malo in človeštvo, ki je odvisno od kmetijstva, vse bolj čuti vplive podnebnih sprememb. Največjo težavo predstavljata suša in zasoljevanje tal. Obenem so prehodna letna obdobja nestalna, pogoste so nizke temperature, ki prav tako poškodujejo pridelek. Poleg abiotskih stresnih dejavnikov na rastline delujejo tudi biotski stresni dejavniki. Eden takih je virus PVY, ki okužuje krompir in s tem igra pomembno vlogo pri zmanjševanju količine in kakovosti pridelka.

Razvoj transgenih rastlin z vnesenimi geni za izboljšanje odpornosti proti stresnim dejavnikom je v zadnjem času zelo intenziven. Raziskave se osredotočajo na mehanizme in metabolite, ki so vpleteni v odgovor rastlin na stres. Eni izmed metabolitov, vključenih v odgovor rastlin na stres, so tudi proteazni inhibitorji (PI). Znano je, da se njihova sinteza poveča ob poškodbah celic, obenem pa so vključeni v odgovor tako na nekatere biotske kot abiotske stresne dejavnike (Zang in sod., 2008).

1.2 NAMEN DELA

Namen dela je bila postavitev sistema za testiranje transgenih rastlin krompirja (*Solanum tuberosum*) sorte Désirée na odpornost proti abiotskim stresnim dejavnikom. Diplomsko delo zajema testiranje štirih transformiranih linij krompirja sorte Désirée iz zbirke Nacionalnega inštituta za biologijo. V rastline sta bila vstavljena gena, ki kodirata proteazne inhibitorje (PI). En PI je krompirju lasten in gensko spremenjeni liniji s prekomernim izražanjem tega gena smo poimenovali KR1 in KR2. Drug PI izvira iz glive, gensko spremenjeni liniji, ki izražata ta gen, smo poimenovali GL1 in GL2. Odpornost transgenih linij na abiotske stresne dejavnike smo testirali *in vitro* v tkivnih kulturah ali *in vivo* v zemlji.

Drug namen diplomskega dela je bilo testiranje transgenih linij GL1 in GL2 na odpornost proti okužbi z virusom PVY^{NTN}. Testiranje odpornosti proti okužbi z virusom je potekalo v zemlji. Odpornost rastlin transgenih linij smo primerjali z odpornostjo netransgenih rastlin. Za analizo prisotnosti virusa PVY^{NTN} smo uporabili metodo PCR v realnem času (RT-qPCR).

1.3 HIPOTEZE

Transformirane linije krompirja sorte Désirée so primeren sistem za testiranje genov za odpornost proti izbranim abiotskim stresnim dejavnikom.

Predvidevamo, da ne bo prišlo do večjih razlik v odgovoru rastlin na abiotske stresne dejavnike testirane v *in vitro* pogojih in *in vivo* v zemlji.

Domnevamo, da bodo odgovori rastlin na zasoljenost tal, sušo in nizke temperature med seboj podobni. Rastline tretirane z omenjenimi stresnimi dejavniki bodo rasle slabše od rastlin v kontrolnih pogojih.

Predvidevamo, da bodo rastline štirih transgenih linij (KR1, KR2, GL1 in GL2) bolj odporne proti zasoljenosti tal, suši in nizkim temperaturam kot rastline netransformirane linije.

Pričakujemo, da bosta glivna proteazna inhibitorja (GL1 in GL2) pri krompirju vplivala na povečano odpornost proti vsaj nekaterim stresnim dejavnikom.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ABIOTSKI STRESNI DEJAVNIKI

Biološki stres je neugodna okoliščina ali učinek, ki ovira normalno delovanje in obstoj bioloških sistemov, med katere spadajo tudi rastline. Koncept stresa je povezan s toleranco na stres, kar pomeni sposobnost rastline kljubovati neugodnemu okolju. Zavedati pa se je treba, da okolje, ki je za neko rastlino stresno, morda drugi rastlini ne predstavlja stresa. Izpostavljenost stresnim dejavnikom izzove aklimacijo ali utrditev rastline. Le-ta se od adaptacije razlikuje, saj se slednja nanaša na genetske spremembe, ki jih lahko dosežemo s procesom selekcije skozi več generacij. Stres vodi v serijo morfoloških, fizioloških, biokemijskih in molekularnih sprememb, ki negativno vplivajo na rastline (povzeto po Zang in sod., 2008).

Abiotski stresni dejavniki, med katere spadajo suša, slanost tal, ekstremne temperature, kemijska toksičnost in oksidativni stres, so resna grožnja rastlinam. Omejujejo njihovo rast in produktivnost, ter tako slabo vplivajo na okolje. Abiotski stresni dejavniki so svetovni razlog škode na pridelkih, donos glavnih pridelkov zmanjšajo kar za 50% (Zang in sod., 2008). Ker vplivajo na količino pridelka in razširjenost rastlinskih vrst prek različnih okolij, so abiotski stresni dejavniki tema, ki dobiva vse večjo pozornost. Tesno so povezani s klimatskimi spremembami, te pa določajo vzorec razporejanja padavin in temperaturne ekstreme. Potreba po ohranjanju oz. povečanju produktivnosti mejnih območij in zasoljevanje predstavljata znanosti še dodaten izziv (Verslues in sod., 2006).

2.1.1 Zasoljenost tal

V naravnih pogojih so kopenske rastline lahko izpostavljene povišanim koncentracijam soli, ki se kopičijo v tleh. Ta pojav je opazen ob morskih obalah in ob izlivih rek v morje, kot posledica pršenja slane vode ali plimovanja. V notranjih področjih izhlapevanje in transpiracija odstranjujeta vodo iz tal, izguba vode pa koncentrira soli v tleh. Povišano slanost tal povzroča tudi padavinska voda iz oceanov, vendar pa je glavni povzročitelj

zasoljenosti tal človek. Intenzivno poljedelstvo in neprimerno gospodarjenje z vodo sta glavna vzroka za kopičenje soli na poljih. Če namakalna voda vsebuje visoke koncentracije topljencev in ni možnosti izplakovanja nakopičenih soli v odtok, lahko soli hitro dosežejo koncentracije, ki poškodujejo občutljive rastline, posebno poljščine. Rast številčnosti prebivalstva zahteva vse več hrane in zasoljenost tal je eden od najbolj perečih problemov, ki se vzporedno pojavlja z njo (Taiz in Zeiger, 2006).

Povišana koncentracija soli v tleh povzroči več tipov stresa, kot so spremenjen privzem nutrientov (predvsem ionov kot sta K^+ in Ca^{2+}), kopičenje toksičnih ionov (npr. Na^+), osmotski in oksidativni stres. V zasoljenih tleh se kot sol največ pojavlja NaCl (Verslues in sod., 2006). Slanost talne ali namakalne vode je navadno določena z električno prevodnostjo, ki je povezana z osmotskim potencialom. Prevodnost vode je odvisna od v njej raztopljenih ionov, zato je čista voda slab prevodnik električnega toka. Visoka koncentracija ionov v vodi poviša električno prevodnost in zniža osmotski potencial (Taiz in Zeiger, 2006).

V grobem delimo rastline na halofite in glikofite. Halofiti rastejo na slanih tleh in svoj življenjski cikel zaključijo v tem okolju (Taiz in Zeiger, 2006). Glikofiti ne tolerirajo soli. Večina rastlin ne spada med omenjena ekstrema, ampak sodi nekam vmes. Stres zaradi slanosti tal povzroča rastlinam različne poškodbe:

- Osmotski učinek: Raztopljeni topljenci v okolici korenin povzročajo nizek osmotski potencial, ki zniža vodni potencial v tleh. Če rastlina želi ohranjati privzem vode skozi korenine po stebelu do listov, bi se moral vodni potencial v koreninah znižati pod vrednost vodnega potenciala v tleh (Taiz in Zeiger, 2006). Osmotski učinek zaradi raztopljenih topljencev je zato podoben znižanju vodnega potenciala v tleh zaradi suše. Edina razlika je voda, ki pri zasoljenosti ostaja v tleh, pri suši pa jo je vedno manj (Verslues in sod., 2006). Posledica osmotskega učinka je zmanjšanje turgorja in upočasnjena rast.
- Strupenost ionov: V rastlinah, ki rastejo na zasoljenih tleh, se kopičijo strupeni ioni. Za rastline so to Na^+ , Cl^- ali SO_4^{2-} . V normalnih pogojih je koncentracija K^+ v

citosolu višjih rastlin približno 100 mM in koncentracija Na^+ manjša od 10 mM. V tem območju so encimi dejavni. Povišana vrednost Na^+ , K^+ in drugih ionov preprečuje delovanje encimov in zavira sintezo proteinov (Taiz in Zeiger, 2006). Na^+ je toksičen pri koncentracijah višjih od 100 mM, podobno pa naj bi veljalo za Cl^- . Tudi K^+ pri 100-200 mM koncentraciji zavira delovanje encimov (Munns, 2002). Visoke koncentracije Na^+ so vzrok, da ioni Na^+ zamenjajo Ca^{2+} ione v plazemski membrani. Posledica je spremenjena propustnost membrane in puščanje K^+ ionov iz celice. Na^+ poruši ionsko homeostazo, ter tako na več načinov vpliva na vsebnost hranil v rastlini; onemogoča privzemanje K^+ kot esencialnega elementa, tako s tekmovanjem za vezavna mesta na prenašalnih proteinih, kot tudi na nivoju še slabo poznanih znotrajceličnih procesov. Ob kopičenju visokih koncentracij Na^+ in Cl^- v kloroplastih je zavirana fotosinteza. Ker pa je fotosintetski elektronski transport občutljiv na povišane koncentracije soli, to vpliva tudi na kroženje ogljika in fotofosforilacijo (Taiz in Zeiger, 2006).

Povišana koncentracija Na^+ poškoduje rastline tudi posredno, saj degradira strukturo tal, zmanjša poroznost tal in prepustnost za vodo. Taka tla so zelo trda in neprepustna (Verslues in sod., 2006).

- Sekundarni učinki: Nastanejo kot posledica porušene integritete celične membrane in metabolizma celice, nastajanja toksičnih molekul, kot so ROS (reaktivne kisikove spojine, ang. reactive oxygen species) in celične smrti. Ni še znano kako primarni in sekundarni učinki stresa zaradi zasoljenosti tal motijo celično delitev in rast, vsekakor pa spadajo med procese prilagajanja na subletalne koncentracije soli (Taiz in Zeiger, 2006).

Na celičnem nivoju je prizadeta rast celic. Ob prisotnosti soli celice izgubijo vodo in se skrčijo, njihovo podaljševanje ni mogoče. Posledica je zmanjšana rast korenin in listov. Navadno so listi bolj prizadeti kot korenine. Kopičenje soli v listih narašča do kritične točke, ko celice niso več sposobne kompartmentizirati soli v vakuoli, zato kopičijo ogljikove hidrate. Rast mlajših listov je onemogočena, saj nimajo dotoka ogljikovih hidratov, nujno potrebnih za rast. Daljša izpostavljenost slanemu okolju pomeni višjo

koncentracijo soli in se kaže v počasnejši rasti ter manjši končni velikosti tako listov kot celotne rastline (Munns, 2002).

Rastline uporabljajo več strategij, da zmanjšajo stres zaradi zasoljenosti tal. Gre za procese ohranjanja homeostaze, razvoja tolerance ali izogibanja (Verslues in sod., 2006). Mehanizme v grobem delimo v dve skupini: mehanizmi, ki zmanjšajo vstopanje soli v rastline in mehanizmi, ki zmanjšajo koncentracijo soli v citoplazmi. Halofiti uporabljajo oba tipa mehanizmov, glikofiti pa omenjenih strategij niso sposobni uporabljati v taki meri (Munns, 2002).

Poškodbam zaradi povišane koncentracije soli se rastline lahko izognejo z ohranjanjem primerne ionske homeostaze. To lahko naredijo z izključevanjem soli iz citoplazme, bodisi z reduciranjem privzema skozi korenine, bodisi z aktivnim izločanjem soli ali s kompartmentizacijo soli v vakuolah. Zaradi transpiracije je pomembna tudi blokada transporta soli iz korenin v poganjke. Za to naj bi bila odgovorna SOS signalna pot, ki uravnava prehod Na^+ in K^+ preko plazmaleme in tonoplasta (Verslues in sod., 2006).

Ostali odgovori so pomembni za toleriranje škodljivih učinkov visoke vsebnosti soli v citoplazmi, kot posledice kopičenja soli ali dehidracije. Mehanizmi tolerance kopičenja soli v rastlinskem tkivu so zelo podobni mehanizmu toleriranja dehidracije, ki nastopi zaradi zmanjšanja vodnega potenciala ali zamrzovanja. Sem spada kopičenje kompatibilnih topljencev (prolin, glicin betain...) in proteinov ter ROS detoksifikacija (Verslues in sod., 2006).

2.1.2 Suša

Spremenjen vodni status rastline je lahko posledica več oblik abiotskega stresa, vendar je najbolj pomemben prav pri suši. Suša je definirana kot perioda padca nivoja vode v rastlini. V naravi je eden od omejujočih dejavnikov, veliko škode pa povzroči v poljedelstvu. Vpliva tudi na pojav drugih stresov, kot so temperaturni in svetlobni stres ter stres zaradi pomanjkanja hranil. Komponenta stresa, ki najbolj definira sušo, je zmanjšana dostopnost razpoložljive vode v tleh. Lahko jo enačimo tudi z zmanjšanjem vodnega

potenciala, ki rastlini otežuje privzem vode. Znižan vodni potencial sproži niz odgovorov, ki rastlini omogočajo izogibanje pomanjkanju vode, privzem vode kljub znižanemu vodnemu potencialu ali toleriranje pomanjkanja vode v tkivu. Celostno gledano so za premagovanje posledic suše potrebne spremembe v vodnih tokovih in povezavah na celičnem nivoju in na nivoju celotne rastline (Verslues in sod., 2006).

V večini primerov je primaren odgovor rastline izogibanje nizkemu vodnemu potencialu. Rastline skušajo zadržati tkivni vodni potencial. Če se ta zmanjša, se zmanjša tudi turgor in poveča se koncentracija topljencev. Plazemska membrana se odebeli in naguba. Od turgorja odvisni procesi so prizadeti, velik je vpliv na širjenje listne ploskve in podaljševanje korenin (Taiz in Zeiger, 2006). Ustrezno količino vode tako skušajo ohranjati s povečanjem privzema ali zmanjšanjem izhajanja vode. Privzem in izhajanje vode vzdržujejo v ravnotežju. Kratkoročno dosežejo ravnotežje z zapiranjem listnih rež, dolgoročno pa s povečanjem deleža korenin, shranjevanjem vode v tkivih, odebelitvijo kutikule in zmanjšanjem propustnosti celične stene. Najpomembnejše je naraščanje deleža korenin, ki občutno poveča možnost privzema vode (Verslues in sod., 2006).

Če je suša blaga in časovno omejena, so mehanizmi aklimacije na sušo zadostni za ohranjanje glavnih življenjskih procesov. V takšnih pogojih produktivnost rastlin povečajo mehanizmi, kot so manjša stomatalna prevodnost, zaviranje večanja listov, povečana rast korenin, odmetavanje listov (Verslues in sod., 2006). Prvi odgovor, ki kratkoročno odpravlja posledice suše, je zapiranje listnih rež. Proces zmanjša izhlapevanje iz obstoječih listnih ploskev. Listne reže se lahko zaprejo iz dveh razlogov; prvi je padec turgorja v celicah zapiralkah, kot posledica evaporacije iz listne ploskve in je pasiven. Drugi mehanizem je aktiven, pojavi se, ko so dehidrirane tako korenine, kot listi. Zmanjšana vsebnost topljencev v celicah zapiralkah povzroči izgubo vode in posledično zapiranje rež (Taiz in Zeiger, 2006). Pri tem procesu je aktivno udeležena tudi abscizinska kislina (ABA). Posledica obeh procesov je omejena difuzija CO₂ v liste, kar povzroči nizko znotrajcelično koncentracijo CO₂. Omejena fiksacija CO₂ v času suše povzroči difuzijo CO₂ iz znotrajceličnih prostorov v kloroplaste, ter spremeni sposobnost in obnavljanje

ribuloze-1,5-bifosfata (Rubisco) (povzeto po Stiller in sod., 2008). Negativna posledica je torej izguba učinkovitosti fotosinteze, ter usmeritev virov v rast korenin.

Naslednji odgovor na sušo je zaviranje večanja listov. Proces se pojavi zaradi znižanja turgorja. Že zelo majhna sprememba v vodnem potencialu povzroči upad turgorja, z njim pa se zmanjša širjenje listne ploskve in rast celotne rastline. Manjša listna ploskev izgublja manj vode in na ta način rastlina lažje ohranja ugodno razmerje med privzemom in oddajanjem vode. Opazen je tudi negativen vpliv na rast stebela. Omenjene procese rastline uravnavajo z biokemijskimi in molekularnimi procesi, med katerimi so tudi biosinteza membrane in celične stene, delitev celice in sinteza proteinov (Taiz in Zeiger, 2006).

Suša vpliva tudi na razvoj koreninskega sistema. Razmerje biomas med koreninami in poganjki je odvisno od privzema vode s koreninami in od fotosinteze v poganjkih. Poganjek bo rasel do višine, ki bo za korenine omejujoča, in obratno, koreninski sistem se bo širil do točke, ko bodo produkti fotosinteze zadostovali potrebam. Funkcionalno ravnovesje se spremeni, če se spremeni oskrba z vodo. Ko je oskrba z vodo omejena in je omejeno širjenje listne ploskve, je poraba ogljika in energije manjša, zato se lahko več asimilatov porablja za rast korenin. Obenem koreninski vršički v suhih tleh izgubljajo turgor. Vse to vodi rast korenin v globlje in bolj vlažne predele tal. Sprva je koreninski sistem plitev, s sušenjem zgornjih plasti tal pa postaja vse globlji (Taiz in Zeiger, 2006).

Skupna listna površina se ne spremeni samo na račun zmanjšane ekspanzije, ampak tudi na račun odpadanja listov. Če suša nastopi, ko so listi že dosegli končno rast, bodo ti prešli v senescenco in sčasoma odpadli. Zmanjšana skupna listna površina je že dolgoročna prilagoditev na sušne razmere. Puščavske rastline v sušnem obdobju odvržejo vse svoje liste in poženejo nove po dežju. Abscizijo listov povzroča endogeni rastlinski hormon etilen (Taiz in Zeiger, 2006).

V primeru resnega stresa zaradi suše, našteti mehanizmi ne nudijo popolne zaščite pred učinki zmanjšane vodnega potenciala. Rastlina ni več sposobna vzdrževati ravnovesja med privzemom in izgubo vode, zato se aktivirajo dodatni mehanizmi, pomembni za

vzdrževanje življenjskih funkcij rastlin. Zelo pomembna je vloga ABA-e, ki sodeluje pri regulaciji signalnih poti, ki se vklopijo ob stresu (Verslues in sod., 2006).

Rastline privzemajo vodo dokler je njihov vodni potencial nižji (bolj negativen) kot vodni potencial tal. Ena izmed možnih prilagoditev je kopičenje topljencev. Celica s kopičenjem topljencev zniža svoj vodni potencial, obenem pa se turgor in celični volumen ne zmanjšata. Citosolni encimi so zelo občutljivi na visoke koncentracije ionov, zato se ioni kopičijo v vakuoli, ostali topljenci pa v citoplazmi, saj morajo izravnati ravnovesje celičnega vodnega potenciala (Taiz in Zeiger, 2006). Poleg ionov rastline kopičijo še kompatibilne topljence, to so organske spojine, ki ne ovirajo delovanja encimov, ne vplivajo na metabolizem in imajo več zaščitnih funkcij. Mednje spadajo amino kisline (prolin), sladkorji (sorbitol, manitol), kvartarni amini (glicin betain). Do kopičenja topljencev prihaja v listih, v manjši meri pa tudi v koreninah, kjer pomagajo pri ohranjanju turgorja in rasti korenin. Kopičenje topljencev ni samo odgovor na sušo, ampak tudi na stres zaradi zasoljenosti tal, nizkih temperatur in drugih abiotskih stresov (Verslues in sod., 2006).

Ko rastlinske celice izgubijo vodo, se skrčijo. Skrčene koreninske celice se odmaknejo od talnih delcev, ki zadržujejo vodo in občutljivi koreninski lasi se poškodujejo. Ko se med sušo rast korenin ustavlja, se zunanja stran korenin (hipoderm) obloži s suberinom, nepropustnim lipidom, ki poveča odpornost proti suši. Podoben učinek ima tudi predelitev vodnih stolpcev znotraj ksilema. Tanjši vodni stolpci so namreč sposobni posrkati vodo do večje višine, ter tako oskrbovati višje dele rastline z vodo kljub suši (Taiz in Zeiger, 2006).

Pogost odgovor na sušo je nastanek debelejšše kutikule, ki zmanjša izhajanje vode. Voski se nalagajo tako na zunanjo stran, kot tudi med notranje plasti kutikule. Debelejša kutikula zmanjša prepustnost CO₂, vendar to nima vpliva na fotosintezo, saj epidermalne celice pod kutikulo niso fotosintetske (Taiz in Zeiger, 2006).

