

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Vasja PROGAR

**TRANSKRIPTOMSKA ANALIZA GENOV HMELJA  
(*Humulus lupulus L.*) PO OKUŽBI S FITOPATOGENO  
GLIVO *Verticillium albo-atrum* Reinke & Berthold**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2017



UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
INTERDISCIPLINARNI DOKTORSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM BIOMEDICINA  
ZNANSTVENO PODROČJE GENETIKA

Vasja PROGAR

**TRANSKRIPTOMSKA ANALIZA GENOV HMELJA (*Humulus lupulus L.*) PO  
OKUŽBI S FITOPATOGENO GLIVO *Verticillium albo-atrum Reinke &*  
*Berthold***

DOKTORSKA DISERTACIJA

**TRANSCRIPTIONAL ANALYSIS OF HOP GENES (*Humulus lupulus L.*)  
FOLLOWING INFECTION WITH PHYTOPATHOGENIC FUNGUS  
*Verticillium albo-atrum Reinke & Berthold***

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2017

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa Komisije za doktorski študij Univerze v Ljubljani z dne 06.10.2014 je bilo potrjeno, da kandidat izpolnjuje pogoje za opravljanje doktorata znanosti na Interdisciplinarnem doktorskem študijskem programu Biomedicine, znanstveno področje genetika. Za mentorico je bila imenovana prof. dr. Branka Javornik.

Doktorska disertacija je zaključek Interdisciplinarnega doktorskega študijskega programa Biomedicina, znanstveno področje genetika. Doktorsko delo je bilo opravljeno na Katedri za biotehnologijo, genetiko, statistiko in žlahtnjenje rastlin Oddelka za agronomijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Del raziskave je bil opravljen na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije (IHPS) v Žalcu.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica:                   prof. dr. Marjana Regvar  
                                       Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo  
Članica:                         prof. dr. Kristina Gruden  
                                       Nacionalni inštitut za biologijo, Ljubljana  
Članica:                         doc. dr. Sabina Berne  
                                       Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Datum zagovora:               19. september 2017

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

Vasja PROGAR

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dd  
DK UDK 575:633.791:632.4(043)=163.6  
KG hmelj/*Humulus lupulus*/*Verticillium nonalfalfa*e/RNA-Seq/diferenčno izražanje/  
kandidatni geni  
AV PROGAR, Vasja, univ. dipl. bioteh.  
SA JAVORNIK, Branka (mentorica)  
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni doktorski študijski  
program Biomedicina, znanstveno področje genetika  
LI 2017  
IN TRANSKRIPTOMSKA ANALIZA GENOV HMELJA (*Humulus lupulus* L.) PO  
OKUŽBI S FITOPATOGENO GLIVO *Verticillium albo-atrum* Reinke & Berthold  
TD Doktorska disertacija  
OP XI, 89 str., 9 pregl., 22 sl., 4 pril., 201 vir.  
IJ sl  
JI sl/en  
AI Verticilijska uvelost je ena izmed najbolj škodljivih bolezni hmelja, njena glavna  
povzročiteljica pa je gliva *Verticillium nonalfalfa*e (s starim poimenovanjem  
*Verticillium albo-atrum*). Nekateri kultivarji hmelja so na to bolezen odporni,  
vendar mehanizem odpornosti kljub mnogim raziskavam še ni znani. Da bi dobili  
boljši vpogled v odziv hmelja na okužbo z glivo *V. nonalfalfa*e, smo s  
transkriptomsko študijo preverili diferenčno izražanje genov hmelja po okužbi  
odpornega in neodpornega kultivarja, tako v koreninah kot v nadzemnih delih, v  
štirih časovnih točkah po okužbi. S pridobljenimi diferenčno izraženimi geni smo  
izvedli mrežno analizo obogativne funkcijskih skupin in izbrali osem kandidatnih  
genov, katerih vzorce izražanja smo preverili še s kvantitativno verižno reakcijo s  
polimerazo s predhodno obratno transkripcijo. Povišano izražanje smo zasledili pri  
treh kandidatnih genih za s patogenezo povezane proteine, ki sodelujejo v splošnem  
obrambnem odzivu, in sicer predvsem v neodpornem kultivarju. Prav tako je bilo  
povišano izražanje dveh kandidatnih genov, povezanih z modifikacijami celične  
stene. Zmanjšano izražanje smo opazili pri homologu gena iz bombaževca, ki naj bi  
bil povezan z odpornostjo na verticilije, ter dveh genih, povezanih z biosintezo  
kutina – metabolnim procesom, ki ni bil predviden in ki je bil v nadzemnih delih  
odpornega kultivarja najbolj obogaten z diferenčno izraženimi geni. Rezultati  
disertacije so v skladu s predhodnim raziskavami, saj potrjujejo močnejši splošni  
obrambni odziv v neodpornem kultivarju, hkrati pa povezava metabolizma kutina z  
odzivom hmelja na glivo *V. nonalfalfa*e predstavlja zanimivo izhodišče za  
prihodnje raziskave.

#### KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd  
DC UDC 575:633.791:632.4(043)=163.6  
CX hop/*Humulus lupulus*/Verticillium nonalfalfa/RNA-Seq/differential expression/candidate genes  
AU PROGAR, Vasja  
AA JAVORNIK, Branka (supervisor)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdisciplinary Doctoral Programme in Biomedicine, Scientific Field Genetics  
PY 2017  
TI TRANSCRIPTIONAL ANALYSIS OF HOP GENES (*Humulus lupulus* L.) FOLLOWING INFECTION WITH PHYTOPATHOGENIC FUNGUS *Verticillium albo-atrum* Reinke & Berthold  
DT Doctoral Dissertation  
NO XI, 89 p., 9 tab., 22 fig., 4 ann., 201 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB *Verticillium* wilt is one of the most devastating diseases of hop; it is caused by the fungus *Verticillium nonalfalfa* (previously named *Verticillium albo-atrum*). Some hop cultivars are resistant to this disease, but the underlying mechanisms of the resistance have not yet been determined. In order to gain a better insight into hop response to *V. nonalfalfa* infection, we performed a transcriptomic study in which we determined differentially expressed hop genes in a resistant and a susceptible cultivar, both in roots and shoots, at four time points after the inoculation. With differentially expressed genes we performed a network analysis of enrichment of functional groups and selected eight candidate genes, for which the expression patterns were validated with reverse transcription quantitative polymerase chain reaction. Three candidate genes encoding pathogenesis-related proteins involved in the general defence response were up-regulated after the infection, especially in the susceptible cultivar. Two candidate genes associated with cell wall modifications were also up-regulated. We observed decreased expression in infected hop plants for a cotton gene homologue associated with resistance to *Verticillium* and for two candidate genes associated with cutin biosynthesis. This metabolic process was not expected, yet it was the most enriched with differentially expressed genes in shoots of resistant plants according to the network analysis. The results presented in this dissertation are in agreement with previous studies, which report a strong general defence response in the susceptible cultivar, while implication of cutin metabolism in hop response to *V. nonalfalfa* represents an interesting starting point for future studies.

## KAZALO VSEBINE

Ključna dokumentacijska informacija	III
Key words documentation	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VIII
Kazalo slik	IX
Kazalo prilog	X
Okrajšave in simboli	XI
<b>1 UVOD</b>	<b>1</b>
<b>2 PREGLED OBJAV</b>	<b>3</b>
2.1 HMELJ	3
2.1.1 Botanična opredelitev	3
2.1.2 Uporaba hmelja	4
2.1.3 Bolezni hmelja	5
2.1.4 Sorte hmelja	6
2.1.4.1 Kultivarja Celeia in Wye Target	6
2.1.5 Genom hmelja	7
2.2 VERTICILIJSKA UVELOST HMELJA	9
2.2.1 Gliva <i>Verticillium nonalfalfa</i> ( <i>V. albo-atrum</i> )	9
2.2.2 Patogeneza in bolezenska znamenja verticilijske uvelosti	9
2.2.3 Blaga in letalna oblika verticilijske uvelosti hmelja	10
2.2.4 Ukrepi za preprečevanje verticilijske uvelosti hmelja	12
2.2.5 Raziskave genetske odpornosti na verticilijsko uvelost	13
2.3 MEHANIZMI RASTLINSKE ODPORNOSTI	14
2.3.1 Splošni mehanizmi rastlinske odpornosti	14
2.3.1.1 Imunost sprožena z molekularnimi vzorci, značilnimi za patogene	15
2.3.1.2 Imunost sprožena z efektorji	16
2.3.1.3 Hormonska signalizacija pri rastlinski obrambi	17
2.3.2 Rastlinski odziv na okužbo z glivami rodu <i>Verticillium</i>	19
2.4 TRANSKRIPTOMSKO PROFILIRANJE Z METODO RNA-Seq	22
2.4.1 Princip delovanja in primerjava z drugimi metodami	22
2.4.2 Bioinformatska obdelava podatkov pridobljenih z RNA-Seq	24
<b>3 MATERIALI IN METODE</b>	<b>26</b>
3.1 PRIPRAVA IN OKUŽEVANJE RASTLIN	26
3.1.1 Priprava rastlinskega materiala in okuževanje	26
3.1.2 Vzorčenje in mletje vzorcev	26
3.2 IZOLACIJA RNA IN PREVERJANJE KAKOVOSTI	27
3.3 SEKVENCIRANJE IN FILTRIRANJE ODČITKOV	27
3.4 PORAVNAVA ODČITKOV NA HMELJNI GENOM IN NORMALIZACIJA	28

<b>3.4.1 Poravnava odčitkov na hmeljni genom</b>	<b>28</b>
<b>3.4.2 Normalizacija</b>	<b>28</b>
3.5 OCENA DIFERENČNEGA IZRAŽANJA	29
<b>3.5.1 Metoda razmerja spremembe (FC)</b>	<b>29</b>
<b>3.5.2 Metoda z rangi kvantilne regresije grafov MA (MAQR)</b>	<b>30</b>
<b>3.5.3 Metoda s površino omejene ploskve (FunPat)</b>	<b>30</b>
3.6 ANALIZA FUNKCIJSKE OBOGATITVE DIFERENČNEGA IZRAŽANJA	31
<b>3.6.1 Funkcijska anotacija genov hmelja</b>	<b>31</b>
<b>3.6.2 Mrežna analiza funkcijске obogatitve diferenčnega izražanja</b>	<b>31</b>
3.7 IZBOR KANDIDATNIH GENOV	32
3.8 PREVERJANJE VZORCEV IZRAŽANJA Z RT-qPCR	32
<b>3.8.1 Obratna transkripcija</b>	<b>33</b>
<b>3.8.2 Začetni oligonukleotidi za kandidatne gene in referenčni geni</b>	<b>33</b>
<b>3.8.3 Kvantitativna verižna reakcija s polimerazo (qPCR)</b>	<b>33</b>
<b>3.8.4 Analiza rezultatov RT-qPCR</b>	<b>35</b>
<b>4 REZULTATI Z RAZPRAVO</b>	<b>36</b>
4.1 KAKOVOST VZORCEV RNA	36
4.2 SEKVENCIRANJE IN PORAVNAVA ODČITKOV NA GENOM HMELJA	38
4.3 DIFERENČNO IZRAŽANJE	41
<b>4.3.1 Primerjava metod za oceno diferenčnega izražanja</b>	<b>41</b>
<b>4.3.2 Diferenčno izražanje genov</b>	<b>43</b>
4.4 FUNKCIJSKA OBOGATITEV DIFERENČNEGA IZRAŽANJA	44
<b>4.4.1 Funkcijska anotacija in pojmi GO Slim</b>	<b>44</b>
<b>4.4.2 Mrežna analiza funkcijске obogatitve</b>	<b>45</b>
4.5 ANALIZA KANDIDATNIH GENOV PO FUNKCIJSKIH SKLOPIH	49
<b>4.5.1 Kandidatni geni</b>	<b>49</b>
4.5.1.1 Primerjava vzorcev izražanja z RT-qPCR in z RNA-Seq	49
<b>4.5.2 Odzivi genov, vključenih v splošno obrambo rastlin</b>	<b>51</b>
4.5.2.1 Gen za PR-1 protein HlPR-1	52
4.5.2.2 Gen za lipidni prenašalec <i>HlLTP</i>	53
4.5.2.3 Gen za proteazni inhibitor HlPR-6	55
<b>4.5.3 Odzivi genov, povezanih s spremembami celične stene</b>	<b>56</b>
4.5.3.1 Gen za peroksidazo HlPx4	56
4.5.3.2 Gen za pektin metilesterazo <i>HIPME2</i>	58
<b>4.5.4 Odzivi genov, vključenih v metabolizem kutina</b>	<b>59</b>
4.5.4.1 Gen za citokrom P450 86A HlCYP86A	60
4.5.4.2 Gen za lipazo GDSL HlGLIP	61
<b>4.5.5 Odzivi drugih skupin genov</b>	<b>62</b>
4.5.5.1 Gen za protein MLP HlMLP423	63
<b>5 SKLEPI</b>	<b>65</b>
<b>6 POVZETEK (SUMMARY)</b>	<b>69</b>

6.1	POVZETEK	69
6.2	SUMMARY	71
7	VIRI	74
<b>ZAHVALA</b>		
<b>PRILOGE</b>		

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Taksonomska klasifikacija hmelja (ITIS ..., 2016).....	3
Preglednica 2: Glavne pridelovalke hmelja v letu 2016 (IHGC ..., 2016).....	5
Preglednica 3: Lastnosti obravnnavanih hmeljnih kultivarjev Celeia in Wye Target (Katalog sort ..., 2012; Neve, 1991).....	7
Preglednica 4: Zaporedja začetnih oligonukleotidov, uporabljenih za določevanje vzorcev izražanja kandidatnih genov s kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo s predhodno obratno transkripcijo.....	34
Preglednica 5: Število sekvenciranih odčitkov na posamezni vzorec in odstotki odčitkov v vzorcu, ki so se poravnali na hmeljni genom.....	39
Preglednica 6: Število differenčno izraženih genov za vse štiri kombinacije kultivar-organ .....	44
Preglednica 7: Mrežna analiza obogatitve pojmov Gene Ontology s programom ClueGO.....	47
Preglednica 8: Kandidatni geni in njihove predvidene funkcije in lastnosti.....	49
Preglednica 9: Razmerja sprememb izražanja kandidatnih genov v nadzemnih delih po metodi kvantitativne verižne reakcije s polimerazo s predhodno obratno transkripcijo.....	51