Najbolj prefinjena adaptacija na rast v sušnih razmerah je način fotosinteze CAM. Reže so ponoči odprte, podnevi pa zaprte. Razlika v parnem pritisku, ki vodi transpiracijo, je ponoči, ko sta zrak in list hladnejša, nižja. Učinkovitost vodne izrabe je tako pri CAM

rastlinah zelo visoka. Metabolizem CAM prevladuje med sukulenti in zahteva strukturne, fiziološke in biokemijske prilagoditve, vključno s spremembami karboksilacijskih in dekarboksilacijskih vzorcev, prehod večjih količin malata v in iz vakuole in obratno odpiranje rež (Taiz in Zeiger, 2006).

2.1.3 Nizke temperature

Stres zaradi nizkih temperatur lahko razdelimo na dva dela; stres zaradi mraza in stres zaradi zmrzovanja. Stres zaradi mraza se pojavi pri temperaturah, ki so prenizke za normalno rast, vendar ne dovolj nizke, da bi se tvoril led. Ta del stresa primarno deluje na propustnost membran. Membrane izgubijo svojo funkcijo in postanejo rigidne, preidejo v trdno ali sol stanje. Membrane, ki jih gradijo nasičene maščobne kisline brez dvojnih vezi in vsebujejo *trans*-maščobne kisline, preidejo v sol stanje pri višjih temperaturah kot membrane, ki so sestavljene iz nenasičenih maščobnih kislin (povzeto po Taiz in Zeiger, 2006; Verslues in sod., 2006).

Stres zaradi zmrzovanja se pojavi pri temperaturah, nižjih od ledišča vode in je pravzaprav povezan z nizkim vodnim potencialom v tleh. Rastlina zmrzovanje občuti kot dehidracijo, saj voda v tleh zamrzne in je rastlini nedostopna. Nastali vodni kristali delujejo tudi na celice, in sicer jih poškodujejo od zunaj in od znotraj. Pri kateri temperaturi se bo voda začela spreminjati v led je odvisno od prisotnosti nukleacijskih jeder. Velikokrat so to epifitske bakterije, ki jih najdemo na površini listov. Kot nukleacijska jedra lahko delujejo tudi celice ali celične stene, vendar niso tako učinkovite. Ko se led enkrat začne tvoriti, predstavlja njegova površina nova nukleacijska jedra in tvorba ledu se širi. Tako kot za druge abiotske stresne dejavnike, je tudi za odpornost na nizke temperature pomembna strategija kopičenja topljencev, ki znižajo ledišče. Na ta način lahko celica kontrolira lokacijo nastajanja ledenih kristalov. Ti se najprej začnejo tvoriti v žilah ksilema v listih in steblu, v votlinah listnih rež in medceličnih prostorih. Velik premer ksilemskih žil favorizira nastajanje vodnih kristalov, razredčen ksilemski sok pa ima višje ledišče kot ostale rastlinske tekočine. Od tu se širjenje ledu nadaljuje v ostale žile in medcelične prostore po vseh tkivih. Vodni kristali pa vseeno ne morejo prodreti skozi plazemsko

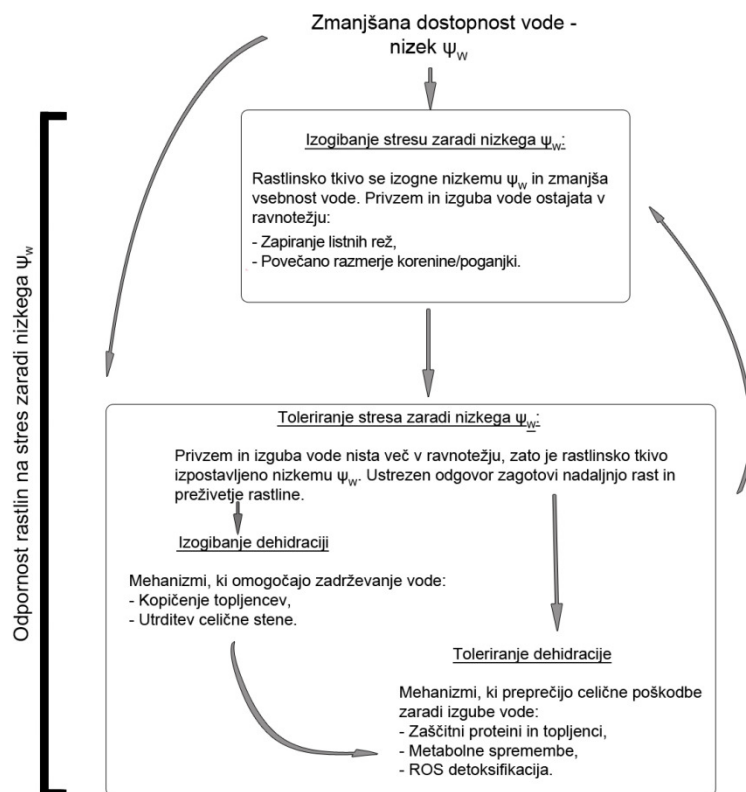
membrano in se širiti po citoplazmi. Nastajanje ledu v medceličnem prostoru zniža vodni potencial ter povzroči gibanje vode iz celice in celične stene, dokler se ne vzpostavi ravnovesje. Na ta način zmrzovanje najprej povzroči dehidracijo in sesedanje celic, nato pa s formiranjem vodnih kristalov razbije tkivo in sproži tok vode preko membran (Verslues in sod., 2006).

Rastline se proti zmrzovanju zaščitijo z antifriznimi proteini. Inducirani so ob nizkih temperaturah, ob vezavi na površino vodnih kristalov pa preprečijo oz. upočasnijo njihovo nadaljnjo rast. Sladkorji in nekateri proteini imajo krioprotektivne lastnosti, stabilizirajo proteine in membrane med dehidracijo, ki jo izzove zmrzovanje. Tako delujejo saharoza, rafinoza, fruktani, sorbitol, manitol. Tako kot pri odgovoru rastline na sušo ima tudi pri odgovoru rastline na zmrzovanje zelo pomembno vlogo ABA, ki inducira toleranco na nizke temperature (Verslues in sod., 2006).

2.1.4 Naravna odpornost rastlin proti abiotskim stresnim dejavnikom

Na polju se lahko rastline soočijo z več stresnimi dejavniki, bodisi naenkrat, bodisi v različnih časovnih obdobjih skozi rastno sezono. Čeprav obstaja več različnih abiotskih stresnih dejavnikov, jih je večina med seboj tesno povezanih, enako pa je tudi z odgovori rastlin nanje. Gre namreč za niz podobnih celičnih, biokemijskih in molekularnih reakcij, ki spremljajo vsak odgovor na posamezen abiotski stresni dejavnik (Taiz in Zeiger, 2006).

Kar nekaj stresnih dejavnikov je med seboj povezanih, saj je vsaj del njihovega škodljivega učinka na rastlino odvisen od motenj vodnega statusa rastline (Slika 1). Zmanjšana dostopnost vode iz okolja je lahko posledica suše, spremenjene vsebnosti ionov in privzemanja vode zaradi slanosti tal, ter celične dehidracije zaradi nastajanja izven celičnih vodnih kristalov med zmrzovanjem (Verslues in sod., 2006).



Slika 1: Odgovor rastlin na stres zaradi nizkega vodnega potenciala (Ψ_w) (Verslues in sod., 2006).

2.2 BIOTSKI STRESNI DEJAVNIKI

Biotski stresni dejavniki so živi dejavniki okolja, ki rastlinam predstavljajo stres. Mednje spadajo rastline, živali in mikroorganizmi, kamor prištevamo tudi viruse. To so najmanjši mikroorganizmi in predstavljajo najbolj primitivne oblike življenja (Drinovec, 1996).

Virusi povzročajo veliko težav zlasti na kulturnih rastlinah in njihovih pridelkih, ker zmanjšujejo količino in kvaliteto pridelka, slabšajo kalitev semen, ovirajo rast kalic in mladih rastlin ter povečajo stroške za omejevanje viroz. Virusne bolezni pri rastlinah je težko zdraviti, saj se virusi na nove generacije prenašajo na veliko načinov: s prenašalci (pršice, žuželke, glive, ogorčice), s semeni in cvetnim prahom ter mehansko, z rastlinskim sokom ali vegetativno z razmnoženim okuženim rastlinskim materialom. Pri večini rastlin se po virusni okužbi pojavijo različni bolezenski znaki, ki so odvisni od samega virusa,

njegovega specifičnega različka, okužbe z drugimi virusi, sorte gostiteljske rastline in vplivov okolja. Simptomi so opazni kot spremenjena barva rastlinskih tkiv, spremenjena oblika rasti in spremenjena vitalnost rastlin. Uničijo lahko tudi celoten pridelek (povzeto po Drinovec, 1996; Javornik, 2004).

Rastlinski virusi so parazitski patogeni z razmeroma enostavno zgradbo, ki odraža veliko ekonomičnost. Zgrajeni so iz proteinskega plašča in genoma, ki je ena ali več molekul DNA ali RNA. Enostavna zgradba je tudi vzrok za obvezen parazitizem v celicah med razmnoževanjem, saj ne premorejo lastnega metabolizma. Virusni genom ima zapise za lastni pomnoževalni encim, protein, potreben za razširjanje virusa znotraj rastline ter proteine proteinskega plašča. Virusi s svojim genomom vplivajo na metabolizem gostiteljske celice in ta sintetizira virusno kodirane beljakovine, podvaja virusne nukleinske kisline in sestavlja nove viruse. Novi infekcijski agensi se širijo po rastlini ali pa se s prenašalci prenesejo na druge gostiteljske rastline. Zgradba in razmnoževanje virusov odražata izjemno prilagojenost na parazitizem (Drinovec, 1996; Javornik, 2004).

Rastline so zaščitene pred vplivi zunanjega okolja. Vsi rastlinski deli, ki so izpostavljeni ozračju, so prekriti z lipidnimi snovmi, ki preprečujejo izhlapevanje vode in varujejo pred vstopom patogenov. Kutin najdemo na nadzemnih delih, suberin v podzemnih delih, olesenelih steblih in zaceljenih ranah. Tako kutin kot suberin lahko dodatno prekrivajo še voski. Rastline premorejo tudi nekaj procesov obrambe proti vdirajočim patogenom. Pogost je preobčutljivostni odgovor celic, pri katerem zaradi izbruha reaktivnih kisikovih spojin (ROS) in dušikovega oksida (NO) celice v neposredni bližini mesta okužbe hitro po okužbi odmrejo ter s tem prikrajšajo patogena za hranila in omejijo njegovo širjenje. Manjši del tkiva odmre, vendar je preostanek rastline nepoškodovan. Nekatere rastline so sposobne uporabljati pridobljeno sistemsko odpornost. Ko rastlina preživi okužbo z določenim patogenom, pogosto razvije odpornost na ta patogen. Ob naslednji okužbi je rastlina zaščitena proti enakemu in navadno tudi podobnim patogenom. Pojavu lahko pravimo tudi navzkrižna odpornost. Zaščito ji omogočajo hidrolitični encimi, salicilna kislina in vodikov peroksid, ki po floemu razpošljejo signal po celotni rastlini (Taiz in Zeiger, 2006).

Najbolj pogost pojav pri interakciji med rastlino in patogenom so nekrotične lezije. Pojavijo se lahko pri odpornih in občutljivih rastlinah. Pri odpornih rastlinah je patogen ujet v nekrotičnih lezijah. Njegovo širjenje je omejeno, nekrotične lezije pa so del preobčutljivostnega odgovora. Srečanje občutljive rastline in patogena se kljub lezijam izraža kot bolezen. Vse bolj kaže, da je izid interakcije med rastlino in patogenom odvisen od hitrosti in obsega odgovora rastline. Gostitelj se ne infektuje z virusom odzove kompleksno, odgovor pa je odvisen od zahtev virusa, gostiteljeve obrambe, stresnih faktorjev, celičnih odgovorov ter lokalnih in oddaljenih tkivnih odgovorov (povzeto po Pompe-Novak, 2006).

V kmetijstvu viruse nadzorujejo z bolj ali manj učinkovitimi ukrepi, kot so izločanje okuženega rastlinskega materiala, uničevanje okuženih rastlin, certifikacija brezvirusnega rastlinskega materiala, uporaba različnih ukrepov za zmanjšanje razširjanja virusov, klasična križna zaščita in klasično žlahtnjenje na viruse odpornih sort, vzgoja zdravih rastlin v laboratorijih. Prilagojenost virusov na vdiranje v celice in povezovanje s celičnimi genetskimi elementi v praksi izkoriščamo kot učinkovit način vnašanja novih genov v rastline (Javornik, 2004).

2.2.1 Krompirjev virus Y

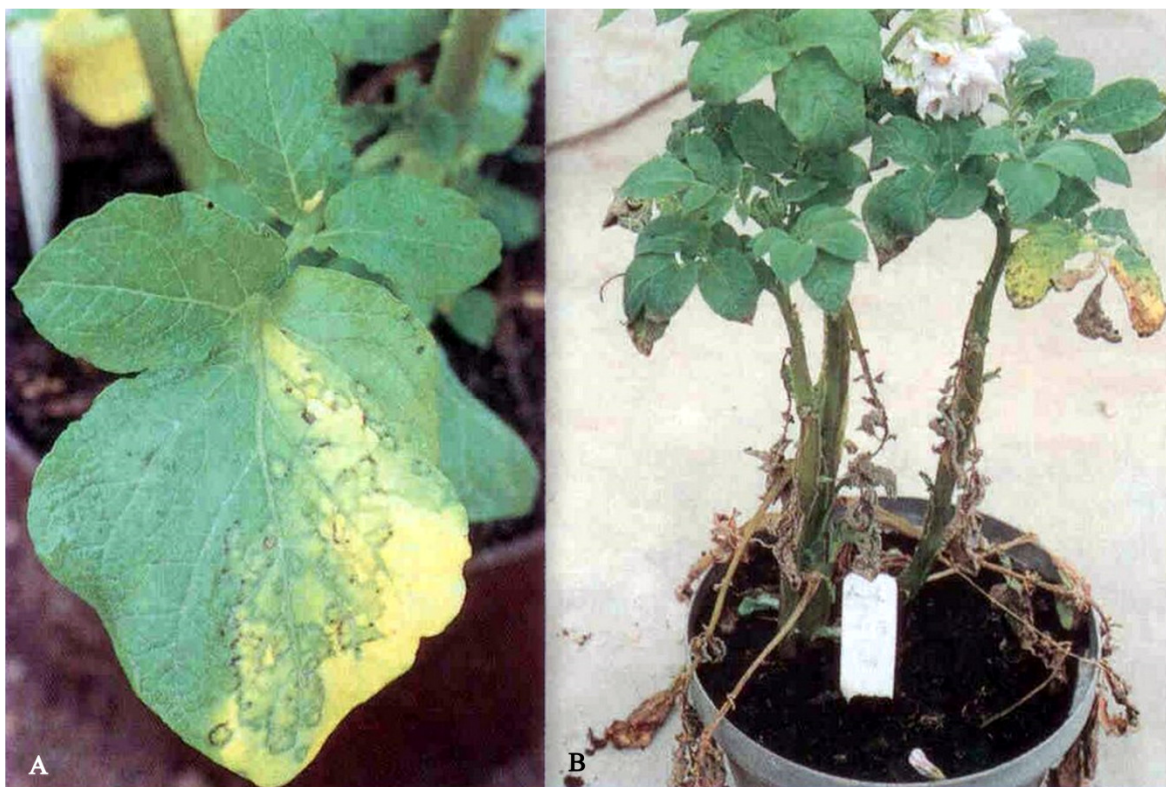
Krompirjev virus Y (PVY, ang. Potato virus Y) je rastlinski patogen iz družine *Potyviridae* in je eden najpomembnejših rastlinskih virusov (Pompe-Novak in sod., 2006). Širi se izredno hitro, zelo zmanjšuje pridelek in sodi med najnevarnejše viruse na krompirju. Virus Y ima mnogo različkov in še vedno se pojavljajo novi. Vsakega izmed njih lahko uvrstimo v eno izmed treh skupin, ki jih označujemo kot virus Y^O , virus Y^C in virus Y^N . Virus Y^{NTN} , različica virusa Y^N , je najbolj agresivna. PVY^{NTN} je nenavadno kužen in je izpodrinil večino sorodnih, vendar manj škodljivih različkov iz svoje skupine. Virus Y se prenaša z dotikom, predvsem pa ga prenašajo vektorji, ki mehansko poškodujejo celično steno in omogočijo vstop virusa (Baebler in sod, 2009; Arends in Kus, 1999). Širjenje virusa pospešijo okužen semenski krompir, nepravilno namakanje in kmetovanje ter

pomanjkanje občutljivih in hitrih metod za detekcijo. Širjenje virusa predstavlja še posebej velik problem v nerazvitem svetu.

Infekcija krompirja z virusom Y^{NTN} se odraža z več simptomi, odvisno od linije virusa in sorte krompirja. Najmilejši simptom je zmanjšana produkcija, najbolj poguben pa obročkasta nekroza gomoljev (PTNRD, ang; potato tuber necrotic ringspot disease). PVY^{NTN} zmanjšuje pridelek bolj kot ostali različki virusa Y^N , pri občutljivih sortah pa tudi kvaliteto. Pojav virusa leta 1986 je bil razlog za hitro izgubo sorte Igor, do takrat v Sloveniji vodilne sorte v pridelavi krompirja (Sluga, 2005). Nekvaliteten krompir ni primeren za prodajo in lahko povzroči velike izgube dobička. Izredno uspešno ga prenaša več vrst listnih uši, sposoben pa je tudi dormance v semenskem krompirju. Iz tega sledi, da uporaba okužene linije krompirja za seme povzroči hitro razširjanje virusa in posledično izgubo pridelka. Hitrega širjenja bolezni ne gre pripisati samo velikemu številu in zgodnjemu začetku selitev uši selivk – prenašalk virusa, ampak tudi močni dovzetnosti za okužbo večine sort krompirja (Arends in Kus, 1999).

Virus PVY spada v rod *Potyvirus*, za katerega velja, da je največja in najbolj uničevalna skupina rastlinskih virusov. Sem spada še približno 200 drugih rastlinskih virusov. PVY okužuje mnogo ekonomsko pomembnih rastlin, kot so krompir (*Solanum tuberosum*), tobak (*Nicotiana tabacum*), paradižnik (*Solanum lycopersicum*) in paprika (*Capsicum* spp.) Virioni so vijugasti delci brez ovojnice, veliki 730×11 nm. Delci vsebujejo enojno molekulo pozitivne linearne RNA. Občutljive sorte krompirja se na okužbo s PVY odzovejo z razvojem specifičnih znakov. Na okuženih listih se po 5 do 7 dneh po inokulaciji pojavijo kloroze in manjše, pikam podobne nekroze (slika 2A). S širjenjem virusa po rastlini se simptomi razvijejo tudi na neinokuliranih listih. 10 dni po inokulaciji se na listih pojavijo gube in mozaične kloroze, ki vodijo v odpadanje listov, dogodek znan pod imenom pojav palmovega drevesa (slika 2B). Rastlinski obrambni mehanizem najprej skuša omejiti gibanje virusa, če pa to ne uspe, sproži celično smrt v okuženem tkivu. Listi se posušijo in obvisijo na stebelu ali odpadejo, steblo pa zaostane v rasti in predčasno odmre (Arends in Kus, 1999; Pompe-Novak in sod., 2006). Simptomi okužbe niso nujno enaki pri

vseh sortah krompirja. Primer je sorta Désirée, kjer se okužba ne odraža s tako očitnimi znaki (povzeto po Sluga, 1994).



Slika 2: Rastlina krompirja okužena s PVY^{NTN}. A: znamenja okužbe na inokuliranem listu B: odpadanje listov in nastanek »palmovega drevesa«. (Arends in Kus, 1999).

Med pomnoževanjem virusa so gostiteljevi geni utišani. V prvih 12 ur po okužbi so vključene spremembe izražanja genov povezanih s fotosintezo, zaznavanjem, signaliziranjem in obrambo (Baebler in sod., 2009). Spremembe se pojavijo tudi v kloroplastih inokuliranih listov. Gre za prilagoditve strukture in velikosti kloroplastov, zmanjšanje nivoja klorofila in spremenjene aktivnosti peroksidaze (Milavec in sod., 1999). V poznejšem stanju okužbe se v občutljivih sortah krompirja poviša skupna koncentracija proteinov, česar pa ni opaziti pri odpornih in delno odpornih sortah. Poveča se koncentracija citokininov (Dermastia in Ravnikar, 1996) in spremeni se ekspresija genov za heat-shock proteine, katalazo in β -1,3-glukanazo (Pompe-Novak in sod., 2006).