## KAZALO SLIK

Slika 1: Hmelj – <i>Humulus lupulus</i> L. (von Schubert, 1887).....	4
Slika 2: Bolezenska znamenja verticilijske uvelosti hmelja.....	11
Slika 3: Strukturne formule treh glavnih fitohormonov, vključenih v rastlinski obrambni odziv (ChemSpider, 2016).....	18
Slika 4: Primer poravnave odčitkov na referenčno zaporedje.....	25
Slika 5: Shema zasnove poskusa.....	27
Slika 6: Prikaz površine omejene ploskve.....	31
Slika 7: Ocenjeni porazdelitvi gostote verjetnosti za razmerji absorbanc A260/A280 in A260/A230 pri izoliranih vzorcih RNA.....	36
Slika 8: Ocenjena porazdelitev gostote verjetnosti za vrednosti RIN pri izoliranih vzorcih RNA.....	37
Slika 9: Prikaz števila sekvenciranih odčitkov na posamezni vzorec.....	38
Slika 10: Ocenjena porazdelitev gostote verjetnosti za vse log <sub>2</sub> (CPM) vrednosti (vse kombinacije izraženih genov in eksperimentalnih pogojev).....	40
Slika 11: Ilustracija prednosti določitve mejne vrednosti z metodo MAQR v primerjavi z metodo log <sub>2</sub> (FC).....	42
Slika 12: Primerjava metod za oceno diferenčnega izražanja genov.....	42
Slika 13: Prikaz rezultatov mrežne analize funkcijске obogativitve diferenčnega izražanja genov s programom ClueGO.....	46
Slika 14: Korelacija med metodama sekvenciranja RNA in kvantitativne verižne reakcije s polimerazo s predhodno obratno transkripcijo.....	50
Slika 15: Vzorci izražanja kandidatnega gena HlPR-1 v nadzemnih delih hmelja po okužbi z glivo <i>V. nonalfafae</i> , določeni z metodo kvantitativne verižne reakcije s polimerazo s predhodno obratno transkripcijo .....	53
Slika 16: Vzorci izražanja kandidatnega gena HlTP v nadzemnih delih hmelja po okužbi z glivo <i>V. nonalfafae</i> , določeni z metodo kvantitativne verižne reakcije s polimerazo s predhodno obratno transkripcijo.....	54
Slika 17: Vzorci izražanja kandidatnega gena HlPR-6 v nadzemnih delih hmelja po okužbi z glivo <i>V. nonalfafae</i> , določeni z metodo kvantitativne verižne reakcije s polimerazo s predhodno obratno transkripcijo.....	55
Slika 18: Vzorci izražanja kandidatnega gena HlPx4 v nadzemnih delih hmelja po okužbi z glivo <i>V. nonalfafae</i> , določeni z metodo kvantitativne verižne reakcije s polimerazo s predhodno obratno transkripcijo.....	57
Slika 19: Vzorci izražanja kandidatnega gena HIPME2 v nadzemnih delih hmelja po okužbi z glivo <i>V. nonalfafae</i> , določeni z metodo kvantitativne verižne reakcije s polimerazo s predhodno obratno transkripcijo.....	59
Slika 20: Vzorci izražanja kandidatnega gena HICYP86A v nadzemnih delih hmelja po okužbi z glivo <i>V. nonalfafae</i> , določeni z metodo kvantitativne verižne reakcije s polimerazo s predhodno obratno transkripcijo.....	61
Slika 21: Vzorci izražanja kandidatnega gena HIGLIP v nadzemnih delih hmelja po okužbi z glivo <i>V. nonalfafae</i> , določeni z metodo kvantitativne verižne reakcije s polimerazo s predhodno obratno transkripcijo.....	62
Slika 22: Vzorci izražanja kandidatnega gena HIMLP423 v nadzemnih delih hmelja po okužbi z glivo <i>V. nonalfafae</i> , določeni z metodo kvantitativne verižne reakcije s polimerazo s predhodno obratno transkripcijo.....	64

## KAZALO PRILOG

Priloga A: Parametri filtriranja in poravnave odčitkov v programu CLC Genomics

Priloga B: R funkcija za izračun rangov z metodo MAQR

Priloga C: Sto najbolj DI genov po metodi FunPat za vsako skupino kultivar-organ

Priloga D: Odstotek DI genov po posameznih pojmih GO Slim

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

bp	bazni pari (Gbp, Mbp, kbp – giga-, mega-, kilo- baznih parov)
CPM	število odčitkov na milijon poravnanih (ang. counts per million)
DAMP	molekularni vzorci, ki so značilni za poškodbe (ang. damage-associated molecular patterns)
DI	diferenčno izražanje
dpi	dnevi po inokulaciji
ETI	imunost sprožena z efektorji (ang. effector-triggered immunity)
FC	faktor razmerja spremembe (ang. fold-change)
G	giga (milijarda, $10^9$ )
GO	podatkovna zbirka za funkcionalno anotacijo genov (ang. Gene Ontology)
LTP	lipidni prenašalec (ang. lipid-transfer protein)
M	mega (milijon, $10^6$ )
MLP	protein MLP (ang. major latex protein)
mRNA	informacijska RNA (ang. messenger RNA)
nt	nukleotidi (Gnt, Mnt, knt – giga-, mega-, kilo- nukleotidov)
PAMP	molekularni vzorci, ki so značilni za patogene mikroorganizme (ang. pathogen-associated molecular patterns)
PME	pektin metilesteraza
PR	s patogenezo povezani proteini (ang. pathogenesis-related proteins)
PRR	receptorji za prepoznavo vzorcev (ang. pattern recognition receptor)
PTI	imunost sprožena z molekularnimi vzorci, značilnimi za patogene (ang. PAMP-triggered immunity)
QTL	kvantitativni lokus (ang. quantitative trait locus)
RNA-Seq	sekvenciranje RNA (ang. RNA sequencing)
RT-qPCR	kvantitativna verižna reakcija s polimerazo s predhodno obratno transkripcijo
ZO	začetni oligonukleotid



## 1 UVOD

Hmelj (*Humulus lupulus* L.) je večletna dvodomna vzpenjalna rastlina, ki se prideluje predvsem v Evropi, ZDA in na Kitajskem za potrebe pivovarske, v manjši meri pa tudi farmacevtske industrije. Glavno uporabno vrednost imajo storžki ženskih rastlin s številnimi lupulinskimi žlezami, v katerih nastajajo smole, eterična olja ter tanini (Neve, 1991). S pivovarskega stališča so ključnega pomena smole, ki vsebujejo  $\alpha$ - in  $\beta$ -kisline in dajejo pivu grenkobo ter pripomorejo k boljši skladiščni obstojnosti, ter eterična olja, ki prispevajo k značilni aromi in okusu piva.

Verticilijska uvelost hmelja (hmeljeva uvelost), ki jo povzroča gliva *Verticillium nonalfalfae* (s starim poimenovanjem *Verticillium albo-atrum*) ter v manjši meri gliva *Verticillium dahliae* (Radišek, 2006) je ena najbolj uničujočih bolezni v evropski pridelavi hmelja. Začne se z okužbo preko koreninskega sistema, po okužbi se gliva naseli v ksilemskem tkivu gostiteljske rastline ter povzroča venenje, listne kloroze in nekroze ter končno odmrtje rastline (Pegg in Brady, 2002). Bolezen se pojavlja v blažji ter letalni (progresivni) obliki; slednja se zelo hitro širi in povzroča velike izpade pridelka (Neve, 1991). Prva poročila o bolezni segajo v leto 1924, ko se je bolezen pojavila v pokrajini Kent v Angliji (Harris, 1927), v Sloveniji pa se je hujša oz. letalna oblika bolezni pojavila leta 1997 v Savinjski dolini (Radišek in sod., 2003). V zadnjih letih se ta bolezen v Sloveniji vsako leto pojavi na približno 70 Ha oz. okoli 5 % zemljišč (Radišek, 2006). Najučinkovitejši način nadzora verticilijske uvelosti je uporaba odpornih sort ob hkratnih strogih fitosanitarnih ukrepov, zato je žlahtnenje v smeri odpornosti zelo pomembno (Neve, 1991).

Nedavno je bil pri hmelju kartiran kvantitativni lokus, povezan z odpornostjo na verticilijsko uvelost, ki pojasni do 26 % fenotipske variance bolezenskih znamenj (Jakše in sod., 2013). Poleg tega je segregacijska analiza odpornosti na verticilijsko uvelost pri potomcih križanja odpornega in neodpornega kultivarja hmelja pri generaciji F1 ustrezala modelu delovanja dveh dominantnih komplementarnih genov, kar je na dveh drugih družinah potomcev ugotovil že Darby (2001).

Mandelc in sod. (2013) so proučevali odziv korenin odpornega in neodpornega kultivarja hmelja na okužbo z glivo *V. nonalfalfae* na proteomske nivoju. Ugotovili so večje število differenčno izraženih proteinov v koreninah neodpornega kultivarja z izrazito inducirano ekspresijo s patogenezo povezanih proteinov PR, medtem ko v koreninah odpornega kultivarja ni bilo zaznati statistično značilnega diferencialnega izražanja proteinov v primerjavi s kontrolnimi rastlinami.

Na vzorcih stebel hmelja, okuženega z glivo *V. nonalfalfae*, je bila izvedena še transkriptomska analiza differenčnega izražanja z uporabo metod polimorfizma dolžin pomnoženih fragmentov cDNA in verižne reakcije s polimerazo s predhodno obratno transkripcijo (Cregeen in sod., 2015). Naknadno je bilo z RT-qPCR potrjeno differenčno izražanje genov za proteine PR v obeh kultivarjih, specifično za odporni kultivar pa je bilo močno povečano izražanje genov, vpleteneih v ubikvitinacijo in promet celičnih veziklov.

Transkriptomska analiza odziva odpornega in neodpornega kultivarja na okužbo z glivo *V. nonalfalfa*e je sicer pokazala na razlike v izražanju genov med okuženimi in kontrolnimi rastlinami ter ponudila izhodišča za interpretacijo imunskega odziva hmelja, vendar je bilo za podrobnejšo razlago potrebno raziskave poglobiti.

V okviru doktorske naloge smo zato načrtovali izvedbo obsežnega poskusa okuževanja hmelja z glivo *V. nonalfalfa*e, v katerem bi pridobili ločene vzorce korenin in nadzemnih delov hmelja, tako iz odpornega kultivarja Wye Target kot iz neodpornega Celeia, v več časovnih točkah po okužbi z glivo. Z metodo RNA-Seq smo skušali določiti diferenčno izražene gene, ki bi jih uporabili pri analizi obogativne funkcijskih skupin s ClueGO v programskem okolju Cytoscape, ter z metodo RT-qPCR preveriti vzorce izražanja kandidatnih genov (izbor manjšega števila genov s predvideno vlogo v obrambnem odzivu). Na ta način smo želeli primerjati obrambna odziva obeh kultivarjev na okužbo glede na neokužene rastline, analizirati odziv v posameznih tkivih ter določiti vzorce diferenčnega izražanja genov tekom kolonizacije. Na podlagi zbranih izsledkov smo želeli dobiti vpogled v regulacijo funkcijskih skupin rastlinskih genov v odzivu na okužbo z glivo *V. nonalfalfa*e in identificirati pomembne gene, vključene v imunski odziv, kar je ključno za načrtovanje novih strategij za ustrezni nadzor nad verticilijsko uvelostjo hmelja.

Na podlagi predhodnih raziskav ter prednosti, ki jih predstavlja metoda RNA-Seq (možnost netarčnega trankskriptomskega profiliranja in velik dinamični razpon) smo si zastavili naslednje raziskovalne cilje:

- določiti gene hmelja, ki ob okužbi z glivo *V. nonalfalfa*e izkazujejo spremenjeno izražanje in predstavljajo kandidatne gene za odpornost na verticilijsko uvelost
- določiti vzorce diferenčnega izražanja kandidatnih genov
- umestiti kandidatne gene v metabolne in signalne poti

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 HMELJ

#### 2.1.1 Botanična opredelitev

Navadni hmelj (*Humulus lupulus* L.) je dvodomna trajna kulturna rastlina vzpenjavka. Spada med dvokaličnice (*Magnoliopsida*) in sicer v družino *Cannabaceae* (konopljevke), v kateri so poleg rodu *Humulus* L. (hmelji) še rodovi *Cannabis* L. (konoplje), *Celtis* L. (koprivovci) in *Trema* Lour. (ITIS ..., 2016). Točna taksonomska klasifikacija hmelja po Integriranem taksonomskem informacijskem sistemu (ang. Integrated Taxonomic Information System; ITIS ..., 2016) je podana v Preglednici 1 (prevodi v slovenščino sledijo Botaničnem terminološkem slovarju, 2016). V rod hmeljev (*Humulus* L.) poleg navadnega hmelja (*Humulus lupulus* L.) spada še japonski hmelj (*Humulus japonicus* Siebold & Zucc.; ITIS ..., 2016).

Preglednica 1: Taksonomska klasifikacija hmelja (ITIS ..., 2016)

Table 1: Taxonomic classification of hop according to (ITIS ..., 2016)

<b>Kraljestvo</b>	<i>Plantae</i>	rastline
<b>Podkraljestvo</b>	<i>Viridiplantae</i>	zelene rastline
<b>Deblo</b>	<i>Streptophyta</i>	streptofiti
<b>Organizacijski tip streptofitov</b>	<i>Embryophyta</i>	embriofiti (višje z. rastline)
<b>Organizacijski tip embriofitov</b>	<i>Tracheophyta</i>	cevnice (višje rastline)
<b>Poddeblo</b>	<i>Spermatophytina</i>	semenke
<b>Razred</b>	<i>Magnoliopsida</i>	dvokaličnice
<b>Nadred</b>	<i>Rosanae</i>	–
<b>Red</b>	<i>Rosales</i>	šipkovci
<b>Družina</b>	<i>Cannabaceae</i>	konopljevke
<b>Rod</b>	<i>Humulus</i> L.	hmelj
<b>Vrsta</b>	<i>Humulus lupulus</i> L.	navadni hmelj (pravi hmelj)

Naravno rastišče hmelja je na severni polobli med približno 35° in 70° zemljepisne širine (Neve, 1991), torej pretežno v subtropskem in zmernem pasu. Hmelj predvidoma izvira iz območja Kitajske, kar potrjujejo populacijske razlike med hmelji s področja Amerike in Evrope kot posledica migracije na vzhod in zahod (Neve, 1991). Razlika med populacijama se kaže predvsem v različnih Y kromosomih, ter v morfološki podobnosti med ameriškimi in japonskimi divjimi sortami hmelja (Neve, 1991), hipotezo pa dodatno potrjujejo tudi genetske analize (Šuštar-Vozlič in Javornik, 1999; Štajner in sod., 2008).

Hmelj se pri rasti ovija okoli opore v smeri urinega kazalca, pri čemer ga v Evropi običajno pridelujejo na mehanskih oporah visokih med 7 in 8 metrov, ki jih sadike hmelja prerastejo v eni rastni sezoni (Neve, 1991). Listi so dlanasto krpati in nazobčani (Slika 1).

Moški cvetovi se pojavljajo v grozdnatem socvetju in so rumeno-zeleno barve, ženski cvetovi pa so zrashi v značilna podolgovata socvetja – storžke (Slika 1). Prav storžki ženskih rastlin hmelja so glavni hmeljarski proizvod, saj so bogati z lupulinskimi žlezami, v katerih se tvorijo smole, eterična olja in tanini (Neve, 1991).