Včasih so PVY odkrivali s pomočjo vidnih znakov, vendar pa je to problematično, ko je virus dormanten ali simptomi niso očitni. Virus Y zato odkrivamo z uporabo več tehnik. Z encimskim imunskim testom (ELISA, ang. enzyme-linked immunosorbent assay) izkoriščamo interakcijo med antigeni in specifičnimi protitelesi. Metoda je poceni in hitra, vendar pa ni dovolj občutljiva za odkrivanje manjših koncentracij virusa. Priročna metoda je verižna reakcija s polimerazo s predhodnim prepisovanjem izolirane RNA v cDNA z reverzno transkriptazo (RT-PCR, ang. reverse transcription polymerase chain reaction), ki je boljša predvsem zato, ker za detekcijo zadostuje že majhna količina virusa, z njo pa lahko detektiramo več virusnih tarč v eni sami reakciji. Pri RT-PCR je podatke potrebno analizirati z gelsko elektroforezo, metoda pa je dražja od tehnike ELISA (povzeto po Crosslin in sod., 2005). Virus Y lahko zaznavamo tudi z uporabo PCR v realnem času (RT-qPCR, ang. quantitative reverse transcription polymerase chain reaction), ki omogoča vpogled v medsebojno povezanost začetne koncentracije vzorca in močjo signala. Razlikujemo lahko med različnimi linijami virusa, gelska elektroforeza pa ni potrebna. Uporabljamo tudi elektronsko mikroskopijo, mikromreže in biološke teste, ki pa so časovno potratni, zahtevajo strokovno znanje in izkušnje ter včasih ne omogočajo natančnega prepoznavanja virusa (povzeto Nicolaisen, 2011).

2.3 KROMPIR

Krompir (*Solanum tuberosum*) je gomoljnica in spada v družino razhudnikovk (*Solanaceae*). Je zel s stebli, ki zrastejo do 1 m visoko in liho pernatimi listi. Cvetovi so beli do vijoličasti, v oblikah socvetij, ki dosežejo premer do 2,5 cm. Gomolj, odebeljen konec podzemnega stebela, je užiten del rastline. Pokriva ga rjava do vijolična kožica, meso je navadno belo ali rahlo rumeno. Gomolj ima zalistne brste ali »očesca«, iz katerih poženejo nove rastline. Za vegetativno razmnoževanje uporabljamo predvsem gomolje (Arends in Kus, 1999).

Domovina krompirja so perujski Andi, skupaj s koruzo je bil glavna hrana Inkov. V 16. stoletju so ga španski zavojevalci prinesli v Evropo. Sprva so ga gojili kot okrasno rastlino, sedaj pa ga za hrano gojijo po vsem svetu. Po razširjenosti pridelovanja v svetu je na

četrtem mestu, za pšenico, rižem in koruzo. Krompir je bogat z ogljikovimi hidrati, kalcijem, nikotinsko kislino in vitaminom C. Vsebuje malo beljakovin, vendar je njihova vrednost velika, saj gre za esencialne aminokisline (Arends in Kus, 1999).

Po svetu trenutno obstaja več tisoč različnih sort krompirja. Pridelovalci vsako leto nekaj sort opustijo, prav tako se vsako leto pojavijo nove sorte kot rezultat dela žlahtniteljev. V Sloveniji vsako leto vpišemo v sortno listo po več tujih sort krompirja, imamo pa tudi slovenske sorte (Arends in Kus, 1999; Sluga, 2005).

Krompir sorte Désirée je srednje pozna sorta z rumenim mesom in rdečo kožico. Rastlina se razvije precej hitro, je visoka in požene več srednje močnih stebel, ki so rdeče obarvana. Listi so srednje veliki, temno zeleni z rdeče rjavimi žilami. Cveti obilno, z velikimi svetlo rdeče vijoličastimi cvetovi. Razvije semenske jagode. Gomolji krompirja Désirée so veliki, podolgovato ovalni, z rdeče vijoličasto kožico. Meso je svetlo rumeno. Sorta je odporna proti krompirjevemu raku, precej odporna proti krompirjevi plesni na listih in gomoljih, manj pa proti navadni krastavosti. Proti virusoma Y^O in Y^N ni odporna in je nekoliko občutljiva za virus zvijanja listov in za virus Y^{NTN} , ki pa ju dobro prenaša. Pridelek okuženih rastlin se namreč prvo leto po okužbi ne zmanjša preveč in tudi nekroze na gomoljih, kot posledica okužb z Y^{NTN} , so zelo redke in komaj opazne. Sorta je odporna na sušo, zato se pri nas močno uveljavlja kot splošen jedilni krompir tudi za ozimnico, saj dobro prenaša skladiščenje (Sluga, 1994).



Slika 3: Virus Y^{NTN}; obročkaste nekroze na krompirju cv. Désirée (Arends in Kus, 1999).

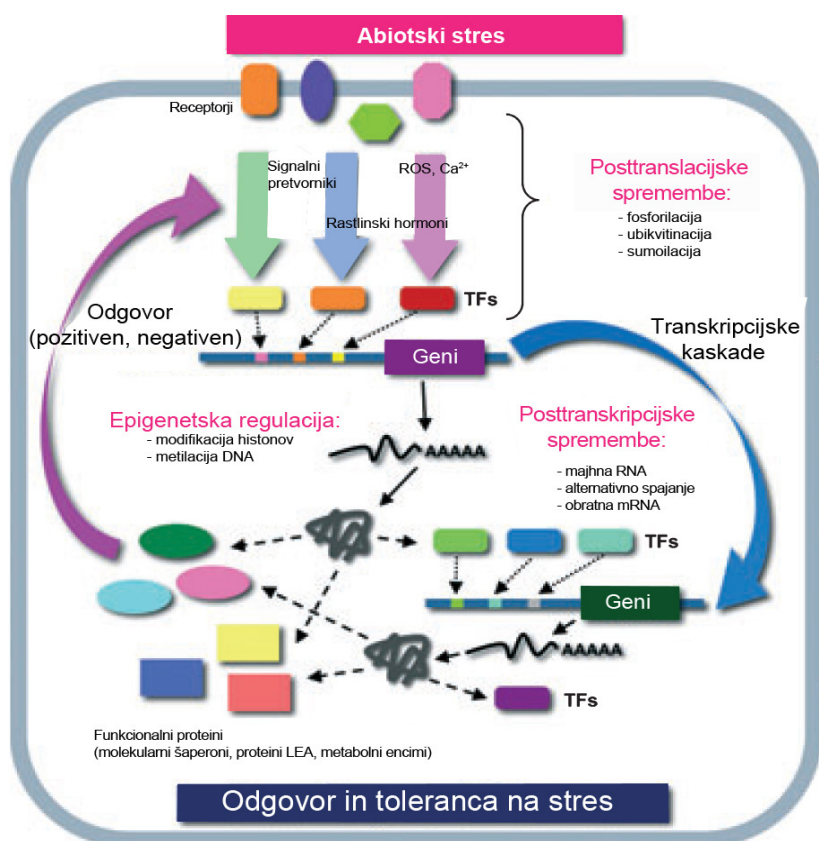
2.4 RAZVOJ ODPORNIH RASTLINSKIH SORT

Rastline so pritrjene in v naravi izkusijo različne oblike strese. Nanje velikokrat deluje več stresov hkrati, zato je vzgoja odpornih rastlinskih sort že dolgo zelo aktualna. Odporne sorte rastlin lahko pridobimo s klasičnimi metodami žlahtnjenja, vendar so te tehnike dolgotrajne. Z uporabo biotehnoloških pristopov pa lahko v rastline vnesemo gene za povečano odpornost, ter tako v krajšem času dobimo rastline z želenimi lastnostmi. Transgene rastline, odporne proti enemu abiotskemu stresu, so pogosto odporne tudi na nekatere druge abiotske strese. Ker pa se kmetijstvo sooča tudi z biotskimi stresnimi dejavniki, je vse več raziskav usmerjenih v razvoj rastlin, odpornih na več stresnih dejavnikov (povzeto po Srinivasan in sod., 2009; Habib in sod., 2007).

Odgovor rastlin na abiotski stres je zelo kompleksen in vključuje mnogo genov in biokemijskih mehanizmov. Mehanizmi, ki omogočajo toleranco rastlin na abiotske stresne dejavnike, so odvisni od ekspresije specifičnih genov. Ti mehanizmi lahko predstavljajo molekularno orodje za gensko spreminjanje rastlin s povečano toleranco na abiotske stresne dejavnike (Wang in sod., 2003). Gene lahko razdelimo v 3 skupine:

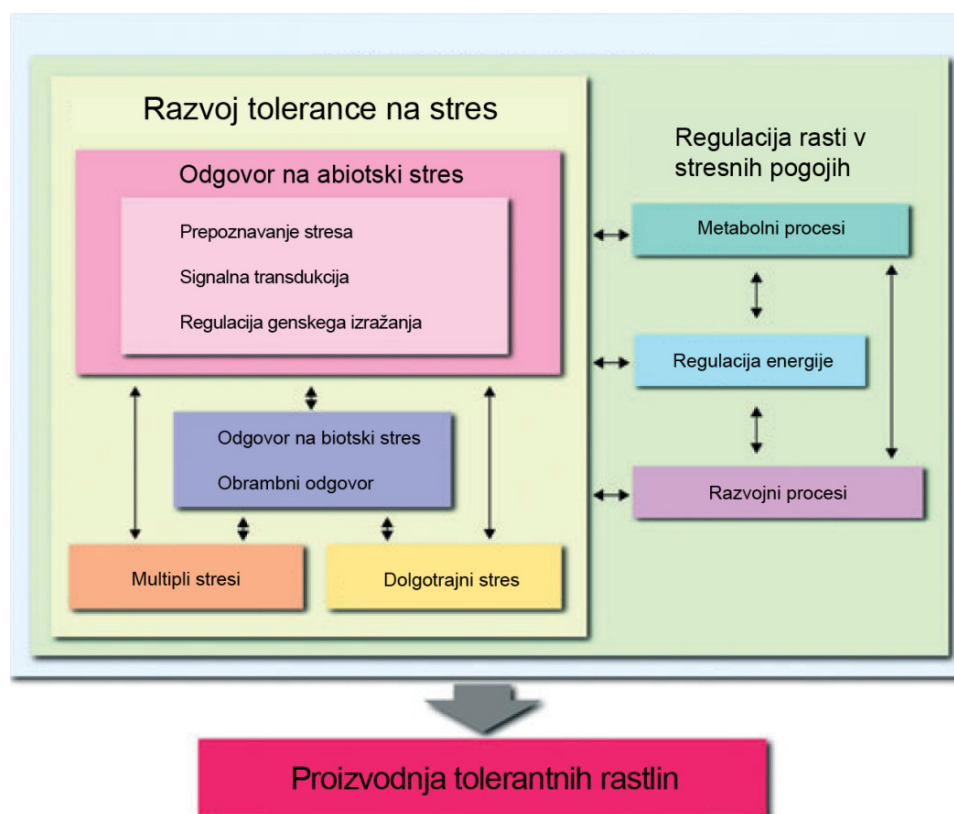
- geni, ki kodirajo regulatorne proteine, kot so transkripcijski faktorji in signalni proteini,
- geni, katerih proteinski produkti ščitijo membrane in proteine,
- geni, katerih proteinski produkti vplivajo na privzem in prenos vode in ionov.

Obsežne raziskave modelnega organizma navadni repnjakovec (*Arabidopsis thaliana*) so nam omogočile razumljivejši vpogled v odgovor rastlin na abiotiski stres. Signal stresa rastline prejmejo s pomočjo receptorjev. Signal se pretvori preko raznih signalnih poti, kjer sodelujejo sekundarni sporočevalci, rastlinski hormoni, signalni pretvorniki. Gene, ki se aktivirajo ob stresu, regulirajo stresni stimuli in transkripcijski faktorji (TFs). Nekateri aktivirani geni direktno kodirajo proteine vpletene v toleranco stresa, drugi geni pa kodirajo regulatorne proteine, ki s pozitivno ali negativno povratno zanko vplivajo na odgovor rastlin (slika 4) (Hirayama in Shinozaki, 2010).



Slika 4: Kompleksen odgovor rastlin na abiotiske stresne dejavnike (Hirayama in Shinozaki, 2010).

Uporaba biotehnologije v kmetijstvu ponuja nove možnosti razvoja rastlin, ki lahko tolerirajo okoljske strese. Na ta način pridobimo raznolike poljščine v kratkem času (Mohamed in sod., 2010). Gene za pridobitev večje odpornosti na abiotske in biotske stresne dejavnike lahko najdemo pri rastlinah, prav tako pa tudi pri glivah ali bakterijah. V teh organizmih raziskovalci poiščejo gene, ki omogočajo preživetje stresnih razmer, nato pa jih z metodami genske tehnologije vnesejo v rastline (Istinič in sod., 2010). Za razvoj rastlin, tolerantnih na abiotski in biotski stres, je potrebno razumevanje kompleksnosti procesov. Manipulacija z rastlinskimi sistemi namreč zahteva veliko znanja o odgovorih rastlin na stres, o regulaciji energije ter metabolnih in razvojnih procesov. Povezovanje in pravilno obravnavanje vseh omenjenih procesov vodi v uspešno proizvodnjo tolerantnih rastlin (slika 5) (Hirayama in Shinozaki, 2010).



Slika 5: Razvoj rastlin tolerantnih na stres (Hirayama in Shinozaki, 2010).

Mnogi geni iz prej omenjenih treh skupin genov so že bili uporabljeni za izboljšanje rastlin na odpornost proti abiotskim stresnim dejavnikom. Avtorji poročajo tudi o vpletenosti različnih proteaznih inhibitorjev (PI) v odgovor rastlin na abiotske, pa tudi biotske stresne dejavnike. Precej študij (Gutierrez-Campos in sod., 1999; Srinivasan in sod., 2009; Zang in sod., 2008, Van der Vyver in sod., 2003) se s tem namenom osredotoča na uporabo PI kot uspešnih dejavnikov za toleranco za stresne razmere.

Kot odgovor na okoljske dejavnike so nekateri proteini izpostavljeni konformacijskim spremembam, drugi se šele takrat sintetizirajo. Napačno zviti ali poškodovani proteini so odstranjeni in nadomestijo jih na novo sintetizirani. Procese odstranjevanja in sinteze vodijo proteolitični encimi, ki so pomembni pri odgovoru rastline na stres. Proteoliza je kompleksen proces, v katerega je vključenih veliko encimov. Odvija se v različnih kompartmentih. Aktivnost proteolitičnih encimov regulirajo PI, ki so v rastlinskem svetu zelo razširjeni. So majhni proteini, navadno prisotni v visokih koncentracijah v založnem tkivu, kjer izmed vseh proteinov predstavljajo tudi do 10%. Prav tako jih najdemo v listih kot odgovor ob napadu patogenov (Srinivasan in sod., 2009). Veliki in kompleksni skupini teh rastlinskih proteinov je skupna sposobnost tvorbe stabilnih kompleksov s proteazami. Na ta način blokirajo njihovo delovanje ali spremenijo, oz. onemogočijo dostop do aktivnega mesta encima (Haq in sod., 2004). V splošnem poznamo 2 načina delovanja PI. Prvi mehanizem je ireverzibilna reakcija, pri kateri ujamejo encim v past. Reakcija poteka samo na endopeptidazah in je rezultat konformacijske spremembe, ki jo PI preidejo. Drugi, pogostejši mehanizem predstavlja reverzibilno reakcijo, kjer se PI in proteaza povežeta s peptidno vezjo. Visoko afinitetna vez lahko nastane neposredno v aktivnem centru proteaze ali v njegovi bližini (Christeller, 2005; Rawlings in sod., 2004).

V metabolizmu rastlin imajo PI dve glavni nalogi: delujejo proti endogenim in proti eksogenim proteazam. Vplivajo na celično rast in diferenciacijo, celični cikel, se izražajo ob različnih stresnih razmerah, odstranjujejo napačno zvite proteine in sodelujejo pri celični smrti (povzeto po Lopez-Otin in Bond, 2008). Pomembni so pri kontroli proteaz v metabolnih procesih (izgradnja in razgradnja založnih proteinov v semenih), reorganizaciji proteinov med odpadanjem listov, v razvojnih procesih (emriogeneza, podvajanje

kloroplastov, fotomorfogeneza, hormonalna signalizacija, cvetenje). Služijo kot shranjevalni proteini v specifičnih, za to namenjenih organih. Bolje preučena funkcija PI je obramba pred škodljivci, paraziti in patogeni. PI inhibirajo proteaze iz prebavil rastlinojedih žuželk, z odcepljanjem pomembnih aminokislin vplivajo na vitalne procese, kot sta levitev pri žužkah in podvajanje virusov (Habib in Fazili, 2007). V zadnjem desetletju se veliko raziskav osredotoča na PI, kot pomembne dejavnike pri zaščiti pred abiotskim stresom. Sodelujejo pri odgovoru na stres zaradi visokih in nizkih temperatur, nezadostni osvetljenosti, visoki slanosti, suši (Srinivasan in sod., 2009; Zang in sod., 2008; Mosolov in Valueva, 2004, Habib in Fazili, 2007).

PI delimo na 4 razrede, specifične za 4 skupine proteaz: serinski, aspartatni, metalo in cisteinski PI. Delitev temelji na aminokislini v reaktivnem centru proteaze. Razred serinskih PI je najštevilčnejši, obsega osem družin. Serinske PI najdemo v semenih, listih in gomoljih. Imajo pomembno endogeno vlogo, in sicer v razvoju in pri odgovoru na okoljske dejavnike (Srinivasan in sod., 2009; Mosolov in sod., 2004; Haq in sod., 2004). Pomembna skupina so tudi cisteinski PI, ki ujamejo cisteinske proteaze v ireverzibilen, tesno zapakiran kompleks. Najdemo jih pri enokaličnicah in dvokaličnicah, lahko so vključeni v odgovor rastlin na stres, pomembni so za pravilen razvoj in delujejo kot modulatorji pri programirani celični smrti. Imajo večino zgoraj naštetih funkcij: reorganizacija proteinov med kalitvijo in razvojem semena, mobilizacija rezervnih snovi, sinteza in razgradnja proteinov, uravnavanje metabolnih poti in odgovor proti patogenom, kot so virusi, glive, nematode, pršice in insekti (Zang in sod., 2008). Nekateri cisteinski PI dokazano delujejo insekticidno, saj zavirajo prebavne cisteinske proteaze iz črevesja insektov ter delujejo proti proteazam parazita, zajedavske gliste *Globodera pallida* (povzeto po Gutierrez-Campos in sod., 1999). Izražanje genov za PI je navadno vezano na določene organe, faze rasti ali na okoljske razmere; kalitev, zgodnje odpadanje listov, nizke temperature, stres zaradi slanosti (Jung in sod., 2010).

Vpletenost PI pri obrambi rastlin so najprej opazili ob napadu ličink malega mokaarja (*Tribolium confusum*) na sojo. Prisotni PI so bili zanje strupeni (povzeto po Habib in Fazili, 2007). PI iz družine Kunitz so bili aktivni pri redkvi (*Raphanus sativus*)

izpostavljeni solnemu stresu ter pri navadnem repnjakovcu (*Arabidopsis thaliana*) izpostavljenemu suši. Gen za cisteinski PI iz kostanja (*Castanea sativa*), CsC, je bil induciran ob stresu zaradi solnega šoka in nizkih temperatur (povzeto po Huang in sod., 2007). Transgeni tobak s povečanim izražanjem cisteinskega PI iz riža, *Oryza cystatin 1*, je bil odporen proti okužbi s potivirusoma TEV in PVY (Zhang in sod., 2008). PI so torej pogosto pomembni pri odzivu rastline na abiotski in biotski stres, obenem pa so zanimivi, ker lahko predstavljajo zaščito in toleranco na več stresnih dejavnikov hkrati.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 SESTAVA RASTLINSKIH GOJIŠČ

Za pripravo gojišč MS (Murashige in Skoog, 1962) smo postavili posodo z vsemi sestavinami (brez agarja) na magnetni mešalnik, dolili deionizirano vodo in pustili, da se raztopina dobro premeša. Ko so se vse sestavine raztopile, smo z dodajanjem NaOH ali HCl umerili vrednost pH na 5,75 do 5,8. Raztopino smo segreli do vretja, dodali agar in še 10 min kuhali, da je bila raztopina bistra. Še toplo gojišče smo razlili v steklene epruvete, jih pokrili s plastičnimi pokrovčki in avtoklavirali 15 minut pri temperaturi 121°C in tlaku 103,4 kPa.

Slana gojišča smo pripravili enako kot gojišča za namnoževanje rastlin, dodali pa smo jim NaCl do končnih koncentracij 60 ali 120 mM NaCl.

Za pripravo rastlin za ukoreninjanje smo gojišča do točke umerjanja pH pripravili enako. Raztopini smo dodali agar in avtoklavirali 15 min pri temperaturi 121°C in tlaku 103,4 kPa. Po avtoklaviranju smo še toplo gojišče v laminariju razlili v petrijevke. Sestava gojišča MS je predstavljena v preglednici 1.

Preglednica 1: Sestava rastlinskega gojišča MS 30 (prirejeno po Murashige in Skoog, 1962).