Slika 1: Hmelj – *Humulus lupulus L.* (von Schubert, 1887)

Figure 1: Hop – *Humulus lupulus L.* (von Schubert, 1887)

### 2.1.2 Uporaba hmelja

Hmelj se primarno goji za uporabo v pivovarstvu, saj storžki predstavljajo bistveno sestavino za okus in konzerviranje pri produkciji piva. Smole, ki nastajajo v lupulinskih žlezah, vsebujejo  $\alpha$ - in  $\beta$ -kisline, ki so s pivovarskega stališča ključnega pomena, saj dajejo pivu značilno grenkobo in hkrati delujejo kot konzervans (Neve, 1991). Prav tako pomembna je vsebnost in sestava eteričnega olja, ki prispeva k aromi in okusu piva in v kombinaciji z vsebnostjo  $\alpha$ - in  $\beta$ -kislin določa kvaliteto hmeljnega pridelka. V lupulinskah žlezah nastajajo tudi tanini (vodotopni polifenoli), ki reagirajo s proteini, pri čemer se v pivu tvori nezaželena netopna oborina – 'meglica' in so zato s pivovarskega stališča manj zaželeni (Neve, 1991).

Hmelj se uporablja tudi v farmaciji, kot tradicionalno sredstvo za pomiritev in pomoč pri spanju (Final..., 2014), v zadnjih letih pa je bilo iz hmelja izoliranih tudi več spojin, ki izkazujejo zanimive in koristne biološke lastnosti – od antioksidantitvnih, protimikrobnih in protivnetnih učinkov do zaviranja raka in zmanjševanja osteoporoze ter debelosti (van Cleemput in sod., 2009; Kirkwood in sod., 2013; Li J. in sod., 2015).

Letna produkcija hmelja v letu 2016 je po podatkih Mednarodnega zborna pridelovalcev hmelja (IHGC ..., 2016) ocenjena na 100.568 ton, gojijo pa ga na 54.614 hektarih. Države, ki so največje pridelovalke hmelja, so podane v Preglednici 2.

Preglednica 2: Glavne pridelovalke hmelja v letu 2016 (IHGC ..., 2016)

Table 2: Top hop producers in 2016 (IHGC ..., 2016)

država	površina [Ha]	pridelek [t]	delež svetovnega pridelka [%]
ZDA	21.534	41.500	41,3
Nemčija	18.598	35.670	35,5
Češka	4.783	6.000	6,0
Kitajska	2.000	4.500	4,5
Poljska	1.524	2.557	2,5
Slovenija	1.484	2.550	2,5

### 2.1.3 Bolezni hmelja

Pridelavo hmelja ovirajo različni škodljivci in bolezni. V prilogi Uradnega lista (Pravilnik o trženju ..., 2013) je med nadzorovanimi hmelju škodljivimi organizmi navedenih 5 insektnih in 5 nematodnih škodljivcev ter 7 glivnih (v resnici 5 glivnih in 2 oomicetni, op. a.), 1 bakterijsko, 9 virusnih in 2 viroidni obolenji. Od tega med najbolj škodljiva obolenja hmelja v svetovnem merilu sodijo hmeljeva peronospora, hmeljeva pepelovka ter verticilijska uvelost hmelja (Neve, 1991; Radišek in sod., 2008).

Povzročiteljica hmeljeve peronospore je oomiceta *Pseudoperonospora humuli*. Bolezenska znamenja obsegajo rumeno pegavost listov, ki jih na spodnji strani prekrije plesniva prevleka, rjavenje in odpadanje cvetov in iznakaženje storžkov, pride pa lahko tudi do sistemsko okužbe celotne rastline (Celar, 2016a).

Hmeljevo pepelovko povzroča gliva *Podosphaera macularis* (prej znana kot *Sphaerotheca humuli*). Glavno bolezensko znamenje je pepelnata plesniva prevleka, ki se lahko pojavi na mladih poganjkih, na listih ter na cvetovih in mladih storžkih, ki so na pepelovko še posebej občutljivi in zaradi okužbe postanejo iznakaženi in odpadejo (Celar, 2016b).

Glavna povzročiteljica verticilijske uvelosti hmelja je gliva *Verticillium nonalfafae* (s starim poimenovanjem *Verticillium albo-atrum*, več v poglavju 2.2.1), v manjši meri pa jo povzroča tudi sorodna gliva *Verticillium dahliae* (Radišek in sod., 2006; Neve, 1991). Za razliko od povzročiteljic peronospore in pepelovke je gliva *V. nonalfafae* talna gliva, ki vstopi v rastlino skozi korenine in se po okužbi preko koreninskega sistema naseli v ksilemskem tkivu gostiteljske rastline ter povzroča venenje, listne kloroze in nekroze ter končno odmrtje rastline (Pegg in Brady, 2002; Neve, 1991). Verticilijska uvelost hmelja, s katero smo se ukvarjali v pričujočem doktorskem delu, je podrobnejše opisana v poglavju 2.2.

## 2.1.4 Sorte hmelja

Zgodovinsko je postopna selekcija lokalnih sort divjega hmelja v posameznih pridelovalnih pokrajinah vodila v razvoj tradicionalnih kultivarjev hmelja, npr. Fuggle in Golding v Angliji, Saazer na Češkem, Tettnanger in Hallertauer v Nemčiji itd. (Neve, 1991; Štajner in sod., 2008), pri čemer velja omeniti, da gre v primeru Savinjskega Goldinga pravzaprav za ekotip angleškega kultivarja Fuggle (Neve, 1991; Šuštar-Vozlič in Javornik, 1999). Ker sta bila glavna kriterija selekcije pri tradicionalnih evropskih kultivarjih aroma in izgled, gre pri teh kultivarjih za izrazito aromatične sorte (Neve, 1991; Šuštar-Vozlič in sod., 2002).

Za razliko od tradicionalnih evropskih kultivarjev, so tradicionalni ameriški kultivarji (Clusters) hibridi med evropskimi kultivarji in ameriškim divjim hmeljem (Neve, 1991), kar so potrdile tudi genetske analize (Štajner in sod., 2008). Tradicionalni ameriški kultivarji hmelja imajo visoko vsebnost smol oz. grenčičnih kislin in so zato izrazito grenkega karakterja ter imajo boljšo skladnično obstojnost (Neve, 1991).

Tako se je žlahtnenje hmelja razvilo v dve smeri – k *aromatičnim sortam* (ang. aroma hops), pri katerih je bil cilj sklopiti odlično aroma z izboljšanimi agronomskimi lastnostmi in odpornostjo na bolezni, in h *grenčičnim sortam* (ang. bitter hops), s ciljem sklopiti visoko vsebnost smol s cenjeno evropsko aromo in prav tako boljšim donosom in odpornostjo na škodljivce (Neve, 1991). V zadnjem času se je pojavil nov trend žlahtnenja hmelja, z vzgojo t. i. *dišavnih sort* (ang. flavour hops), za katere je značilna drugačna sestava eteričnega olja z zmanjšanim hmeljskim značajem aromе, kar se v pivu pripravljenim s tovrstnim hmeljem odraža v obliki sadnih okusov (Čerenak in Košir, 2012).

### 2.1.4.1 Kultivarja Celeia in Wye Target

V pričujoči doktorski nalogi smo se ukvarjali z dvema kultivarjem hmelja – z domačim kultivarjem Celeia in z angleškim kultivarjem Wye Target (Preglednica 3). Najpomembnejša značilnost izbranih kultivarjev v povezavi z našim eksperimentom je odpornost na verticilijsko uvelost – medtem ko gliva povzroči zelo huda bolezenska znamenja na kultivarju Celeia, so ti pri odpornem kultivarju Wye Target praktično odsotni (Radišek in sod., 2003).

Kultivar Celeia je triploidna aromatična sorta hmelja, ki je bila požlahtnjena v Sloveniji na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo v Žalcu in priznana v letu 1990 (Šuštar-Vozlič in sod., 2002). Gre za križanca med autotetraploidnim Savinjskim Goldingom in diploidnim moškim hmeljem z oznako 105/58, ki je večkratni križanec slovenskega izvora (Šuštar-Vozlič in sod., 2002; Katalog sort ..., 2012). Kultivar je zelo priljubljen med pridelovalci, saj ga odlikujejo zelo dobre organoleptične (razmerje in sestava arom in grenčic) ter agronomski lastnosti (pridelava, spravilo), žal pa ni odporen na verticilijsko uvelost in ima le srednjo stopnjo odpornosti na hmeljevo peronosporo in pepelovko (Katalog sort ..., 2012).

Kultivar Wye Target je grenčična sorta hmelja, ki jo odlikuje predvsem visoka stopnja odpornosti na verticilijsko uvelost in na pepelovko, medtem ko ima slabo odpornost na peronosporo (Neve, 1991, Preglednica 3). Kultivar je bil požlahtjen leta 1972 na Wye College v angleški pokrajini Kent s križanjem na peronosporo odpornega potomca kultivarja Northern Brewer z na verticilijsko uvelost in na pepelovko odpornim križancem med kultivarjem Eastwell Golding in ameriško divjo sorto hmelja (Neve, 1991). Prav omenjena ameriška divja sorta hmelja predstavlja vir odpornosti na verticilijsko uvelost, kar je podrobneje opisano v poglavju 2.2.5. Tudi kasnejša genetska analiza je pokazala, da v kultivarju Wye Target prevladuje severnoameriška dednina (Štajner in sod., 2008; Šuštar-Vozlič in Javornik, 1999). Agronomski lastnosti kultivarja so v primerjavi s Celeio manj ugodne (pozna zrelost in slaba skladiščna obstojnost – Preglednica 3).

Preglednica 3: Lastnosti obravnavanih hmeljnih kultivarjev Celeia in Wye Target (Katalog sort ..., 2012; Neve, 1991)

Table 3: Characteristics of hop cultivars Celeia and Wye Target (Katalog sort ..., 2012; Neve, 1991)

	Celeia	Wye Target
odpornost na verticilij	slaba	dobra
odpornost na pepelovko	srednja	dobra
odpornost na peronosporo	srednja	slaba
vsebnost α-kislin (%)	3,0 - 6,5	9,5 - 13
razmerje α-/β-kislin	1,8	2,2
vsebnost et. olja (ml/100g)	1,5 - 3,6	1,4
aroma	zelo dobra	srednje dobra
pridelek	zelo dober	srednje dober
tehnološka zrelost	srednje zgodnja	pozna
skladiščna obstojnost	zelo dobra	slaba

## 2.1.5 Genom hmelja

Velikost genoma hmelja v diploidnih ženskih rastlinah je bila ocenjena s pretočno citometrijo na 5,6 pikogramov (Grabowska-Joachimiak in sod., 2011; Natsume in sod., 2014) oziroma na približno 2,57 Gbp za haploidni genom (Natsume in sod., 2014).

Ker hmelj ne spada med modelne rastline za genetske raziskave, je v podatkovnih zbirkah na voljo veliko manj hmeljnih nukleotidnih zaporedij ter podatkov o njihovi funkciji v primerjavi z modelnimi rastlinami. Zaradi tega so genetske raziskave na hmelju otežene glede na modelne rastline, kot je na primer navadni repnjakovec (*Arabidopsis thaliana*), pri katerem so poleg večje količine podatkov, vključno z dobro anotiranim genomom, na voljo tudi specifična bioinformatska orodja in laboratorijske metode (npr. mikromreže), ki močno olajšajo genetske analize. Funkcije genov ne-modelnih rastlin so v veliki večini avtomatsko izpeljane na podlagi podobnosti nukleotidnih zaporedij z zaporedji genov

modelnih rastlin, kjer so bile funkcije dokazane, to pa lahko vodi v nepopoln ali napačen pripis funkcije (Furnham in sod., 2009).

Metode sekvenciranja naslednje generacije (NGS, ang. next generation sequencing) so z močnim znižanjem stroškov in količine dela omogočile sekvenciranje celotnih genomov tudi ne-modelnih rastlin. Za primerjavo, strošek sekvenciranja človeškega genoma je s 100.000.000 USD leta 2001 padel pod 1.000 USD v letu 2014 (van Dijk in sod., 2014), torej se je v manj kot 15 letih zmanjšal kar za 100.000 krat.

Tekom pričajoče doktorske naloge je bil objavljen tudi osnutek hmeljnega genoma (Natsume in sod., 2014), katerega sekvenciranje je bilo financirano s strani japonske korporacije Suntory, ki ima med drugim v lasti tudi več blagovnih znamk piva. V članku avtorji poročajo o sekvenciranju genomov in transkriptomov dveh kultivarjev hmelja (Shinshu Wase in Saazer) ter genoma japonske divje sorte hmelja.

Genomska zaporedja kultivarja Shinshu Wase so bila kmalu po objavi omenjenega članka (Natsume in sod., 2014) dostopna tudi v preglednejši obliki v podatkovni zbirki HopBase, pripravljeni s strani Oregon State University (HopBase ..., 2015). Poglavitna prednost te podatkovne zbirke je, da so genomska zaporedja anotirana s predvidenimi geni, ki jih avtorji originalnega članka (Natsume in sod., 2014) niso dali v javni dostop. Takšne anotacije močno olajšajo transkriptomsko analizo diferenčnega izražanja genov, zato smo v naši raziskavi uporabili genom Shinshu Wase iz omenjene podatkovne zbirke.

Kultivar Shinshu Wase (kot tudi njegova klonska selekcija Kirin) je priljubljena sorta hmelja na Japonskem in po genetskih analizah spada v skupino sort hmelja s pretežno severnoameriško dednino, v katero spada tudi kultivar Wye Target (Štajner in sod., 2008; Šuštar-Vozlič in Javornik, 1999), poleg tega pa je, tako kot Wye Target, tudi Shinshu Wase odporen na verticilijsko uvelost (Shinshuwase ..., 2007). Zaradi te podobnosti smo ocenili, da je objavljeni hmeljni genom še posebej primeren za uporabo kot referenčni genom v naši raziskavi.

Genom Shinshu Wase iz podatkovne baze HopBase obsega 1,81 Gbp, v obliki 292.698 ogrodnih nukleotidnih zaporedij s povprečno dolžino 6.192 bp. Število ogrodnih zaporedij v osnutku hmeljnega genoma je zelo visoko – za primerjavo, genom modelne rastline repnjakovca (*Arabidopsis thaliana*) obsega 135 Mbp, vendar vključuje le 5 ogrodnih nukleotidnih zaporedij, ki ustrezajo posameznim kromosomom, njihova povprečna dolžina pa je 26,9 Mbp (TAIR ..., 2010). V primerjavi z genomom *A. thaliana* je torej genom hmelja še zelo pomanjkljivo sestavljen, vendar to na analizo diferenčnega izražanja genov ne bi smelo imeti večjega vpliva, saj nas v tem primeru zanimajo predvsem zaporedja posameznih genov in ne daljša zaporedja.

Genom Shinshu Wase je v podatkovni zbirki HopBase anotiran z 46.735 geni. To število je primerljivo s številom genov v *A. thaliana*, ki jih vsebuje 41.671 (pri 66 % od teh gre za gene, ki kodirajo proteine; TAIR ..., 2016).