Sestavine (proizvajalec)	Končna koncentracija	
Makroelementi		
NH ₄ NO ₃ (Sigma)	1650 mg/l	20,6 mM
KNO ₃ (Merck)	1900 mg/l	18,8 mM
CaCl ₂ · 2H ₂ O (Merck)	440 mg/l	3,0 mM
KH ₂ PO ₄ (Kemika)	170 mg/l	1,25 mM
MgSO ₄ · 7H ₂ O (Merck)	370 mg/l	1,5 mM
Mikroelementi		
CoCl ₂ · 6H ₂ O (Merck)	0,025 mg/l	0,11 mM
CuSO ₄ · 5H ₂ O (Merck)	0,025 mg/l	0,10 mM
FeSO ₄ · 7H ₂ O (Sigma)	27,8 mg/l	100 mM
H ₃ BO ₃ (Merck)	1,9 mg/l	30,7 mM
MnSO ₄ · 4H ₂ O (Sigma)	22,3 mg/l	100 mM
KI (Merck)	0,83 mg/l	5,00 mM
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O (Sigma)	0,25 mg/l	1,03 mM
Vir Fe		
FeSO ₄ · 7H ₂ O (Sigma)	27,8 mg/l	100 mM
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O (Kemika)	37,3 mg/l	100 mM
Vir organskih spojin		
glicin (Merck)	2 mg/l	26,6 mM
nikotinska kislina (Kemika)	0,5 mg/l	4,06 mM
piridoksin - HCl (Sigma)	0,5 mg/l	2,43 mM
tiamin - HCl (Caldiochem)	0,5 mg/l	1,48 mM
Za trdno gojišče MS 30 dodamo		
saharoza (Kemika)	30g/l	87,6 mM
agar (Bacto)	8 g/l	
Za slano trdno gojišče MS 30 dodamo		
NaCl (60 mM)	3,5 g/l	60 mM
NaCl (120 mM)	7,0 g/l	120 mM

3.2 REAGENTI IN BARVILA

- Barvilo za nanašanje (Fermentas),
- Etidijev bromid 10 mg/ml (Sigma).

3.3 PUFRI IN RAZTOPINE

- GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus (Fermentas),
- TAE pufer (pripravljeno na Nacionalnem inštitutu za biologijo),
- 70 % in 96 % etanol (Pharmachem),
- fosfatni pufer za okuževanje z virusom PVY (pripravljeno na Nacionalnem inštitutu za biologijo).

3.4 TESTNI KOMPLETI

- MagMax™ – 96 Total RNA Isolation Kit (Ambion),
- High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (ABI).

3.5 RASTLINSKI MATERIAL

Za poskuse smo uporabili rastline krompirja sorte Désirée v tkivni kulturi (zbirka NIB).
Delali smo s petimi linijami:

- NT (netransgena linija, namenjena za kontrolo),
- GL1 (transgena linija z vstavljenim genom za PI iz glive),
- GL2 (transgena linija z vstavljenim genom za PI iz glive),
- KR1 (transgena linija s prekomerno ekspresijo krompirju lastnega gena za PI) in
- KR2 (transgena linija s prekomerno ekspresijo krompirju lastnega gena za PI) .

Epruvete z rastlinami smo gojili pri naslednjih rastnih pogojih:

- 16 ur osvetlitve z žarnico (Osram L58 W/77),
- 8 ur teme,
- T med osvetlitvijo: 21 ± 1 °C,
- T v temi: 19 ± 1 °C,
- relativna zračna vlažnost: 94 ± 2 %,
- gostota pretoka fotonov: $70 - 90 \mu\text{mol/m}^2\text{s}$.

3.6 VIRUSNI MATERIAL

- Virus PVY^{NTN} (zbirka NIB).

3.7 LABORATORIJSKA OPREMA

- Centrifuga (Eppendorf),
- pipete (Eppendorf),
- epice
- kremenčev pesek - matrix A
- keramične kroglice - matrix A
- naprava za elektroforezo (Uvi-tec),
- brezprašna komora za delo z rastlinami v tkivnih kulturah (Ehret),
- avtoklav (Kambič),
- rastne komore (Kambič),
- termoblok (Kambič),
- spektrofotometer (Nanodrop ND-1000),
- homogenizator (Fast prep),
- pH meter (Mettler Toledo),
- tehtnica (Lotrič),
- hladna soba (Angelnatoni Scientifica),
- sušilnik SP-45 (Kambič),

- King Fisher (Thermo Scientific),
- transiluminator,
- termo cikler GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems)
- aparatura PCR v realnem času ABI Prism®7900Htsequence detection system (Applied Biosystems)

3.8 NAMNOŽEVANJE RASTLINSKEGA MATERIALA

Rastlinski material smo namnoževali v brezprašni komori za delo z rastlinami v tkivnih kulturah. 4 do 5 tednov staro rastlino, ki je imela razvitih približno 6 nodijev smo sterilno povlekli iz steklene epruvete in jo položili na predhodno steriliziran papir. S skalpelom smo rastlini odstranili korenine in liste, ter jo razrezali na izsečke, ki so vsebovali del stebelca z nodijem. Izsečke smo nato vsakega posebej vstavili v svoje sterilno gojišče v stekleni epruveti. Rastline smo gojili v rastni komori (Kambič) 4 do 5 tednov in ponovno namnožili rastlinski material. Večkrat tedensko smo preverjali morebitne okužbe ter okužen material sproti odstranjevali.

3.9 PRIPRAVA RASTLINSKEGA MATERIALA ZA UKORENINJANJE IN SAJENJE

Rastlinski material za ukoreninjanje in sajenje smo namnožili na zgoraj opisan način, nato pa smo po 15 izsečkov vstavili v sterilno gojišče v petrijevkah. Izsečke smo v gojišče vstavljali pod kotom 45°, da so lahko normalno razvili korenine in prve liste. Po 10 do 14 dneh smo izsečke iz gojišča posadili v lončke z zemljo. Vsak izseček smo posadili v svoj lonček z zemljo in ga zalili. Rastline smo gojili v rastni komori.

3.10 TEHTANJE IN SUŠENJE RASTLINSKEGA MATERIALA

Rastlinski material smo ob koncu poskusa stekali in posušili. Tako rastlinam iz tkivnih kultur, kot tudi rastlinam iz zemlje, smo najprej odstranili medij, v katerem so rasle. Korenine smo s skalpelom ločili od poganjkov, jih pod tekočo vodo oprali in posušili s papirnato brisačo. V označene koščke aluminijaste folije smo ločeno zavili korenine in

poganjke vsake rastline. Folije z rastlinskim materialom smo stehali, si zapisali rezultate in material sušili v pečici, 24 ur pri 80 °C. Posušen material smo po sušenju zopet stehali.

3.11 PREUČEVANJE ODPORNOSTI PROTI NaCl

Odpornost rastlin proti NaCl smo testirali v tkivnih kulturah in v zemlji. Oba testa sta vključevala rastline NT, GL1, GL2, KR1 in KR2 linij.

3.11.1 Testiranje v tkivnih kulturah

Na podlagi literature (Tang in sod., 2008; Kharis in sod., 1998; Mohamed in sod., 2010) smo izvedli preliminarne testiranja, ki niso opisana v diplomskem delu. Na ta način smo določili primerne parametre (število rastlin, število tretmajev, koncentracije, način obdelave podatkov, čas trajanja poskusa, starost rastlin ob začetku poskusa, čas sušenja materiala), ki so bili ustrezni za karakterizacijo krompirja sorte Désirée. Za teste v tkivnih kulturah smo od vsake linije potrebovali po 30 rastlin: 10 za rast v normalnem gojišču MS 30, 10 za rast v gojišču MS 30 s 60 mM koncentracijo NaCl in 10 za rast v gojišču MS 30 s 120 mM koncentracijo NaCl. Izsečke rastlin smo postavili v že pripravljeno sterilno slano gojišče. Rast rastlin smo opazovali 5 tednov ter enkrat tedensko izmerili višino poganjkov in prešteli število korenin daljših od 2 cm in število korenin krajših od 2 cm. Korenine so se med rastjo zavijale po dnu epruvete, njihovo dolžino smo ocenjevali kot daljšo ali krajšo od 2 cm, saj natančno merjenje dolžine ni bilo mogoče. Po zadnjem merjenju smo korenine in poganjke ločili, jih stehali, posušili v sušilniku (24 ur, 80 °C) in spet stehali.

3.11.2 Testiranje v zemlji

Tudi za teste v zemlji smo najprej opravili preliminarne testiranja, ki v diplomskem delu niso opisana. Poleg literature (Celebi-Toprak in sod., 2005) so nam pomagala pri določitvi ustreznih parametrov za poskus (število rastlin, število tretmajev, koncentracije, način obdelave podatkov, čas trajanja poskusa, starost rastlin ob začetku poskusa, čas sušenja materiala). Pri testu v zemlji smo v lončke z zemljo posadili po 24 rastlin istih petih linij. 8 rastlin vsake linije je bilo kontrolnih, zalivali smo jih z navadno vodo iz pipe. 8 rastlin smo zalivali z 200 mM raztopino NaCl, 8 pa s 400 mM raztopino NaCl. Raztopine za zalivanje

smo pripravili z vodo iz pipe. Zalivati smo začeli 13 dni stare rastline in jih zalivali vsak drugi dan s 40 ml ustrezne raztopine sobne temperature. Kontrolne rastline smo po potrebi bolj zalivali, volumen vode in pogostost zalivanja smo prilagodili glede na stanje rastlin. Po 15 dneh smo rastlinski material pobrali ter ga na enak način kot pri poskusu v tkivnih kulturah stekali in posušili.

3.12 PREUČEVANJE ODPORNOSTI PROTI SUŠI

Odpornost proti suši smo testirali v zemlji. Vzporedno s preliminarnimi testi za odpornost proti slanosti smo opravili tudi preliminarne teste za odpornost proti suši. Iz literature (Stiller in sodelavci, 2008) in iz dobljenih rezultatov smo lahko določili primerne parametre (trajanje zalivanja, trajanje izpostavitve suši, število rastlin, način in čas sušenja). Za vsako od linij smo potrebovali po 8 rastlin. Kot kontrola so nam služile kontrolne rastline iz testa za proučevanje odpornosti proti NaCl pri poskusu v zemlji. 13 dni stare rastline smo prenehali zalivati. Po 15 dneh suše smo pobrali rastlinski material ter ga na enak način kot pri poskusu v tkivnih kulturah pobrali, stekali in posušili.

3.13 PREUČEVANJE ODPORNOSTI PROTI NIZKIM TEMPERATURAM

Odpornost proti nizkim temperaturam smo testirali v tkivnih kulturah. Najprej smo izvedli preliminarne teste, ki v diplomskem delu niso opisani. V pomoč za pravilno zastavljen poskus nam je bila literatura (Behnam in sodelavci, 2007). Določili smo čas, kritično točko, kjer nizke temperature vplivajo na rast rastlin, vendar ne povzročijo smrti vseh rastlin. Po 10 rastlin vsake linije smo izpostavili mrazu v naslednjem vrstnem redu:

- 2 uri na 4 °C,
- 30 minut na – 20 °C,
- 2 uri na 4 °C,
- sobna temperatura

Po šestih dneh smo stanje rastlin opisali z razredi:

1. razred: rastlina je imela blede rumeno steblo in liste, nekatere rastline so imele pri strani nov poganjek.
2. razred: rastlina je imela blede zeleno steblo, listi so bili rumeni.
3. razred: rastlina je imela zeleno steblo, listi so nekoliko rumeneli ob robu, vendar so bili zeleni.
4. razred: celotna rastlina je bila zelena in nepoškodovana.

3.14 PREUČEVANJE ODPORNOSTI PROTI VIRUSU PVY^{NTN}

Odpornost rastlin proti okužbi z virusom PVY^{NTN} smo testirali na linijah NT, GL1 in GL2, in sicer v zemlji. Namnožili in ukoreninili smo po 25 rastlin vsake linije. Rastline so rasle 4 tedne v rastni komori, nato smo jih okužili z virusom. Za vsako od linij smo potrebovali 25 rastlin: 10 rastlin smo okužili z virusom PVY^{NTN}, 6 rastlin smo slepo okužili in jim dali oznako MOCK (slepo inokulirane rastline), 3 rastline smo okužili z virusom PVY^{NTN} in jih potrebovali samo za opazovanje simptomov, 3 rastline smo slepo okužili (MOCK) in jih prav tako potrebovali za opazovanje simptomov, 3 rastline pa smo pustili intaktne in jih uporabili za kontrolo.

3.14.1 Okuževanje rastlinskega materiala

Rastlinski material smo morali najprej primerno označiti z nalepkami, opremljenimi z vsemi potrebnimi podatki. Na vsaki rastlini smo spodnje tri liste označili z alkoholnim flomastrom in posipali s karburandom. Pripravili smo tudi rastlinski ekstrakt iz okuženih rastlin oz. zdravih rastlin za MOCK. Za povprečno rastlino navadno potrebujemo 0,25 ml inokuluma, ki smo ga pripravili po sledečem protokolu (povzeto po navodilih za inokulacijo s PVY, NIB) (preglednica 2):

Preglednica 2: Priprava inokuluma za okuževanje rastlinskega materiala.

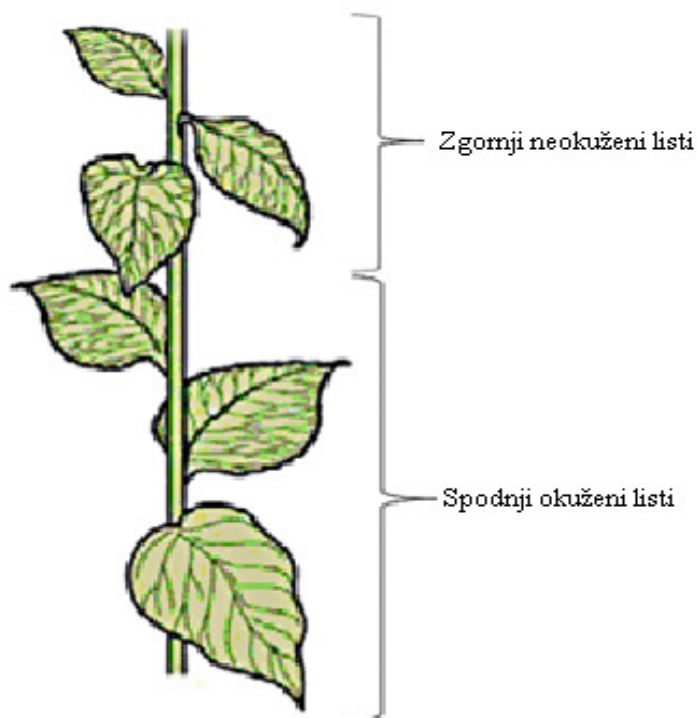
Ime	Sestavina	Količina	Opombe
Raztopini A in B:			
Raztopina A	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	31,2 g	Dodamo H_2O do oznake 1000 ml
Raztopina B	Na_2HPO_4	28,4 g	Dodamo H_2O do oznake 1000 ml
Fosfatni pufer		100 ml	0,02 M; pH 7,6
Raztopina A		1,3 ml	
Raztopina B		8,7 ml	
DIECA		0,225 g	
Inokulum		50 ml	Razmerje 1:5
Rastlinski material		8,3 g	
brez korenin			
Fosfatni pufer		41,7 ml	

Da je okuževanje potekalo tekoče smo okuževanje opravljali štirje. Na 3 predhodno označene in s karburundom posipane spodnje liste smo nanegli rastlinski ekstrakt in ga nežno vtrli v okuževani list. Po 10 minutah smo liste sprali z vodo iz pipe, ob tem pa pazili, da nismo prenašali virusa na zgornje liste in da smo redno menjali rokavice.

3.14.2 Pobiranje rastlinskega materiala

Rastlinski material smo pobirali na treh časovnih točkah, 5 DPI (dnevi po inokulaciji), 7 DPI in 14 DPI, vendar smo v okviru diplomske naloge analizirali le vzorce 7 DPI:

- 5 DPI: pobirali smo prvi spodnji okuženi list in prvi zgornji list, ki ni bil okužen
- 7 DPI: pobirali smo drugi spodnji okuženi list in drugi zgornji list, ki ni bil okužen
- 14 DPI: pobirali smo tretji spodnji okuženi list in tretji zgornji list, ki ni bil okužen



Slika 6: Spodnji okuženi (inokulirani) listi in zgornji (neokuženi) listi.

S skalpelom smo list odrezali od stebela. Če je bil list velik, smo odrezali osrednji del (brez vrha in dela pri peclju), prečno na glavno žilo lista. List ali del lista smo vstavili v epico s kroglico in kremenčevim peskom, ter zamrznili v tekočem dušiku. Do analize smo material hranili v zamrzovalniku, na -80°C . Vedno smo najprej pobrali liste rastlin MOCK in nato še liste rastlin, okuženih s PVY^{NTN}. S 70 % etanolom smo redno razkuževali delovno podlago in menjali rokavice.

3.14.3 Izolacija RNA

Izolacijo smo izvedli s kompletom MagMaxTM – 96 Total RNA Isolation Kit (Ambion) iz rastlinskega materiala, zamrznjenega pri -80 °C po navodilih proizvajalca (preglednica 3):

Preglednica 3: Priprava mešanic Bead Mix, Lysis/Binding Solution in Diluted TURBOTM DNase.

Komponenta	Količina / reakcijo
Bead Mix	
RNA Binding Beads	10 µl
Lysis / Binding Enhancer	10 µl
Lysis / Binding Solution	
Lysis / Binding solution concentrate	270 µl
Plant RNA isolatin AID	30 µl
Diluted TURBOTM DNase	
MagMAX TM TURBO TM DNase Buffer	49 µl
TURBO TM DNase	1 µl

1. V epico, ki je že vsebovala rastlinski vzorec, kroglico in kremenčev pesek, smo dodali 300 µl Lysis/Binding Solution in homogenizirali s homogenizatorjem (FastPrep®-24 Instrument, MP) 40 sekund pri hitrosti 6 m/s.
2. Po homogenizaciji smo vzorec centrifugirali 5 min na sobni temperaturi, pri hitrosti 20 000 g.
3. Pripravili smo si 200 µl ploščice za delo z aparatom King Fischer.
4. V vrsto A smo odpipetirali po 50 µl supernatanta vzorca pripravljenega pod točko 2., 35 µl izopropanola in 20 µl mešanice Bead Mix.
5. V vrsto B smo odpipetirali po 150 µl Wash solution 1.
6. V vrsto C smo odpipetirali po 150 µl Wash solution 2.
7. V vrsto D smo odpipetirali po 50 µl Diluted TURBOTM DNase.
8. V vrsto E smo odpipetirali po 150 µl Wash solution 2.
9. V vrsto F smo odpipetirali po 150 µl Wash solution 2.
10. V vrsto G smo odpipetirali po 50 µl Elution Buffer.

Ploščico z odpipetiranimi reagenti smo postavili v napravo King Fischer, izbrali ustrezen program in pritisnili tipko START:

1. V vrsti A se je RNA vezala na RNA Binding Beads.
2. Skupaj so se prenesli v vrsto B, kjer so se sprali v Wash solution 1.
3. Iz Wash solution 1 so se prenesli v vrsto C, kjer so se sprali v Wash solution 2.
4. Sledila je faza v Diluted TURBOTM DNase v vrsti D, kjer je encim DNaza razgradil DNA.
5. Naprava se je ustavila, ker je bilo potrebno v vrsto D dodati 100 µl re-binding solution, da se je vezala RNA. Pritisnili smo gumb START za dokončanje programa.
6. RNA Binding Beads so se skupaj z RNA prenesli v vrsto E in F, kjer se je RNA sprala z Wash solution 2.
7. RNA vezana na magnetke RNA Binding Beads, se je nato posušila in prenesla v vrsto G, kjer se je raztopila v pufru (Elution Buffer).
8. RNA Binding Beads so se vrnili v vrsto B, izolirana RNA pa se je nahajala v vrsti G.
9. Izolirano RNA smo shranili v zamrzovalniku na -80 °C.

3.14.4 Agarozna gelska elektroforeza

Z agarozno gelsko elektroforezo smo analizirali čistost izolirane RNA. Na folijo smo natehtali 0,6 g agaroze, jo stresli v erlenmajerico in dodali 40 ml pufra TAE. Mešanico smo segrevali do vretja ter vmes večkrat premešali, da se je agaroz popolnoma stopila. Raztopino smo nato nekoliko ohladili (na približno 60°C) in ji dodali 2 µl etidijevega bromida. Še tekoč agarozni gel smo nalili v plastičen model z vstavljenim glavničkom s 15 zobmi, ter počakali da se gel strdi. Ko se je gel strdil, smo odstranili glavniček in v luknjice nanesli naše vzorce. Vzorci so vsebovali 2 µl RNA, 1 µl barvila za nanašanje in 5 µl vode. V 0,5 µl lestvice pa smo dodali 1 µl barvila za nanašanje in 6,5 µl vode. Vse to smo nanesli na gel in pustili 30 minut pri napetosti 100 V in toku 500 mA. Gel smo po končani elektroforezi pogledali pod UV svetlobo v transiluminatorju in ga fotografirali.

3.14.5 Merjenje koncentracije in čistosti RNA

Koncentracijo izolirane RNA v vzorcih smo ocenili spektrofotometrično. Uporabili smo spektrofotometer NanoDrop ND-1000, katerega delovanje temelji na tehnologiji optičnih vlaken. Za določitev koncentracije RNA smo potrebovali 1,5 µl koncentriranega vzorca. Meritve smo izvajali pri valovni dolžini 260 nm, kjer je absorpcija ultravijolične svetlobe pri nukleinskih kislinah najvišja.