## 2.2 VERTICILIJSKA UVELOST HMELJA

### 2.2.1 Gliva *Verticillium nonalfalfa* (V. *albo-atrum*)

Glavna povzročiteljica verticilijske uvelosti hmelja, ene najbolj uničajočih bolezni v evropski pridelavi hmelja, je gliva *Verticillium nonalfalfa* Inderb. (verticiljsko uvelost hmelja sicer v manjši meri povzroča tudi gliva iz istega rodu, *Verticillium dahliae* Kleb.). Gliva *V. nonalfalfa* je bila predhodno znana kot *Verticillium albo-atrum* Reinke & Berthold, a je bila na podlagi podrobne filogenetske analize preimenovana (Inderbitzin in sod., 2011). Novo ime je bilo sprejeto tudi s strani strokovne skupnosti in uporaba le-tega se priporoča v vseh novih objavah v povezavi s to glivo (EFSA Panel on Plant Health, 2014). Zato bo tekom pričajoče doktorske disertacije uporabljano novo ime glive *V. nonalfalfa*, četudi v naslovu ostaja staro poimenovanje.

Rod gliv *Verticillium* (verticiliji) je dobil ime po vretenasti obliki konidioforov (vretence, lat. *verticillius*) in vključuje manjšo skupino pomembnih rastlinskih patogenov, ki povzročajo veliko gospodarsko škodo (Marton in Radišek, 2015). Rod *Verticillium* sensu stricto spada v deblo Ascomycota (zaprtotrosnice) in v družino Plectosphaerellaceae, in obsega 10 vrst, ki so vsi rastlinski patogeni in povzročajo verticilijsko uvelost na različnih gostiteljskih rastlinah iz skupine dvokaličnic (Inderbitzin in sod., 2011; Marton in Radišek, 2015; Pegg in Brady, 2002).

Glive rodu *Verticillium* imajo zmožnost tvorbe trajnih organov, zaradi česar so še posebej problematične z agronomskoga stališča, saj jim to omogoča večletno preživetje v tleh in s tem ponavljanjo se okuževanje gostiteljskih rastlin (Marton in Radišek, 2015; Pegg in Brady, 2002).

### 2.2.2 Patogeneza in bolezenska znamenja verticilijske uvelosti

Značilnost gliv iz rodu *Verticillium* je, da se naselijo v prevodnem tkivu rastlin in med drugim povzročajo njihovo venenje, zaradi česar se bolezen imenuje verticilijska uvelost. Ker ima ksilemsko prevodno tkivo zelo nizko vsebnost hranilnih snovi, so glive rodu *Verticillium* na to posebej prilagojene. Njihovi genomi so namreč obogateni z geni za encime za razgradnjo pektina in za metabolizem ogljikovih hidratov, geni za sintezo aminokislin ter geni za druge metabolne poti, ki jim omogočajo rast v takšnih razmerah (Klimes in sod., 2015).

Razvojni krog gliv rodu *Verticillium* se v grobem deli na dormantno, parazitsko in saprofitsko fazo (Radišek, 2004; Fradin in Thomma, 2006). V dormantni fazi je gliva v tleh prisotna v obliki trajnih organov, ki ji omogočajo preživeti več let tudi v neugodnih okoljskih razmerah. Pri glivi *V. nonalfalfa* trajne organe predstavlja temen, melaniziran micelij, ki omogoča preživetje v tleh do štiri leta (Sewell in Wilson, 1966). Do prekinitev dormantne faze pride, ko gliva ob zaznavi koreninskih izločkov prepozna bližino gostiteljske rastline in se začne razraščati ter tvoriti hife (Pegg in Brady, 2002; Fradin in Thomma, 2006).

Prehod glive v parazitsko fazo je zaznamovan z okužbo korenin. Korenine za razliko od nadzemnih delov nimajo kutikule, zato pa imajo dve zaščitni plasti v obliki eksodermalnega in endodermalnega tkiva, ki sta lahko dodatno zaščiteni s Kasparijevim trakom, plastjo pretežno ligninske sestave (de Coninck in sod., 2015). Endodermalne celice lahko vsebujejo tudi suberin, ki igra pomembno vlogo pri preprečevanju vstopa patogenih mikroorganizmov v rastlino (Talboys, 1958a). Do okužbe zato pride predvsem na mestih predhodnih poškodb koreninskih laskov in na mestih koreninskih vršičkov, torej na mestih, kjer endodermalno tkivo, ki bi ga gliva sicer morala prečkati za vstop v ksilem, še ni razvito ali pa je poškodovano (Pegg in Brady, 2002). Do vstopa v ksilem običajno pride v dveh do štirih dneh po infekciji, gliva pa nato tvori konidije, ki pasivno hitro napredujejo s tokom rastlinskega ksilemskega soka navzgor po steblu (Sewell in Wilson, 1964). Potovanje konidijev se ustavi pri horizontalnih ksilemskih preprekah, zato se gliva na teh mestih začne ponovno razraščati in tvoriti hife, s čimer premaga prepreko in nadaljuje kolonizacijo s ponovno tvorbo konidijev, ki glivi omogočajo hitrejše širjenje. Na podoben način lahko gliva napreduje tudi v sosednje ksilemske žile in postopoma okuži vso rastlino (Pegg in Brady, 2002; Fradin in Thomma, 2006). Do sistemsko okužbe in razvoja očitnih bolezenskih znamenj v primeru verticilijske uvelosti hmelja pride po približno 20 do 30 dneh, medtem ko začne glivna biomasa v koreninah po približno 10 dneh upadati (Cregeen in sod., 2015).

V poznih stadijih bolezni, ko pride do tvorbe nekroz in odmiranja rastline, govorimo o prehodu glive v saprofitsko fazo. Šele v tej fazi gliva zapusti ksilemsko prevodno tkivo in kolonizira tudi preostala rastlinska tkiva (Talboys, 1972). V tej fazi gliva tvori tudi trajne organe, ki ji omogočajo preživetje v tleh, s čimer je razvojni krog sklenjen (Pegg in Brady, 2002; Radišek, 2004).

Bolezenska znamenja v primeru verticilijske uvelosti hmelja obsegajo rumenenje, kloroze in nekroze listov predvsem med listnimi žilami in na robovih, ter njihovo venenje; listi se vihajo navzgor in odpadajo (Slika 2); pojavi se rjavenje prevodnega tkiva, ki je opazno ob prerezu steba. Pri blagi obliki bolezni se lahko pojavi debeljenje stebel, pri letalni obliki pa izrazito venenje in sušenje ter propad celotne rastline tekom nekaj mesecev (Neve, 1991; Radišek, 2004; Pegg in Brady, 2002). Ali pride do venenja zaradi mašenja žil na račun nabiranja glivne biomase ali zaradi toksične aktivnosti glivnih produktov, še ni razjasnjeno.

### 2.2.3 Blaga in letalna oblika verticilijske uvelosti hmelja

Kot je bilo omenjeno že v prejšnjem poglavju, poznamo pri hmelju dve obliki verticilijske uvelosti: blago, v kateri pride do razvoja nekaterih bolezenskih znamenj, vendar rastline preživijo, in letalno (smrtno), ki vodi do propada okuženih rastlin, se zelo hitro širi in povzroča velike izpade pridelka (EPPO Standard ..., 2007; Radišek, 2004; Neve, 1991).