3.14.6 Reverzna transkripcija

Za analizo preverjanje ekspresije izolirane RNA smo najprej naredili reverzno transkripcijo RNA v cDNA. Uporabili smo komplet High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (ABI). Reverzno transkripcijo smo izvedli po protokolu:

1. RNA iz -80 °C smo raztopili na ledu, jo kratko vorteksirali in centrifugirali.
2. Odpipetirali smo 1 µg RNA raztopljene v 12,5 µl vode v posamezno jamico na ploščici.
3. RNA smo denaturirali tako, da smo ploščico postavili na 80 °C za 5 min.
4. Nato smo v vsako jamico takoj dodali 12,5 µl mešanice za reverzno transkripcijo, ki je vsebovala:

Preglednica 4: Sestavine mešanice za reverzno transkripcijo.

Komponenta	Količina / Reakcijo (µl)
RT pufer	2,50
Mešanica dNTP	1,00
Naključni primerji	2,50
H ₂ O	4,25
Inhibitor RNA-z	1,00
Reverzna transkriptaza	1,25

5. Po dodatku Master Mix-a smo ploščico zaprli s folijo in kratko centrifugirali.

6. Ploščico smo postavili v termo cikler (GeneAmp PCR 9700), ki je delal po sledečem programu:

- 10 min na 25 °C,
- 2 uri na 37 °C,
- 5 min na 85 °C,
- ohlajanje na 4 °C.

cDNA smo nato do uporabe shranili na -20 °C.

3.14.7 Kvantitativni PCR v realnem času

Število kopij virusne RNA v okuženih rastlinah so raziskovalci NIB-a določili z uporabo kvantitativne verižne reakcije s polimerazo. Za merjenje izražanja genov se najpogosteje uporablja relativna kvantifikacija, s katero določamo razmerje med tarčnim genom (vstavljen gen) in referenčnim genom, ki nam služi kot standard. Pogosto so to vzdrževalni ali hišni geni, v našem primeru smo uporabili gen *Cox* (gen za citokrom oksidazo) (Arko, 2004).

3.15 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV

Za statistično analizo rezultatov vseh testov in preverjanja odpornosti proti okužbi z virusom PVY^{NTN} smo uporabili Studentov t-test. Na grafih so predstavljene povprečne vrednosti in standardne napake ($\bar{x} \pm SE$), * označuje $p \leq 0,05$ (statistično značilna razlika med primerjanimi vzorci).

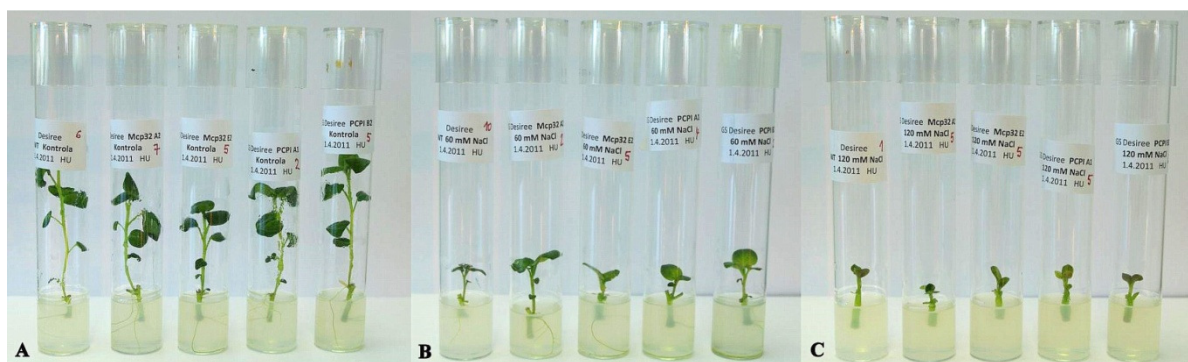
4 REZULTATI

4.1 PREUČEVANJE ODPORNOSTI PROTI NaCl

Najprej smo izvedli preliminarne poskuse, ki so potrdili ustreznost zastavljenega poskusa. Preliminarnih poskusov v diplomskem delu nismo opisali. Sledil je pravi test. Odpornost rastlin na NaCl smo testirali v tkivnih kulturah in v zemlji, in sicer na rastlinah petih linij: NT, GL1, GL2, KR1 in KR2.

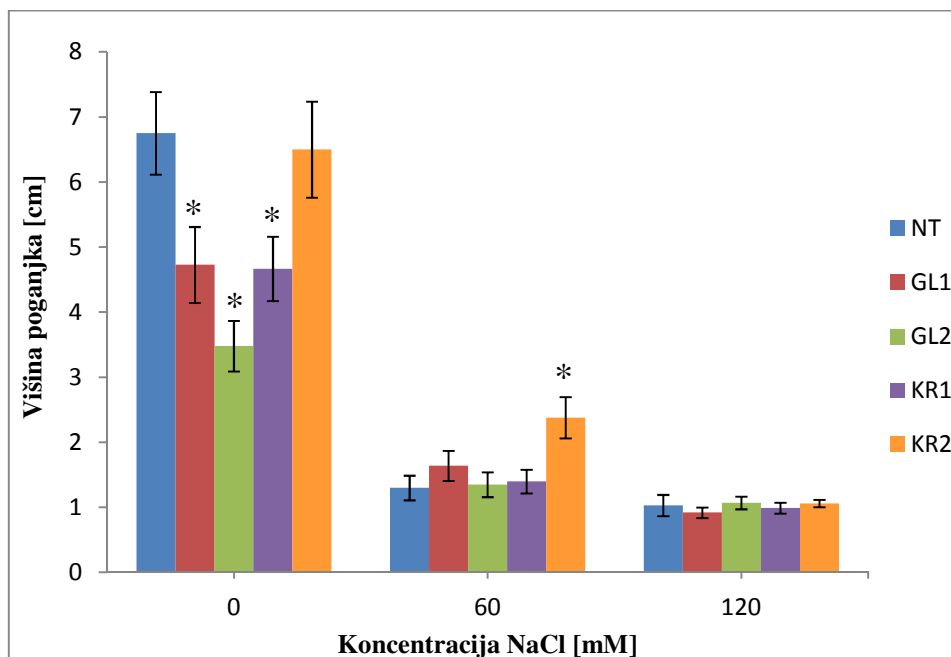
4.1.1 Testiranje v tkivnih kulturah

V testu za preučevanje odpornosti proti NaCl smo v gojišču MS 30 uporabili 0, 60 in 120 mM koncentracije NaCl. Kontrolne rastline (slika 7A) so rasle najboljše in imele tudi največ korenin, medtem ko so rastline v gojišču s 60 mM koncentracijo NaCl (slika 7B) rasle vidno slabše. Rastline v gojišču s 120 mM koncentracijo NaCl (slika 7C) so rasle še nekoliko slabše, vendar razlika ni bila tako velika kot med kontrolnimi rastlinami in tistimi v gojišču s 60 mM koncentracijo NaCl. Med linijami ni bilo videti očitnih razlik.



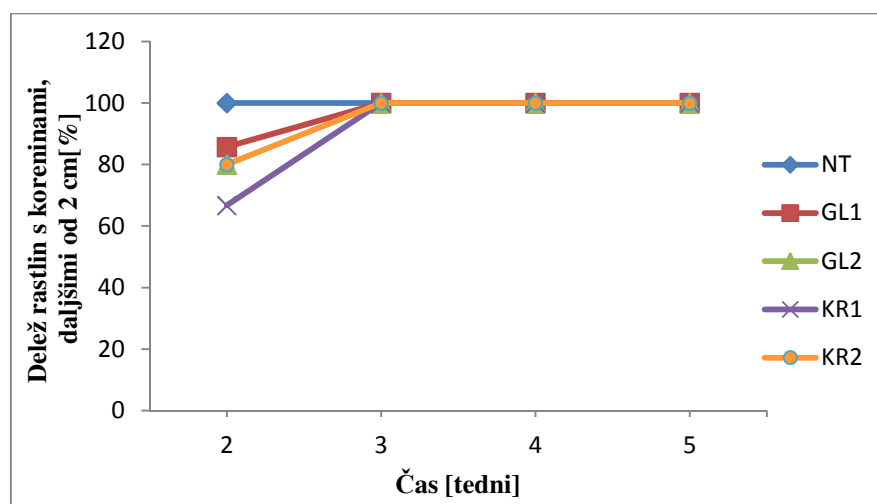
Slika 7: Rastline petih linij v vrstnem redu od leve proti desni, pri poskusu v tkivnih kulturah: NT, GL1, GL2, KR1 in KR2. A: kontrolne rastline v gojišču MS 30. B: rastline v gojišču MS 30 s 60 mM koncentracijo NaCl. C: rastline v gojišču MS 30 s 120 mM koncentracijo NaCl.

Na sliki 8 so prikazane povprečne višine poganjkov v odvisnosti od koncentracije NaCl. Višine smo izmerili ob koncu poskusa, po 5 tednih rasti. Transgene kontrolne rastline so rasle slabše od NT, izjema je bila le linija KR2. V gojišču s 60 mM koncentracijo NaCl je linija KR2 uspevala statistično značilno bolje kot NT. Rastline petih linij v gojišču MS 30 s 120 mM koncentracijo NaCl so se po višini poganjka med sabo le malo razlikovale.

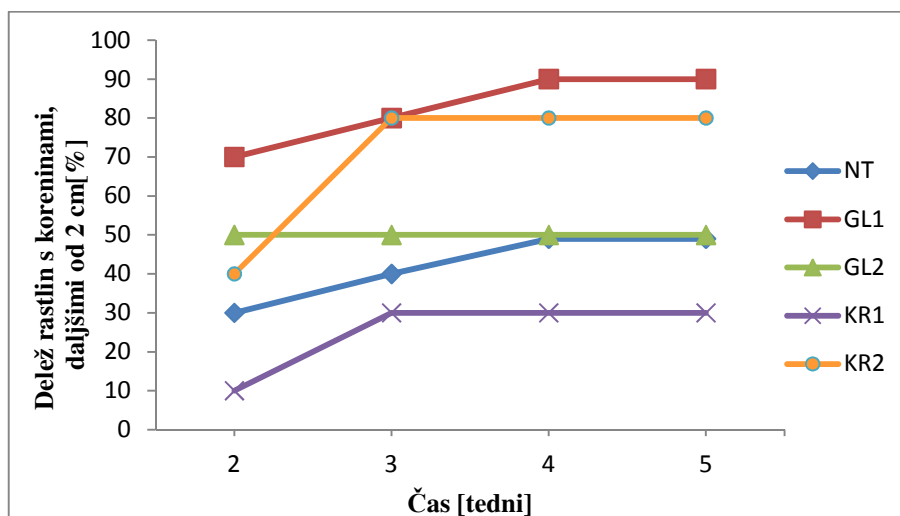


Slika 8: Višina poganjkov v odvisnosti od koncentracije NaCl po 5 tednih rasti. Prikazane so povprečne vrednosti $\pm$ SE ($N_{NT(0,60,120)}$, $N_{GL1(60,120)}$, $N_{GL2(0,60,120)}$, $N_{KR1(60,120)}$, $N_{KR2(0,120)} = 10$; $N_{GL1(0)} = 7$, $N_{KR1(0)} = 9$, $N_{KR2(60)} = 5$). * prikazuje statistično značilno razliko med transgenimi linijami v primerjavi z linijo NT znotraj posamezne koncentracije, testirane s Studentovim t-testom ($p \leq 0,05$).

Dinamika rasti korenin pri rastlinah vseh petih linij v kontrolnih pogojih (slika 9), je bila drugačna od dinamike rasti rastlin, ki so rasle v gojišču s 60 mM koncentracijo NaCl (slika 10). Upoštewane so le korenine daljše od 2 cm. V gojišču s 120 mM koncentracijo NaCl korenine niso rasle. Rastline vseh petih linij na kontrolnem gojišču MS 30 so po treh tednih rasti dosegle končno število korenin in se torej med seboj ne razlikujejo v dinamiki rasti korenin. Pri rastlinah v gojišču s 60 mM koncentracijo NaCl pa so se pojavile razlike v dinamiki rasti korenin. Pri vseh transgenih linijah, razen pri liniji KR1, je bila rast korenin enakovredna ali boljša, kot pri liniji NT. Izstopali sta liniji GL1 in KR2, vendar statistično značilnih razlik ni bilo.

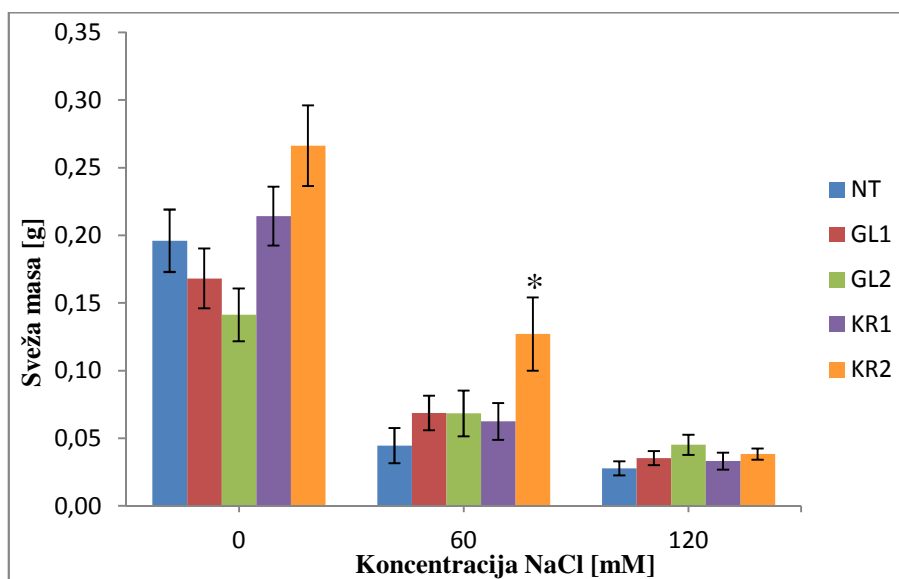


Slika 9: Delež rastlin s koreninami, daljšimi od 2 cm v kontrolnem gojišču MS 30. Prikazani so deleži, izračunani iz končnih povprečij $\pm$ SE ($N_{NT} = 10$, $N_{GL1} = 7$, $N_{GL2} = 10$, $N_{KR1} = 9$, $N_{KR2} = 10$). * prikazuje statistično značilno razliko med transgenimi linijami v primerjavi z linijo NT znotraj posamezne koncentracije, testirane s Studentovim t-testom ($p \leq 0,05$). Zaradi boljše preglednosti SE niso prikazane.

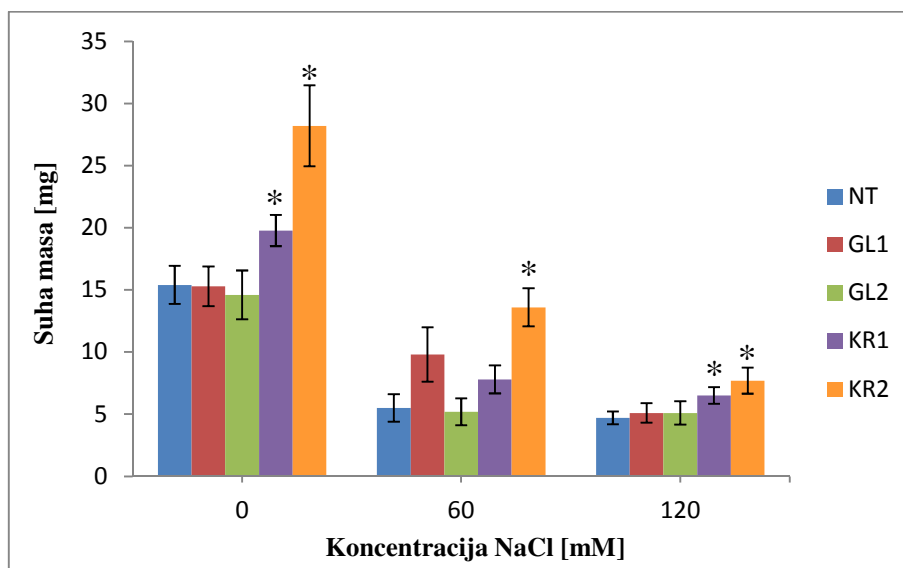


Slika 10: Delež rastlin s koreninami, daljšimi od 2 cm v gojišču s 60 mM koncentracijo NaCl. Prikazani so deleži, izračunani iz končnih povprečij $\pm$ SE ($N_{NT} = 10$, $N_{GL1} = 10$, $N_{GL2} = 10$, $N_{KR2} = 10$, $N_{KR1} = 5$). * prikazuje statistično značilno razliko med transgenimi linijami v primerjavi z linijo NT znotraj posamezne koncentracije, testirane s Studentovim t-testom ($p \leq 0,05$). Zaradi boljše preglednosti SE niso prikazane.

Na slikah 11 in 12 je prikazana povprečna masa svežih in suhih poganjkov v odvisnosti od koncentracije NaCl v gojišču. Tako pri 60 kot tudi pri 120 mM koncentraciji NaCl v gojišču velja, da so vse transgene linije dosegle enako ali višjo povprečno maso kot NT. Statistično značilno težje od NT so bile le sveže rastline linije KR2 v gojišču z dodanim 60 mM NaCl. Prav tako so bili statistično značilno težji od NT suhi poganjki linije KR2 v obeh gojiščih s soljo ter poganjki linije KR1 v 120 mM NaCl (slika 12).



Slika 11: Masa svežih poganjkov v odvisnosti od koncentracije NaCl po 5 tednih rasti, pri poskusu v tkivnih kulturah. Prikazane so povprečne vrednosti $\pm$ SE ($N_{NT(0,60,120)}$, $N_{GL1(60,120)}$, $N_{GL2(0,60,120)}$, $N_{KR1(60,120)}$, $N_{KR2(0,120)} = 10$; $N_{GL1(0)} = 7$, $N_{KR1(0)} = 9$, $N_{KR2(60)} = 5$). * prikazuje statistično značilno razliko med transgenimi linijami v primerjavi z linijo NT znotraj posamezne koncentracije, testirane s Studentovim t-testom ($p \leq 0,05$).

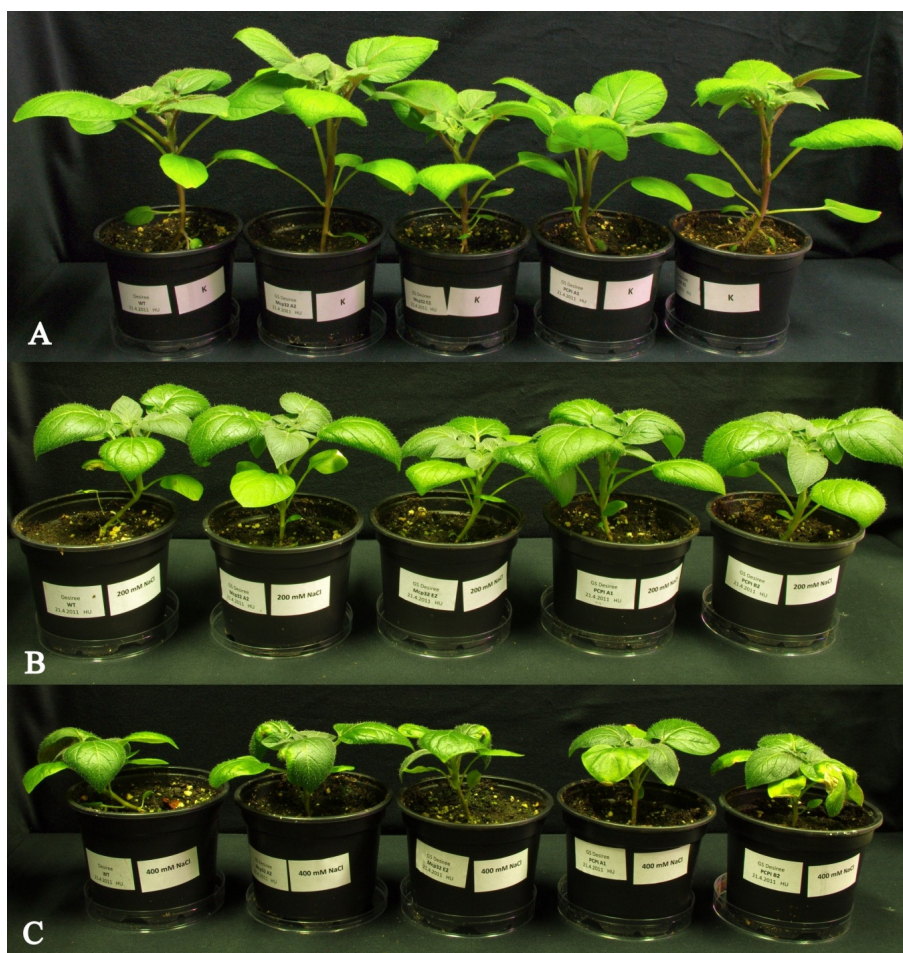


Slika 12: Masa suhih poganjkov v odvisnosti od koncentracije NaCl po 5 tednih rasti, pri poskusu v tkivnih kulturah. Prikazane so povprečne vrednosti $\pm$ SE ($N_{NT(0,60,120)}$, $N_{GL1(60,120)}$, $N_{GL2(0,60,120)}$, $N_{KR1(60,120)}$, $N_{KR2(0,120)} = 10$; $N_{GL1(0)} = 7$, $N_{KR1(0)} = 9$, $N_{KR2(60)} = 5$). * prikazuje statistično značilno razliko med transgenimi linijami v primerjavi z linijo NT znotraj posamezne koncentracije, testirane s Studentovim t-testom ($p \leq 0,05$).

Rezultati svežih in suhih mas korenin v odvisnosti od NaCl po 5 tednih rasti, pri poskusu v tkivnih kulturah, v diplomskem delu niso prikazani zaradi nizkih mas in posledično nepreglednih grafov.

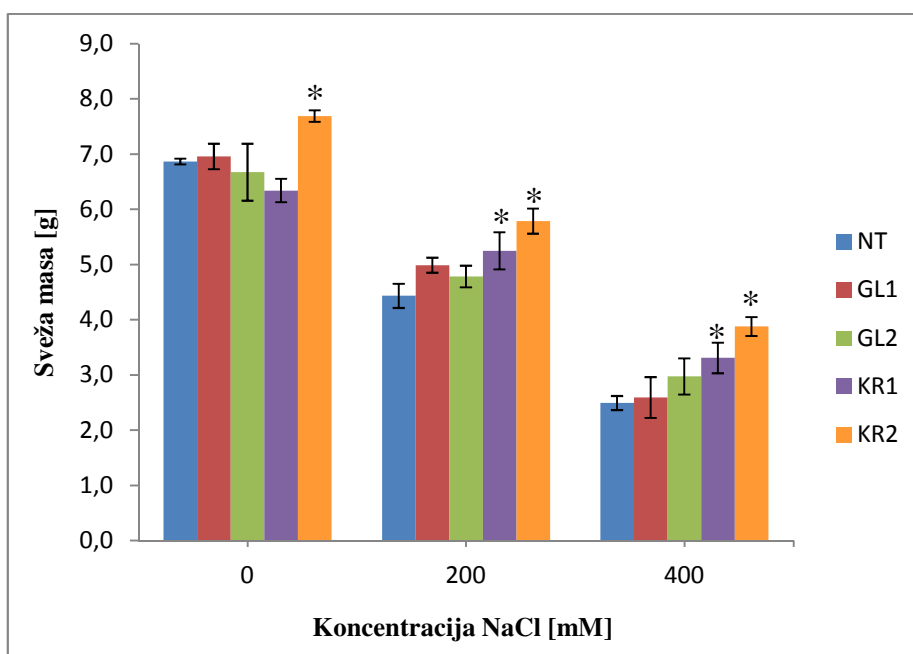
4.1.2 Testiranje v zemlji

Pri preučevanju odpornosti rastlin proti NaCl v zemlji smo uporabili raztopine 200 in 400 mM koncentracije NaCl. Obe koncentraciji sta vplivali na rast rastlin. Rastline, zalivane z raztopino 200 mM koncentracije NaCl (slika 13B), so bile manjše od rastlin, zalivanih z vodo iz pipe (slika 13A), robovi listov so se vihali navzdol. Še manjše so bile rastline, ki smo jih zalivali s 400 mM koncentracijo NaCl (slika 13C). Njihovi listi so se še bolj vihali navzdol, bili so zgubani in pojavljale so se lezije. Za razliko od rastlin, ki so rastle brez dodane soli v zemlji, so bili listi rastlin tretiranih z 200 in 400 mM koncentracijo NaCl opazno temnejši in bolj bleščeči. Med linijami ni bilo vidnih razlik.

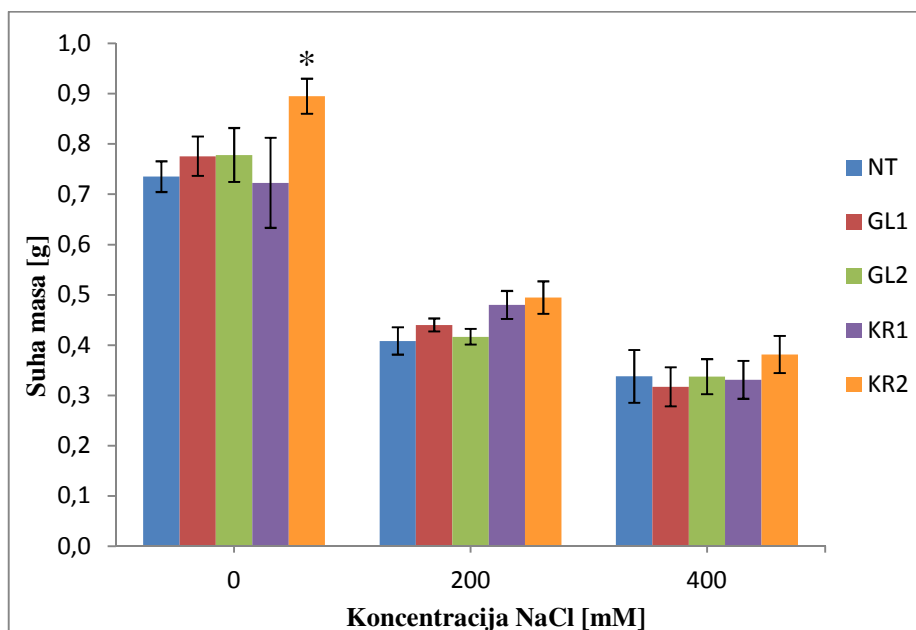


Slika 13: Rastline petih linij v vrstnem redu od leve proti desni, pri poskusu v zemlji: NT, GL1, GL2, KR1 in KR2. A: kontrolne rastline, ki smo jih zalivali z vodo iz pipe. B: rastline zalivane z vodno raztopino 200 mM koncentracije NaCl. C: rastline, ki smo jih zalivali z vodno raztopino 400 mM koncentracije NaCl.

Sliki 14 in 15 prikazujeta povprečne mase svežih in suhih poganjkov v odvisnosti od koncentracije NaCl. Vidimo, da so bile vse transgene linije zalivane z 200 in 400 mM koncentracijo NaCl vsaj tako uspešne kot NT. Linija KR2 je bila uspešnejša od NT že kot kontrola. Tako sveže kot tudi suhe mase rastlin linije KR2 so bile najvišje in s tem je ta transgena linija najuspešnejša. Izstopa tudi linija KR1, ki je kot kontrola rasla najslabše, po zalivanju z 200 in 400 mM koncentracijo NaCl pa je po masi sledila liniji KR2. S primerjavo slik 14 in 15 opazimo, da se razlike med linijami pri povprečnih masah svežih poganjkov v grobem ohranjajo in ponovijo pri povprečnih masah suhih poganjkov.



Slika 14: Masa svežih poganjkov v odvisnosti od koncentracije NaCl po 5 tednih rasti, pri poskusu v zemlji. Prikazane so povprečne vrednosti $\pm$ SE ($N_{NT(0,200,400)}$, $GL1(0,200,400)$, $GL2(0,200,400)$, $KR1(0,200,400)$, $KR2(0,200,400) = 5$). * prikazuje statistično značilno razliko med transgenimi linijami v primerjavi z linijo NT znotraj posamezne koncentracije, testirane s Studentovim t-testom ($p \leq 0,05$).



Slika 15: Masa suhih poganjkov v odvisnosti od koncentracije NaCl po 5 tednih rasti, pri poskusu v zemlji. Prikazane so povprečne vrednosti $\pm$ SE ($N_{NT(0,200,400)}$, $GL1(0,200,400)$, $GL2(0,200,400)$, $KR1(0,200,400)$, $KR2(0,200,400)$ = 5). * prikazuje statistično značilno razliko med transgenimi linijami v primerjavi z linijo NT znotraj posamezne koncentracije, testirane s Studentovim t-testom ($p \leq 0,05$).

Rezultati svežih in suhih mas korenin v odvisnosti od NaCl po 5 tednih rasti, pri poskusu v zemlji, v diplomskem delu niso prikazani zaradi nizkih mas in posledično nepreglednih grafov.

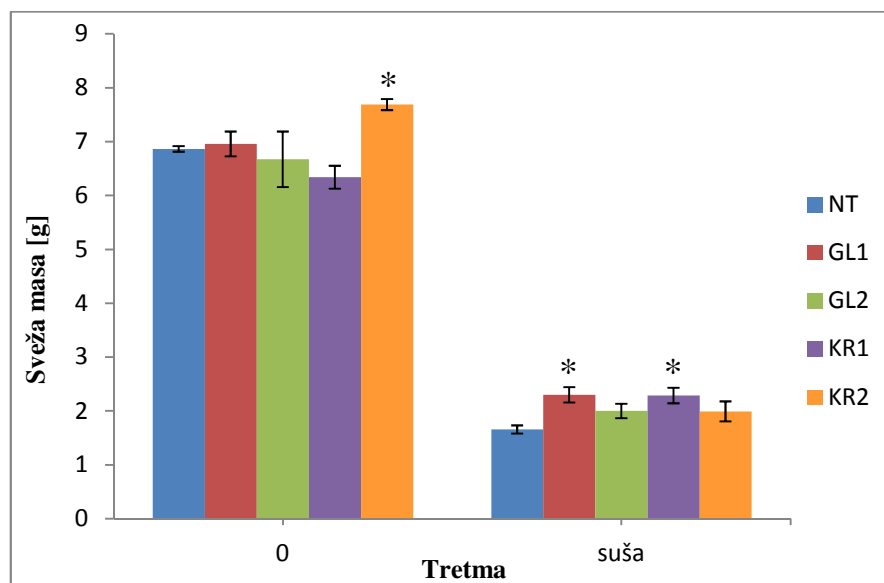
4.2 PREUČEVANJE ODPORNOSTI PROTI SUŠI

Rastline izpostavljene suši so bile vidno ovenele. Zemlja je bila suha in lončki z rastlinami lažji od kontrolnih. Steblo je sicer še stalo pokonci, vendar so bili listi povešeni in mlahavi (slika 16).

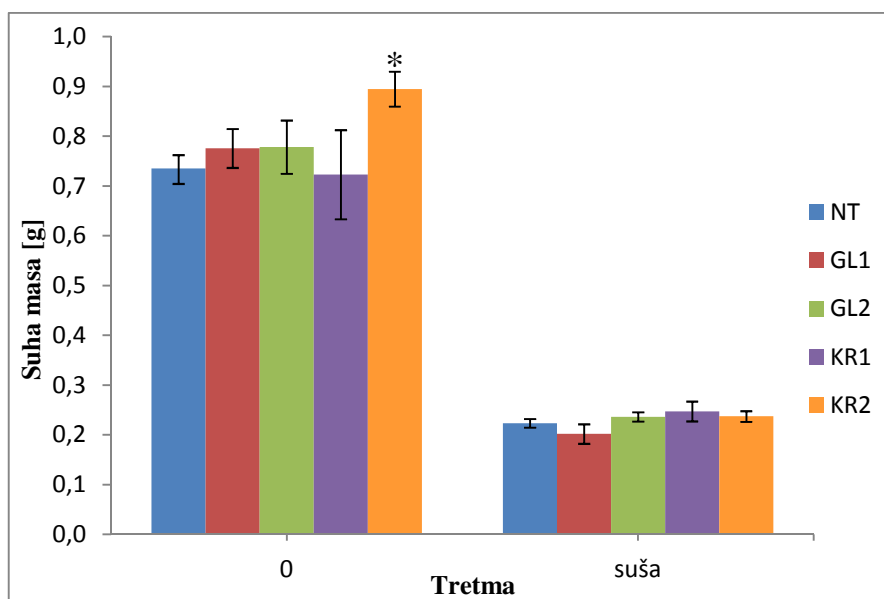


Slika 16: Rastline petih linij v vrstnem redu od leve proti desni, pri poskusu v zemlji: NT, GL1, GL2, KR1 in KR2. A: kontrolne rastline, ki smo jih zalivali z vodo iz pipe. B: rastline izpostavljene suši.

V kontrolnih pogojih je najbolje rastla linija KR2, vendar pa se po tretiranju s sušo ni izkazala za najboljšo. Zanimiva je linija KR1, katere kontrolne rastline so bile najslabše, po izpostavitvi suši pa je prav ta linija dosegla najvišjo maso (tako svežo kot suho). Dobro se je izkazala tudi linija GL1, katere sveži poganjki so bili težji kot pri linij NT. Po sušenju pa so se poganjki linije GL1 izkazali za najlažje (sliki 17, 18).



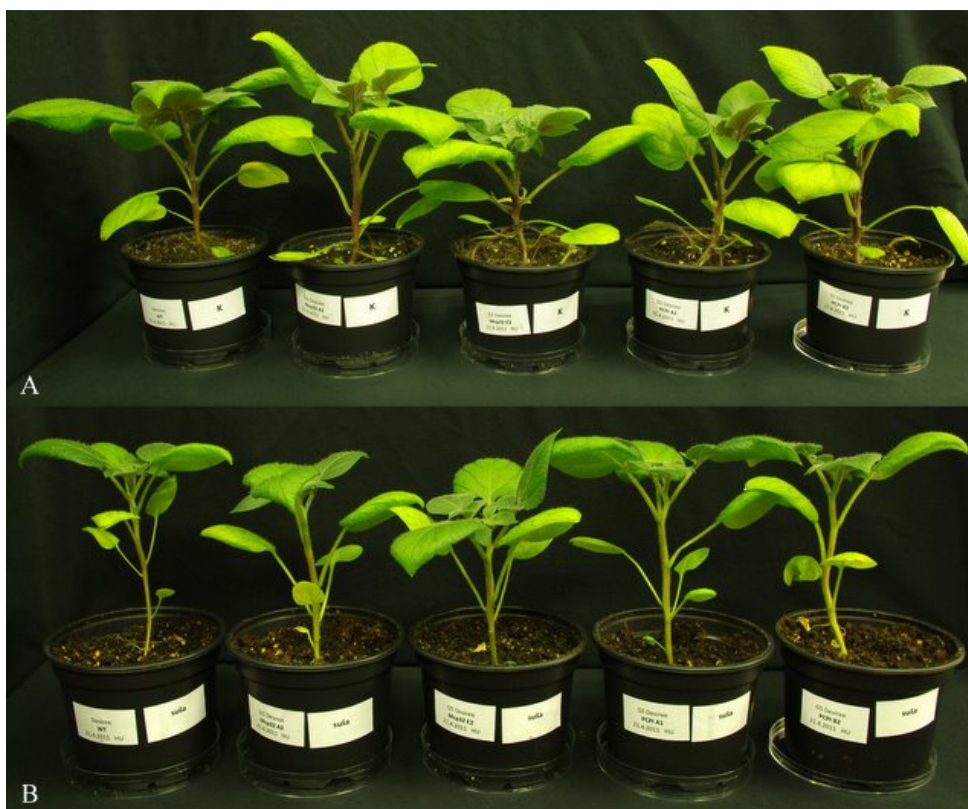
Slika 17: Masa svežih poganjkov v odvisnosti od suše. Prikazane so povprečne vrednosti $\pm$ SE ($N_{NT(0,suša)}, GL1(0,suša), GL2(0,suša), KR1(0,suša), KR2(0,suša) = 5$). * prikazuje statistično značilno razliko med transgenimi linijami v primerjavi z linijo NT znotraj posameznega tretmaja, testiranimi s Studentovim t-testom ($p \leq 0,05$).



Slika 18: Masa suhih poganjkov v odvisnosti od suše. Prikazane so povprečne vrednosti $\pm$ SE ($N_{NT(0,suša)}, GL1(0,suša), GL2(0,suša), KR1(0,suša), KR2(0,suša) = 5$). * prikazuje statistično značilno razliko med transgenimi linijami v primerjavi z linijo NT znotraj posameznega tretmaja, testiranimi s Studentovim t-testom ($p \leq 0,05$).

Rezultati svežih in suhih mas korenin v odvisnosti od suše, pri poskusu v zemlji, v diplomskem delu niso prikazani zaradi nizkih mas in posledično nepreglednih grafov.

Zanimalo nas je, ali so rastline sposobne regeneracije, če jih po 15 dneh zalijemo. Po 3 rastline vsake od 5 linij smo postopoma zalili s skupno 200 ml vode. Po treh dneh so se vse rastline popolnoma regenerirale (slika 19).



Slika 19: Rastline petih linij v vrstnem redu od leve proti desni, pri poskusu v zemlji: NT, GL1, GL2, KR1 in KR2. A: kontrolne rastline, ki smo jih zalivali z vodo iz pipe. B: rastline izpostavljene suši ter nato zalite.

4.3 PREUČEVANJE ODPORNOSTI PROTI NIZKIM TEMPERATURAM

Odpornost proti nizkim temperaturam smo testirali z rastlinami v tkivnih kulturah (slika 20).



Slika 20: Rastline petih linij v vrstnem redu od leve proti desni: NT, GL1, GL2, KR1 in KR2, pred testom za preučevanje odpornosti proti nizkim temperaturam.

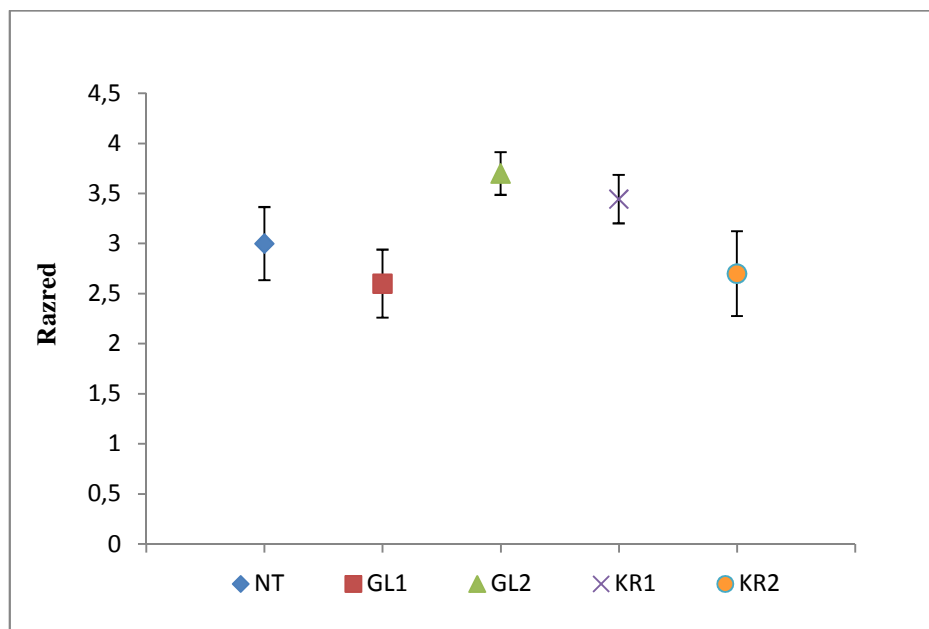
10 rastlin vsake od petih linij smo izpostavili mrazu. Po šestih dneh smo stanje rastlin opisali z razredi (slika 21):

1. razred: rastlina je imela blede rumeno steblo in liste, nekatere rastline so imele pri strani nov poganjek.
2. razred: rastlina je imela blede zeleno steblo, listi so bili rumeni.
3. razred: rastlina je imela zeleno steblo, listi so nekoliko rumeneli ob robu, vendar so bili zeleni.
4. razred: celotna rastlina je bila zelena in nepoškodovana.



Slika 21: Reprezentativne rastline razredov. Modre številke na nalepkah predstavljajo razrede 1 do 4.

Mraz je najmanj vplival na linijo GL2, pri kateri je številčno največ rastlin spadalo v 4. razred. Vseeno pa statistično značilnih razlik med linijami nismo opazili (slika 22).



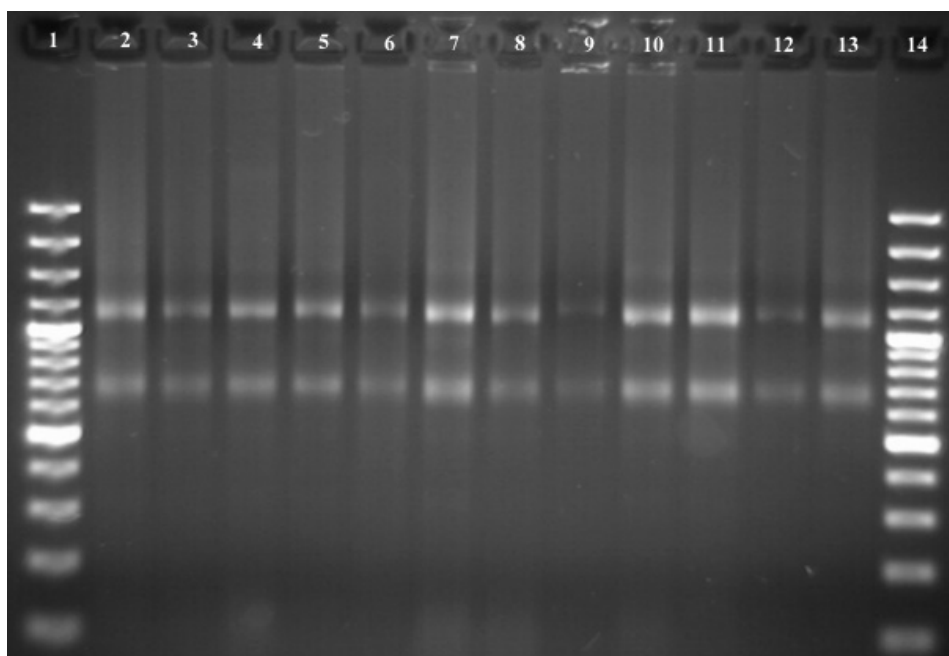
Slika 22: Stanje mrazu izpostavljenih rastlin po 6 dneh rasti. Prikazane so povprečne vrednosti $\pm$ SE ($N_{NT, GL1, GL2, KR1, KR2} = 10$). * prikazuje statistično značilno razliko med transgenimi linijami v primerjavi z linijo NT, testiranimi s Studentovim t-testom ($p \leq 0,05$).

4.4 PREUČEVANJE ODPORNOSTI PROTI VIRUSU PVY^{NTN}

Za analizo prisotnosti virusa PVY^{NTN} smo uporabili rastlinski material, pobran 7 dni po inokulaciji (7 DPI).

4.4.1 Izolacija in potrditev izolirane RNA

S kompletom MagMaxTM – 96 Total RNA Isolation Kit (Ambion) smo izolirali RNA iz rastlinskega materiala. Z elektroforezo smo preverili učinkovitost izolacije in morebitno kontaminacijo z gensko DNA. Rezultati na agaroznem gelu so pokazali, da smo iz vseh vzorcev uspešno izolirali RNA, ter da na gelu ni nikjer prisotne genske DNA (slika 23).



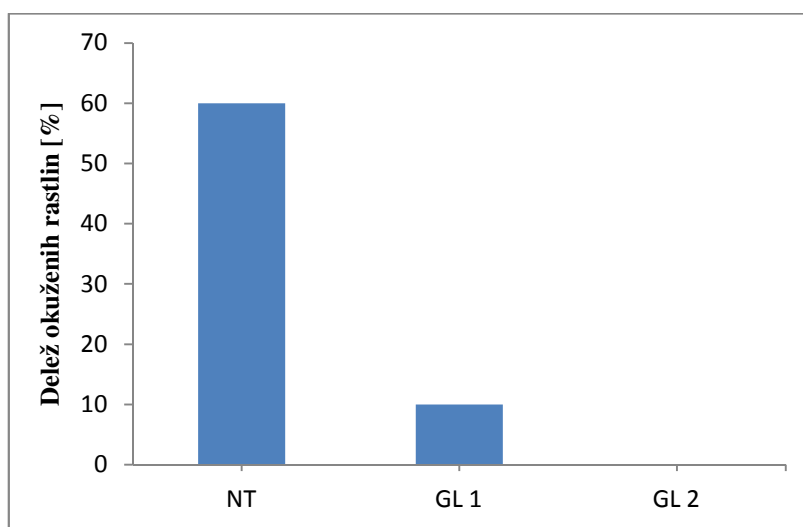
Slika 23: Potrditev izolirane RNA iz nekaterih vzorcev z elektroforezo. **1** in **14** GeneRulerTM 100bp DNA Ladder Plus lestvica. **2-13** Izolirana RNA iz 12 vzorcev.

4.4.2 Kvantifikacija celokupne RNA

Pred reverzno transkripcijo smo izmerili količino RNA in določili čistost RNA v nekaterih vzorcih. Celokupno koncentracijo RNA smo potrebovali za oceno, koliko izolirane RNA naj damo v reakcijo za reverzno transkripcijo. Poleg celokupne koncentracije smo preverili še razmerja absorbanc pri valovnih dolžinah 260/280 in 260/230 nm. Razmerje 260/280 nam pove, če je v vzorcu prisotna kontaminacija s proteini, medtem ko razmerje absorbanc 260/230 prikazuje vsebnost drugih nečistoč v vzorcu. Obe razmerji naj bi bili večji od 1,8, kar pomeni, da je vzorec primerno čist. Rezultati meritve s spektrofotometrom Nanodrop so pokazali, da je bila čistost RNA zadovoljiva in domnevali smo, da je bila kljub nekaterim nečistočam primerna za nadaljnje poskuse.

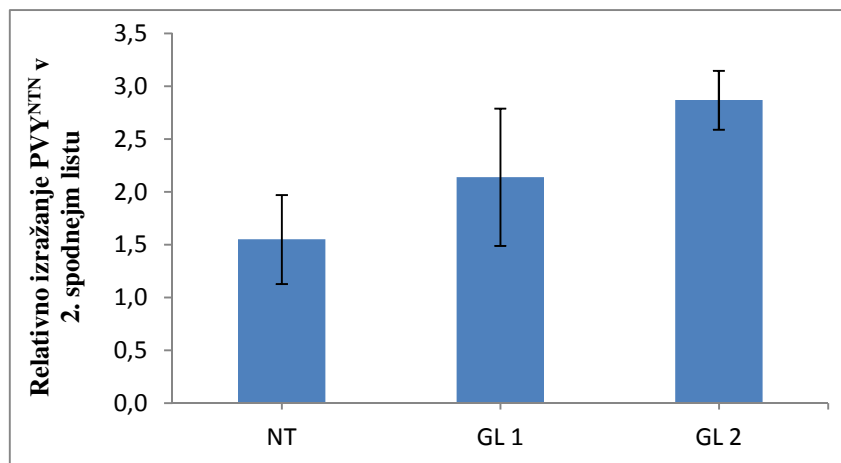
4.4.3 Rezultati PCR v realnem času

Pri vzorcih okuženih rastlin pobranih 7 DPI smo ugotovili, da se je virusna RNA razširila v 2. zgornji list pri 60 % rastlin NT in le pri 10 % rastlin linije GL1 oz. pri nobeni izmed rastlin linije GL2. Virus se je torej po rastlini razširil hitreje pri gensko nespremenjenem krompirju (slika 24).



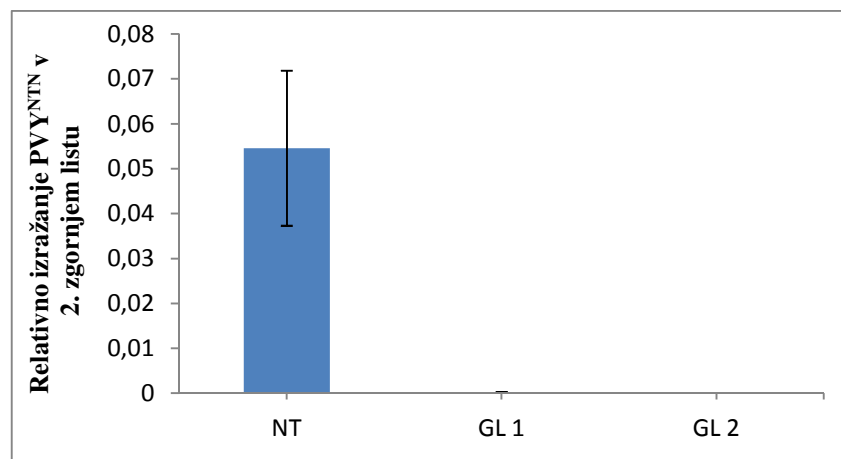
Slika 24: Delež okuženih rastlin posamezne linije, pri kateri se je virus v 7 dneh razširil do zgornjih listov.

Relativno izražanje virusa PVY^{NTN} glede na hišni gen *Cox* v 2. spodnjem (okuženem) listu se med testiranimi linijami ni razlikovalo statistično značilno. Virus se je pomnoževal v vseh okuženih listih (slika 25).



Slika 25: Relativno izražanje virusa PVY^{NTN} glede na hišni gen *Cox* v 2. spodnjem (okuženem) listu. Prikazane so povprečne vrednosti $\pm$ SE ($N_{NT} = 8$, $N_{GL1} = 5$, $N_{GL2} = 5$). * prikazuje statistično značilno razliko med transgenimi linijami v primerjavi z linijo NT, testiranimi s Studentovim t-testom ($p \leq 0,05$).

Relativno izražanje virusa PVY^{NTN} glede na hišni gen *Cox* v 2. zgornjem (neokuženem) listu se je med testiranimi linijami razlikovalo. Virusna RNA se je v veliko večji meri izražala pri rastlinah NT (slika 26).



Slika 26: Relativno izražanje virusa PVY^{NTN} glede na hišni gen *Cox* v 2. zgornjem (neokuženem) listu. Prikazane so povprečne vrednosti $\pm$ SE ($N_{NT} = 8$, $N_{GL1} = 5$, $N_{GL2} = 5$). * prikazuje statistično značilno razliko med transgenimi linijami v primerjavi z linijo NT, testiranimi s Studentovim t-testom ($p \leq 0,05$).

Razmerje virusne RNA med zgornjimi in spodnjimi listi se je med testiranimi linijami razlikovalo. Pri rastlinah NT se je virusna RNA glede na spodnje liste izražala približno 50-krat manj, pri liniji GL1 približno 30.000-krat manj, pri liniji GL2 pa se v zgornjih listih sploh ni izražala (preglednica 5). Iz rezultatov izražanja virusne RNA 7 DPI v drugih spodnjih (okuženih) in drugih zgornjih (neokuženih) listih pri testiranih linijah lahko povzamemo, da se v gensko spremenjenih linijah virus razširja počasneje. Da se v okuženih listih virus tudi manj namnožuje, pa glede na dobljene rezultate, ne moremo trditi. Izražanje transgena torej vpliva na sistem širjenja virusa po rastlini.

Preglednica 5: Relativno izražanje PVY^{NTN} v 2. spodnjem in 2. zgornjem listu ter njuno razmerje.

Linija	NT	GL1	GL2
Relativno izražanje PVY ^{NTN} v 2. spodnjem listu	1,55	2,14	2,87
Relativno izražanje PVY ^{NTN} v 2. zgornjem listu	$2,98 \times 10^{-2}$	$6,67 \times 10^{-5}$	0
Razmerje relativnega izražanja virusne RNA med spodnjim in zgornjim listom	52,01	32083,96	/

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Krompir je po produkciji ena najosnovnejših poljščin. Ni pomemben samo kot vir hrane, ampak tudi kot surovina v škrobni predelovalni industriji. Njegova visoka hranilna vrednost in enostavnost proizvodnje sta razloga za svetovno razširjenost (Behnam in sod, 2007; Tang in sod., 2008). Sorta Désirée se najpogosteje uporablja kot jedilni krompir, za predelavo pa je manj primerna (Sluga, 1994). V *in vitro* sistemih je sorta zelo odzivna in zato primerna za transformacije (Beaujean in sod., 1998).

Rastline so lahko v svojem življenju izpostavljene marsikateremu stresnemu dejavniku, bodisi abiotskemu bodisi biotskemu. Pogosto deluje nanje več dejavnikov, ki so med seboj tesno povezani, zato je tudi odgovor rastlin podoben. Na podlagi podatkov iz literature smo spoznali, da čezmerno izražanje različnih proteaznih inhibitorjev lahko poveča odpornost proti abiotskim in biotskim stresnim dejavnikom. Namen našega dela je bila vzpostavitev sistema za testiranje rastlin na sušo, slanost in nizke temperature. Uporabili smo štiri transgene linije krompirja sorte Désirée s povečano ekspresijo dveh izbranih proteaznih inhibitorjev in dve liniji testirali tudi na odpornost proti virusu PVY^{NTN} kot biotskemu stresnemu dejavniku.

V poskusih smo uporabili 5 linij krompirja sorte Désirée iz zbirke Nacionalnega inštituta za biologijo. Liniji KR1 in KR2 imata povečano ekspresijo krompirju lastnega gena za proteazni inhibitor. Liniji GL1 in GL2 pa imata vstavljen gen za proteazni inhibitor, ki izvira iz glive in ima insekticidno aktivnost. El-Bana in sod. (2010) so s povečano ekspresijo krompirju lastnega proteina PR-10a dokazali, da se takšen gensko spremenjen krompir bolje odziva na abiotski stres, in sicer bolje tolerira povečano slanost v okolju in osmotski stres. Proteinu PR-10a je podoben protein, ki se izraža pri linijah KR1 in KR2. Primarna funkcija proteina, ki se izraža v linijah GL1 in GL2 je še nepoznana, na podlagi biokemijskih lastnosti pa smo sklepali na to, da lahko vpliva na spremenjen odgovor na abiotske stresne dejavnike in okužbo z virusom PVY^{NTN}.

Abiotske stresne dejavnike smo najprej testirali s serijami preliminarnih poskusov, ki v diplomski nalogi niso opisani. Z njimi smo uspeli izbrati takšno kombinacijo testnih pogojev, pri katerih so se netretirane in tretirane rastline med seboj že vizualno razlikovale. Štiri transgene linije krompirja sorte Désirée smo v poskusih primerjali z rastlinami netransformirane linije (NT).

Rastline vseh petih linij smo testirali na odpornost proti različnim koncentracijam NaCl. Toleranco rastlin na slanost običajno ocenjujemo s primerjavo proizvedene biomase v slanih in normalnih pogojih v določeni časovni periodi (Munns, 2002). Poskus smo izvedli v tkivnih kulturah, kjer so bile testne koncentracije povzete po Kharis in sod. (1998). Rastline različnih sort krompirja so testirali pri 0, 40, 80 in 120 mM koncentraciji NaCl. Po preliminarnih poskusih smo se odločili, da bomo uporabili koncentracije 0, 60 in 120 mM. Tako kot Kharis in sod. (1998) smo merili mase poganjkov in korenin pred in po sušenju, nismo pa uporabili razdelitve po razredih. Podobno kot Tang in sod. (2008) smo merili še dolžine poganjkov in korenin.

Ugotovili smo, da je pri 60 mM koncentraciji NaCl linija KR2, ki izraža krompirju lasten PI, rasla statistično značilno bolje kot rastline NT. Med ostalimi rastlinami ni bilo razlik, kar velja tudi za 120 mM koncentracijo soli, kjer smo v splošnem opazili nižji nivo rasti. Slabo rast pri 120 mM koncentraciji NaCl so potrdili tudi Kharis in sod. (1998), ki so testirali 130 sort krompirja. Kar 75 % sort je bilo slabo tolerantnih na 120 mM koncentracijo NaCl, kar je verjetno posledica strupenosti. Koncentracija Na⁺, višja od 100 mM, je za nekatere encime potencialno škodljiva. Celice propadejo zaradi zastrupitve ali dehidracije (Munns, 2002). Kljub temu, da so tri linije (GL1, GL2 in KR1) že v kontrolnih pogojih rasle statistično značilno slabše od NT, pa so pri 60 mM NaCl rasle vsaj tako uspešno kot NT. Sklepamo lahko, da niso manj odporne na sol kot NT. Podobne rezultate smo dobili tudi po analizi podatkov o masah poganjkov pred in po sušenju. Pri 60 mM koncentraciji se je sveža masa linije KR2 statistično značilno razlikovala od NT, med ostalimi linijami pa razlik ni bilo pri nobeni od testiranih koncentracij. Po sušenju se je uspešnost linije KR2 ponovila, statistično značilno boljši od NT pa sta bili liniji KR1 in KR2 tudi pri 0 in 120 mM koncentraciji NaCl v gojišču. Toleranco na rast v slanem

gojišču smo ocenjevali tudi z deležem korenin, daljših od 2 cm. Rezultati so potrdili uspešnost linij GL1 in KR2, ki najhitreje dosežeta največji delež korenin, daljših od 2 cm. Transgena linija KR2 se je torej v več merjenih parametrih izkazala za statistično značilno boljšo in s tem domnevno bolj tolerantno na NaCl kot linija NT. Opazili smo, da 120 mM koncentracija NaCl negativno vpliva na rast korenin, saj jih ni pognala prav nobena rastlina tretirana s to koncentracijo soli.

Toleranco na slanost smo testirali tudi s fiziološkim testom v zemlji. Po koncu poskusa smo izmerili svežo in suho maso poganjkov in korenin. Rastline smo zalivali z različnimi koncentracijami raztopine soli (0, 200, 400 mM NaCl), ki smo jih določili s pomočjo preliminarnih poskusov. Čeprav dejanske koncentracije soli v zemlji nismo določili in je ta bila verjetno drugačna kot pri poskusu v tkivnih kulturah, smo opazili nekaj podobnosti s poskusom v tkivnih kulturah. Povečevanje koncentracije soli v mediju je negativno vplivalo na rast tako transgenih kot netransgenih rastlin. Glede na sveže mase poganjkov smo ugotovili, da so bile linije krompirja pri 200 in 400 mM raztopinah soli med sabo dokaj podobne. Enako lahko trdimo za suhe mase poganjkov, tudi vizualnih razlik med linijami ni bilo. Vizualne razlike smo opazili zgolj med različnimi tretmaji. Podobno kot pri poskusu v tkivnih kulturah je bila tudi v poskusu v zemlji opazna večja uspešnost istih dveh linij. KR2 je bila sicer boljša že pri 0 mM NaCl, obe (KR1 in KR2) pa sta bili statistično značilno težji pri 200 in 400 mM NaCl. Suhi poganjki kažejo, da je linija KR2 edina statistično značilno težja, in sicer le pri 0 mM koncentraciji soli. Višja koncentracija NaCl v vodni raztopini je bila vzrok za manjše rastline z manjšim številom listov. Internodiji rastlin, zalivanih z 200 mM koncentracijo soli, so bili krajši kot pri kontrolnih rastlinah, še krajši so bili pa internodiji rastlin, zalivanih s 400 mM koncentracijo. Prav tako so imele rastline manj listov od kontrolnih in ti so bili temnejši. Starejši listi so postali nekoliko rumenkasti in začeli so propadati, vsem pa je bilo skupno gubanje listnih robov navzdol. Omenjene simptome za stres zaradi zasoljenosti navaja tudi Munns (2002). Poškodbe so vidne kot rumenenje in propadanje starejših listov, v katerih pride škodljivost soli tudi bolj do izraza. Koncentracija Na^+ in Cl^- ionov naraste v vseh listih, vendar je v starejših listih višja, ker dlje časa oddajajo vodo. Sol postopno naraste do prekomernih

koncentracij, ali se bo to zgodilo v nekaj dneh ali nekaj tednih pa je odvisno od količine soli in drugih okoljskih dejavnikov, kot so temperatura, relativna vlažnost, razporejenost topnih hranil, genetskih razlik v zmožnosti korenin, da preprečijo vdor soli v transpiracijska tkiva. Preživetje rastline določa razmerje med listi, ki propadajo in med novonastalimi listi. Če stari listi propadajo hitreje kot novi rastejo, se nivo fotosinteze prične nižati, do meje ko rastlina umre (Munns, 2002).

Odpornost rastlin krompirja proti suši smo testirali v zemlji. 13 dni stare rastline smo za 15 dni prenehali zalivati in podatke za analizo pridobili iz svežih in suhih mas poganjkov in korenin. Podatki iz svežih mas poganjkov so pokazali, da so bile v sušnih pogojih rastline linij GL1 in KR1 statistično značilno težje od netransformiranih rastlin. Vendar pa se ta razlika ni opazila, ko smo poganjke posušili. Sklepamo lahko torej, da imata vnesena gena za proteazne inhibitorje pozitiven vpliv na odpornost proti suši, kar so za proteazni inhibitor že opisali Huang in sod. (2007). Pokazali so, da se pri rižu (*Oryza sativa*) izpostavljenemu suši, poveča izražanje gena za proteazni inhibitor, imenovanega *OCP11*, ki je po sekvencah zelo podoben proteaznim inhibitorjem iz drugih rastlin. Gen *OCP11* domnevno kodira kimotripsinski inhibitor. S povečanim izražanjem omenjenega proteina so pri transgenih rastlinah riža dosegli večjo odpornost na sušo, poleg tega so rastline tudi bolje obrodile.

Munns (2002), ki se osredotoča na povezavo med vsebnostjo vode v celici in rastjo, je ugotovil, da so zgodnji odgovori rastline na stres zaradi zasoljenosti pravzaprav enaki odgovorom rastline na sušo. Podoben je tudi hormonalni odgovor in v obeh primerih se poveča koncentracija ABA-e. Tako slanost tal kot suša manjšata zmožnost privzemanja vode iz okolja, ter s tem vplivata na slabšo rast. V našem primeru sta izvedena poskusa, testiranje odpornosti proti slanosti in odpornosti proti suši, dala dopolnjujoče rezultate. Višja kot je koncentracija soli oz. bolj kot so rastline izpostavljene suši, slabša je njihova rast. V obeh primerih so se transgene linije dobro odrezale, večinoma so bolj rastle kot netransgene rastline. Rezultati, ki smo jih dobili, sovpadajo tudi s poskusi Huang-a in sod. (2007), kjer je bil v transformaciji rastlin prav tako uporabljen proteazni inhibitor. Poleg odpornosti na sušo so s poskusom gojenja rastlin na hidroponiki nakazali tudi odgovornost

družine PI pri povečani toleranci na slanost. Uporabili so družino PI, kamor spada tudi *OCPII*.

Zanimalo nas je kako se rastline odzovejo, če jih po 15-ih dneh suše zalijemo. Ugotovili smo, da je regeneracija zelo dobra, saj so vse rastline preživele in si opomogle. Njihovo stanje smo opazovali le vizualno in razlik med linijami nismo zaznali. Zhang in sod. (2008) so test regeneracije izvedli s testnimi linijami repnjakovca (*Arabidopsis thaliana*), ki so imele vgrajena gena za cisteinska PI, *AtCISa* in *AtCISb*. Rastline so 1 teden zalivali z 200 mM koncentracijo manitola in na ta način posnemali razmere v suši. Po 1 tednu so rastline zalivali 3 dni z navadno vodo. Poskus je bil zastavljen nekoliko drugače in transgene linije s povečano ekspresijo PI so bile sposobne boljše regeneracije kot netransgena linija.

Krompir izvira iz območij s hladnejšim podnebjem, vseeno pa so v kmetijstvu poškodbe zaradi nizkih temperatur pogoste. Odpornost sorte Désirée na nizke temperature smo testirali v tkivnih kulturah. Protokol smo povzeli po Behnam in sod. (2007). Po preliminarnih poskusih, smo spremenili čas izpostavitve rastlin najnižji temperaturi (-20 °C), in sicer namesto 1 uro, smo rastline postavili na -20 °C za pol ure. Stanje rastlin smo z uporabo razredov opisovali 6 dni po končanem poskusu. Statistično značilnih razlik med linijami nismo opazili. Zhang in sod (2008) so v zgoraj omenjenem poskusu rastline repnjakovca testirali tudi na odpornost proti nizkim temperaturam. 12 dni stare rastline so 7 dni pustili rasti na 4 °C, potem pa jih prestavili na 22 °C za naslednjih 7 dni. Po koncu poskusa so odpornost rastlin analizirali z merjenjem dolžine korenin. Ugotovili so, da so imele daljše korenine samo rastline linije z vgrajenim genom *AtCISa*, medtem ko se rastline z vgrajenim genom *AtCISb* po odpornosti na mraz niso razlikovale od netransgenih rastlin. Drugače so se problema lotili Van der Vyver in sod. (2003), ki so odpornost na mraz opazovali pri transformiranemu tobaku. Vanj so vgradili gen, ki kodira cisteinski PI, cistatin, imenovan Oryzacystatin 1 (OC-1). 7 tednov stare rastline v lončkih z zemljo so za dva dni izpostavili temperaturi 5 °C, nato jih za dva dni postavili na 20 °C in analizirali podatke. S pomočjo merjenja učinkovitosti fotosinteze in asimilacije CO₂, so potrdili statistično značilno boljše uspevanje dveh od treh transgenih linij. Po regeneraciji se omenjeni liniji nista razlikovali od netransgene linije.

V našem poskusu statistično značilnih razlik med linijami nismo dokazali, zato ne moremo trditi, da uporabljeni PI povečajo toleranco na nizke temperature. Glede na omenjena primera imajo nekateri PI pozitivne učinke pri odpornosti rastlin na mraz. V zemlji zamrznjena voda je rastlinam prav tako nedostopna, kot se to zgodi v slanem ali sušnem okolju. Iz tega razloga sklepamo, da so določeni PI vsekakor pomembni pri obrambi pred nizkimi temperaturami in transgenim rastlinam pomagajo pri premagovanju stresa zaradi nizkih temperatur.

Odpornost transgenih linij krompirja proti okužbi z virusom Y smo testirali na dveh transgenih linijah, GL1 in GL2, ki smo ju primerjali z linijo NT. Za analizo relativnega izražanja virusa smo uporabili rastlinski material, pobran 7 DPI.

Z vzorci smo izvedli reakcijo PCR v realnem času, s pomočjo katere smo ugotovili, da se je virusna RNA pri liniji NT razširila do 2. zgornjih listov v 60 odstotkih. Pri transgenih linijah je bilo širjenje v zgornje liste občutno manjše, saj se je pri liniji GL1 virusna RNA v zgornje liste razširila le v 10 odstotkih, pri liniji GL2 pa se virus v zgornje liste sploh ni širil. Se je pa virus izražal v inokuliranih listih, njegovo ekspresijo smo merili v 2. spodnjih listih. Relativno izražanje virusa Y se med tremi testiranimi linijami ni statistično značilno razlikovalo, saj se je virus v vseh okuženih listih pomnoževal. Relativno izražanje virusa smo preverili tudi v 2. zgornjih listih, kjer smo med linijami opazili razlike. Mnogo bolj se je virus Y izražal v netransformiranih rastlinah kot pa v transformiranih.

Odpornost transgenih linij proti okužbi s PVY smo ocenili z razmerjem virusne RNA med zgornjimi in spodnjimi listi. Razmerje se je med linijami razlikovalo. V rastlinah NT se je virusna RNA v zgornjih listih izražala približno 50-krat manj kot v spodnjih. Manj občutljivi za širjenje virusa sta bili transgeni liniji, saj smo v zgornjih listih rastlin linije GL1 zaznali približno 30.000-krat manjše izražanje virusa v primerjavi s spodnjimi okuženimi listi, pri liniji GL2 pa se virus v zgornjih listih sploh ni izražal.

PI so pomembni pri odgovoru rastlin na biotski stres. Poleg tega, da nudijo odpornost proti nekaterim insektom, ščitijo tudi rastlino pred glivnimi, bakterijskimi in virusnimi okužbami (povzeto po Mosolov in Valueva, 2005). Vlogo PI pri vzpostavitvi odpornosti

proti okužbi s PVY so tako raziskovali tudi Gutierrez-Campos in sodelavci (1999). S cisteinskim PI, pridobljenim iz riža, so želeli dokazati odpornost tobaka na dva pomembna virusa iz roda *Potyvirus*, TEV (ang.; tobacco etch virus) in PVY. Dokazati jim je uspelo, da so rastlinski PI uspešni pri obrambi pred virusi, katerih podvajanje vključuje aktivnost cisteinskih proteaz. Med takšne viruse ne spadajo samo virusi iz roda *Potyvirus*, ampak tudi virusi iz rodov *Tymo-*, *Nepo-*, *Como-* in *Closterovirus*.

Iz rezultatov izražanja virusne RNA v 2. spodnjih (okuženih) in 2. zgornjih (neokuženih) listih testiranih linij lahko zaključimo, da se virus Y v gensko transformiranih linijah razširja počasneje. Ne moremo pa trditi, da se v okuženih listih virus tudi manj razmnožuje. Izražanje vstavljenega gena torej vpliva na sistem širjenja virusa po rastlini. Če bi želeli natančneje določiti vlogo gena v sistemu širjenja, bi morali preveriti še izražanje virusa pri ostalih vzorcih (5 in 14 DPI) in ponoviti poskus z večjim številom rastlin.

Gutierrez-Campos in sod. (1999) so mnenja, da je uporaba proteaznih inhibitorjev zelo obetaven pristop za doseganje rastlinske odpornosti proti virusom. S primernim PI bi lahko kontrolirali podvajanje tudi drugih rastlinskih virusov, saj je med njimi veliko takšnih, ki za svoje mehanizme namnoževanja potrebujejo različne vrste proteaznih aktivnosti.

V diplomskem delu dobljeni podatki potrjujejo vpletenost PI pri obrambi rastlin pred stresom, ki jih povzročajo abiotski in biotski stresni dejavniki. Njihovo pomembnost bi mogoče s še večjo gotovostjo potrdili, če bi bili poskusi izvedeni z večjim številom rastlin in večkrat ponovljeni.

5.2 SKLEPI

Uvedli smo uspešen sistem testiranja na abiotske stresne dejavnike slanost (v tkivnih kulturah in v zemlji), sušo (v zemlji) in nizke temperature (v tkivnih kulturah) za krompir sorte Désirée.

S testiranji transgenih linij s čezmerno ekspresijo krompirjevega PI (KR1 in KR2) smo ugotovili, da večje izražanje gena vpliva na nekoliko boljšo odpornost krompirja sorte Désirée proti suši in slanosti, tako v *in vitro* pogojih kot tudi v zemlji .

S testiranji transgenih linij s čezmerno ekspresijo PI iz glive (GL1 in GL2) smo ugotovili, da izražanje gena pri krompirju sorte Désirée ne vpliva na odpornost proti suši in slanosti.

Domnevamo, da geni za PI, vstavljeni v štiri transformirane linije (KR1, KR2, GL1 in GL2), ne nudijo tolerance za nizke temperature.

Virus Y se pri transgenih linijah, ki izražajo PI iz glive (GL1 in GL2), razširja počasneje kot pri netransgeni liniji.

6 POVZETEK

Globalno segrevanje je vedno bolj pereč problem biotskih sistemov. Povzroča ekstremne pogoje in vpliva tako na rastline, kot živali. Rastline, kot pritrjeni organizmi so zato izpostavljene marsikateremu stresu, ki je lahko abiotske ali biotske narave. Nekatere rastline so na omenjene strese razvile toleranco, drugim pa ti pogoji predstavljajo preostre razmere za življenje. Glede na to, da se vzporedno s pojavom klimatskih sprememb povečuje še človeška populacija, je potreba po hrani vedno večja, s tem pa tudi uporaba manj ugodnih kmetijskih površin. Rastline zato poskušamo narediti odpornejše s klasičnimi metodami žlahtnjenja, želene rezultate pa hitreje dobimo z uporabo alternativnih metod, kot je biotehnološko žlahtnjenje. Eden takih načinov je vnos genov iz drugih rastlinskih vrst, gliv ali mikroorganizmov.

Diplomska naloga se osredotoča na štiri linije krompirja sorte Désirée iz zbirke NIB-a. Dve liniji imata vstavljen gen za PI iz gliv, dve pa povečano ekspresijo krompirjevega endogenega gena za PI. PI so za rastlinski metabolizem zelo pomembni in široko razširjeni, ker rastlinam nudijo zaščito pred herbivori in patogeni. Trenutni dokazi kažejo, da rastlinam pomagajo tudi pri premagovanju abiotskega stresa. Zanimalo nas je ali vstavljeni geni povečajo odpornost transgenih rastlin proti stresu zaradi zasoljenosti, suše, nizkih temperatur in stresu zaradi okužbe z virusom Y. Naš namen je bil postaviti uspešen sistem testiranja rastlin krompirja sorte Désirée na odpornost proti slanosti, suši in nizkim temperaturam.

Odpornost rastlin proti slanosti v tleh smo testirali v *in vitro* pogojih, kjer so bile uporabljene koncentracije NaCl 0, 60 in 120 mM. Analizirali smo svežo in suho maso poganjkov in korenin, višino poganjkov, ter število korenin daljših od 2 cm. Nekoliko boljšo rast transformiranih linij krompirja sorte Désirée, katere so se izkazale za bolj odporne pri rasti v slanih pogojih, smo potrdili tudi s testiranjem v zemlji. V tem testu smo rastline zalivali z 0, 200 ali 400 mM koncentracijo. Merili smo sveže in suhe mase

poganjkov in korenin ter opazili večjo toleranco za slanost pri istih transgenih linijah, kot v *in vitro* poskusu.

Sposobnost toleriranja suše smo testirali z rastlinami v zemlji, ki smo jih izpostavili sušnim razmeram. Ker rastlina zaznava sušo kot proces, podoben zasoljenosti tal, je tudi odgovor podoben. Odpornejše so bile rastline natančno tistih linij kot v poskusu s povečano koncentracijo NaCl v rastnem mediju.

Testiranje rastlin proti nizkim temperaturam ni dalo razlik med testiranimi linijami. Transgene rastline so rastle enako kot netransgene rastline.

Odpornost rastlin proti okužbi s PVY smo testirali samo na dveh linijah, in sicer tistih z vgrajenim genom iz gliv. Za analizo smo uporabili vzorce 7 DPI, kjer smo dokazali uspešnost transgene linije pri odpornosti proti virusu, saj se je PVY^{NTN} v obeh transgenih linijah počasneje razširjal kot pri kontrolnih netransgenih rastlinah.

Uspešno smo postavili sistem testiranja odpornosti rastlin krompirja sorte Désirée proti slanosti, suši in nizkim temperaturam. Obenem smo dokazali, da so PI lahko vključeni v povečano odpornost proti abiotskim in biotskim stresnim dejavnikom.

7 VIRI

- Arends P., Kus M. 1999. Nasveti za pridelovanje krompirja v Sloveniji. Kranj, Mercator-KŽK Kmetijstvo Kranj, d.o.o., LFVB: 242 str.
- Arko B. Tehnologija PCR v realnem času in možnosti uporabe v laboratorijski diagnostiki in farmaciji. Farm Vestn. 2004 55: 215-220
- Baebler Š., Krečič-Stres H., Rotter A., Kogovšek P., Cankar K., J. Kok E., Gruden K., Kovač M., Žel J., Pompe-Novak M., Ravnikar M. 2009. PVY^{NTN} elicits a diverse gene expression response in different potato genotypes in the first 12 h after inoculation. Molecular plant pathology, 10(2): 263-275
- Beaujean A., Sangwan R. S., Lecardonnell A., Sangwan-Norreel B. S. 1998. Agrobacterium-mediated transformation of three economically important potato cultivars using sliced internodal explants: an efficient protocol of transformation. Journal of Experimental Botany, 49(326): 1589–1595
- Behnam B., Kikuchi A., Celebi-Toprak F., Kasuga M., Yamaguchi-Shinozaki K., Watanabe K. N. 2007. *Arabidopsis rd29A::DREB1A* enhances freezing tolerance in transgenic potato. Plant Cell Rep, 26: 1275-1282
- Celebi-Toprak F., Behnam B., Serrano G., Kasuga M., Yamaguchi-Shinozaki K., Naka H., Watanabe J. A., Yamanaka S., Watanabe K. N. 2005. Tolerance to salt stress of the transgenic tetrasomic tetraploid potato, *Solanum Tuberosum* cv. Desiree appears to be induced by the *DREB1A* gene and *rd29A* promoter of *Arabidopsis thaliana*. Breeding Science, 55: 311-319
- Christeller J. T. 2005. Evolutionary mechanisms acting on proteinase inhibitor variability. The FEBS Journal, 272 (22): 5710-5722

- Crosslin J. M., Hamm P. B., Shiel P. J., Hane D. C., Brown C. R., Berger P. H. 2005. Serological and molecular detection of tobacco vein necrosis isolates of potato virus Y (PVY^N) from potatoes grown in the western united states. *American journal of potato research*, 82: 263-269
- Dermastia M., Ravnkar M. 1996. Altered cytokinin pattern and enhanced tolerance to potato virus Y^{NTN} in the susceptible potato cultivar (*Solanum tuberosu* cv. Igor) grown in vitro. *Physiological and molecular plant pathology*, 48: 65-71
- Drinovec B. 1996. Virusi. V: Raspor P. (Ur.). *Biotehnologija, osnovna znanja*. Ljubljana, Bia, str: 3-14
- El-Bana A., Hajirezaei M.-R., Wissing J., Ali Z., Vaas L., Heine-Dobbernack E., Jacobsen H.-J., Schumacher H. M., Kiesecker H. 2010. Over-expression of PR-10a leads to increased salt and osmotic tolerance in potato cultures. *Journal of biotechnology*, 150: 277-287
- Gutierrez-Campos R., Torres-Acosta J. A., Saucedo-Arias L. J., Gomez-Lim M. A. 1999. The use of cysteine proteinase inhibitors to engineer resistance against potyviruses in transgenic tobacco plants. *Nature biotechnology*, 17: 1223-1226
- Habib H., Fazili K. M. 2007. Plant protease inhibitors: a defense strategy in plants. *Biotechnology and molecular biology review*, 2(3): 68-85
- Haq S. K., Atif S. M., Khan R. H. 2004. Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests and pathogens: natural and engineered phytoprotection. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 431: 145-159
- Hirayama T., Shinozaki K. 2010. Research on plant abiotic stressresponse in the post-genome era: past, present and future. *The plant journal*, 61: 1041-1052
- Huang Y., Xiao B., Xiong L. 2007. Characterization of a stress responsive proteinase inhibitor gene with positive effect in improving drought resistance in rice. *Planta*, 226: 73-85

- Istinič I., Milavec M., Žel J. 2010. Gensko spremenjene rastline s povečano toleranco na sušo in slanost. Kmetovalec, št. 1, str. 3. [COBISS.SI-ID 26762713]
- Javornik B. 2004. Tržna pridelava gensko spremenjenih rastlin. V: Bohanec B., Javornik B., Strel B. *Gensko spremenjena hrana*. 2004. Ljubljana, Biotehniška fakulteta v Ljubljani, str: 53-58
- Jung D.-Y., Lee O. R., Kim Y.-J., Lee J.-H., Pulla R. K., Sathiyaraj G., Shim J.-S., Yang D.-C. 2010. Molecular characterization of a cysteine proteinase inhibitor, *PgCPI*, from *Panax ginseng* C. A. Meyer. *Acta physiol planta*, 32: 961-970
- Kharis T., Leclerc Y., Donnelly D. J. 1998. Relative salinity tolerance of potato cultivars assessed by *in vitro* screening. *American Journal of Potato Research*, 75: 207-210
- Koeva Christova P., Kirilov Christov N., Imai R. 2006. A cold inducible multidomain cystatin from winter wheat inhibits growth of the inducible snow mold fungus, *Microdochium nivale*. *Planta*, 223: 1207-1218
- Lopez-Otin C., Bond J. S. 2008. Proteases: Multifunctional Enzymes in Life and Disease. *Journal of Biological Chemistry*, 283: 30433-30437
- Milavec M., Kovač M., Ravnikar M. 1999. Photosynthetic pigments in potato plants (*Solanum tuberosum* L.) cv. Igor after primary infection with potato virus Y. *Phyton special issue: »Plant physiology«*, 39: 265-269
- Mohamed A. A., Matter M. A., Saker M. M. 2010. Effect of salt stress on some defense mechanisms of transgenic and wild potato clones (*Solanum tuberosum* L.) grown in vitro. *Nature and science*, 8(12); 181-193
- Mosolov V. V., Valueva T. A. 2005. Proteinase inhibitor and their function in plants: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 41(3); 227-246
- Munns R. 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell and Environment*, 25: 239-250

- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology*, 15,3: 473-497
- Nicolaisen M. 2011. An oligonucleotide-based microarray for detection of plant RNA viruses. *Journal of virological methods*, 173: 137-143
- 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
- Rawlings N. D., Tolle D. P., Barrett A. J. 2004. Evolutionary families of peptidase inhibitors. *Biochemical Journal*, 378: 705-716
- Sluga T. 1994. Krompirjeve sorte za pridelavo v Sloveniji. Ljubljana, ČZP Kmečki glas: 61 str.
- Sluga T. 2005. Krompir v zgodovini Kmetijskega inštituta Slovenije. Ljubljana, Kmetijski inštitut Slovenije: 63 str.
- Srinivasan T., Kumar K. R. R., Kirti P. B. 2009. Constitutive expression of a trypsin protease inhibitor confers multiple stress tolerance in transgenic tobacco. *Plant cell physiology*, 50(3): 541-553
- Stiller I., Dulai S., Kondrák M., Tarnai R., Szabó L., Toldi O., Bánfalvi Z. 2008. Effects of drought on water content and photosynthetic parameters in potato plants expressing the trehalose-6-phosphate synthase gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Planta*, 227: 299-308
- Taiz L., Zeiger E. 2006. *Plant Physiology*. Fourth edition. Massachusetts, Sinauer Associates, str: 316 – 341, 671 - 703
- Tang L., Kim M. D., Yang K.-S., Kwon S.-Y., Kim S.-H., Kim J.-S., Yun D.-J., Kwak S.-S., Lee H.-S. 2008. Enhanced tolerance of transgenic potato plants overexpressing nucleoside diphosphate kinase 2 against multiple environmental stresses. *Transgenic Research*, 17: 705-715

- Van der Vyver C., Schneidereit J., Driscoll S., Turner J., Kunert K., Foyer C. H. 2003. Oryzacystatin 1 expression in transformed tobacco produces a conditional growth phenotype and enhances chilling tolerance. *Plant Biotechnology Journal*, 1, p.p.: 101-112
- Verslues P. E., Agarwal M., Katiyar-Agarwal S., Zhu J., Zhu J.-K. 2006. Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *The Plant Journal*, 45: 523-539
- Wang W., Vinocur B., Altman A. 2003. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, 218: 1-14
- Zang X., Lui S., Takano T. 2008. Two cysteine proteinase inhibitors from *Arabidopsis thaliana*, *AtCYSa* and *AtCISb*, increasing the salt, drought, oxidation and cold tolerance. *Plant Mol Biol*, 68: 131-143

ZAHVALA

Zahvaljujem se svoji mentorici, prof. dr. Jani Žel, za vso pomoč pri izvedbi praktičnega dela svoje diplomske naloge, za nasvete in razlage, posebno pa za prijaznost in razumevanje ter čas. Rada bi se zahvalila tudi prof. dr. Marjani Regvar za koristno kritiko in doc. dr. Jasni Dolenc Koce za prijazne napotke in nasvete. Obema se najlepše zahvaljujem za pregled diplomske naloge. Iskreno se zahvaljujem Idi Istinič, ki mi je pomagala pri delu v laboratoriju in pisanju diplomske naloge. Zahvaljujem se ji za vse spodbudne besede in čas, ki si ga je vzela zame.

Posebna zahvala gre mojim prijateljicam, predvsem Katarini in Špeli, za odkritost in prijateljske nasvete. Hvala, ker sta mi ves čas stali ob strani in me bodrili.

Zelo sem hvaležna Andreju, ki me je spodbujal in bil potrpežljiv. Hvala tudi za vso pomoč pri oblikovanju diplomske naloge.

Staršem se iskreno zahvaljujem za razumevanje, podporo in potrpežljivost. Predvsem sem jim hvaležna za lepa študijska leta, ki sta mi jih omogočila. Hvala tudi sestri Moniki, ki me je bila vedno pripravljena poslušati in mi pomagati.