Prva poročila o bolezni segajo v leto 1924, ko se je v blagi obliki pojavila v Angliji v pokrajini Kent (Harris, 1927), le nekaj let pozneje, leta 1933, pa ji je sledil izbruh letalne oblike, ki je v sledečih letih povzročil veliko gospodarske škode (Neve, 1991). V Sloveniji se je bolezen v blagi obliki prvič pojavila leta 1974, medtem ko je leta 1997 prišlo do

izbruha letalne oblike in hitrega širjenja bolezni v zahodnem delu Savinjske doline (Radišek in sod., 2003). Do izbruha letalne oblike bolezni je prišlo tudi v Nemčiji leta 2005 (Seefelder in sod., 2009).

Za določitev razvoja blage ali letalne oblike verticilijske uvelosti hmelja so odločilnega pomen trije faktorji: stopnja odpornosti hmeljne sorte, stopnja virulence glivnega seva ter okoljski faktorji (Sewell in Wilson, 1984; Radišek in sod., 2006). Okolje ima pri tem najmanjši vpliv na razvoj bolezni in pride do izraza le v primerih okužb hmelja z manj virulentnim sevom glive ali v primerih okužb odpornejših sort z bolj virulentnim sevom, kaže pa se v obliki izrazitejših bolezenskih znamenj v primeru nizkih spomladanskih temperatur tal (Talboys, 1972; Neve, 1991).



Slika 2: Bolezenska znamenja verticilijske uvelosti hmelja

Primer na neodpornem kultivarju Celeia, na levi strani je zdrava rastlina hmelja, na desni pa rastlina, okužena z glivo *V. nonalfafae*.

Figure 2: Symptoms of *Verticillium* wilt on hop

Example of susceptible cultivar Celeia; a healthy plant is shown on the left and a plant, infected with *V. nonalfafae* on the right.

Vpliv virulence seva glive *V. nonalfafae* na potek verticilijske uvelosti hmelja sta raziskovala že Isaac in Keyworth (1948), ki sta povezala patotip M (ang. mild) z razvojem blage oblike in patotip PV1 (ang. progressive virulent) z razvojem letalne oblike bolezni. V kasnejših poskusih sta bila določena še dva dodatna in še bolj virulentna patotipa glive, PV2 in PV3 (Sewell in Wilson, 1984; Clarkson in Heale, 1985). Sevi glive *V. nonalfafae*, izolirani v Sloveniji, se delijo na patotipa PG1 in PG2, pri čemer se razlika med patotipoma jasno odraža tudi na genetskem nivoju (Radišek in sod., 2003; Radišek, 2004). Sev PG1 je manj virulenten in povzroča blažjo obliko verticilijske uvelosti hmelja, PG2 pa je bolj virulenten in povzroča letalno obliko bolezni. Letalni sevi glive *V. nonalfafae* so

bili do leta 1997, ko se je letalna oblika bolezni pojavila v Sloveniji, omejeni na angleške hmeljarske regije; zato so Radišek in sod. (2006) raziskali izvor slovenskega letalnega seva PG2, ki po stopnji virulence ustreza angleškemu patotipu PV1 (Radišek, 2004) in pokazali, da se je slovenski letalni sev razvil neodvisno, da torej ni bil prenešen iz angleških hmeljišč. Pri tem so opozorili na možnost spontanega pojavljanja novih virulentnih sevov tudi v prihodnje.

Zelo pomembno vlogo pri razvoju bolezni igra tudi stopnja odpornosti sorte hmelja na verticilijsko uvelost (poglavlje 2.2.5). Žlahtnjenje hmelja v smeri odpornosti se je v praksi izkazalo kot zelo pomembno, saj je predstavljalo edino možnost nadaljevanja pridelave hmelja na področjih, okuženih z letalno obliko bolezni (Neve, 1991). Pri tem je zanimivo, da niti najbolj odporne sorte niso povsem imune na glivo, saj tudi pri teh lahko pride do okužbe, a brez razvoja bolezenskih znamenj.

#### **2.2.4 Ukrepi za preprečevanje verticilijske uvelosti hmelja**

Nekateri fungicidi sicer imajo zaviralni učinek na glive rodu *Verticillium* v laboratorijskih pogojih, vendar se je na poljskih poskusih pokazalo, da v praksi niso učinkoviti (Crowe in Parks, 2001), kar gre pripisati predvsem razlogu, da se sistemski fungicidi znotraj rastline prenašajo le v smeri navzgor in tako ne dosežejo glive, ki lahko v rastlini vstopa globoko v koreninah (Neve, 1991; Pegg in Brady, 2002). Zato ostaja najučinkovitejši način spoprijemanja z verticilijsko uvelostjo hmelja uporaba odpornih kultivarjev ob hkratnih strogih fitosanitarnih ukrepih (Neve, 1991; Radišek, 2006; Jakše in sod., 2013; Daayf, 2015). Med leti 2001 in 2014 je bila v Sloveniji verticilijska uvelost hmelja zaradi hitrega širjenja obravnavana karantensko, ukrepi za nadzor in fitosanitarni ukrepi pa so bili predpisani v Uradnem listu RS (Odredba ..., 2001; Pravilnik o prenehanju ..., 2014).

Nevarnost za širitev glive *V. nonalfalfa* tiči predvsem v okuženih ostankih rastlinskega materiala in prsti v bližini okuženih rastlin, ki se raznašajo znotraj hmeljišč in med njimi pretežno v smeri agrotehnične obdelave, na primer preko mehanskega prenosa z orodjem in obutvijo, ali pa celo preko okuženega sadilnega materiala (Neve, 1991; Radišek, 2006).

Najpomembnejši higienski ukrepi za preprečevanje verticilijske uvelosti v hmeljiščih so redno odstranjevanje in uničevanje obolelih rastlin, ustrezno razkuževanje kmetijskih strojev in opreme ter termična obdelava hmeljevine s kompostiranjem (Radišek, 2006; Neve, 1991). Posamezne obolele rastline in rastline v njihovi neposredni okolini je potrebno izkopati in uničiti s sežigom še pred množičnim odpadanjem listja, v primeru hujše okužbe celotnega nasada pa je potrebno rastline v nasadu uničiti s herbicidom, izorati in uničiti s sežigom ali ustrezno deponirati (Radišek, 2006). Vso obdelovalno opremo, ki je v stiku z rastlinami in zemljo (rezalniki, traktorska kolesa, čevlji itd.) je potrebno iz preventivnih razlogov očistiti in razkužiti, vso odpadno hmeljevino pa je potrebno mehansko zdrobiti in kompostirati na tak način, da se celotna masa segreje na vsaj 60 °C, kolikor je potrebno za uničenje glive (Radišek, 2006).

Ker gliva tvori trajne organe (melaniziran micelij), lahko v okuženem nasadu preživi v tleh tudi do štiri leta, zaradi česar je potrebna sanacija okuženih hmeljišč s karantensko

premeno (Radišek, 2006; Neve, 1991). Karantenska premena vključuje pridelovanje negostiteljskih rastlin (žita in trave) in zatiranje širokolistnega plevela na okuženih hmeljiščih vsaj štiri leta po odstranitvi okuženih rastlin (Radišek, 2006). Na okuženih hmeljiščih je priporočena tudi omejitev rabe dušičnih gnojil, ki ob prekomerni uporabi lahko spodbujajo razvoj bolezni (Radišek, 2006; Neve, 1991).

### 2.2.5 Raziskave genetske odpornosti na verticilijsko uvelost

V hmelju sta znana dva izhodiščna vira odpornosti, in sicer iz dveh ameriških divjih sort hmelja (*H. lupulus* var. *neomexicanus*) z oznakama Y 90 in AA 7 (Darby, 2001). Za vir odpornosti iz sorte Y 90 je bilo ob analizi stopnje odpornosti potomcev ocenjeno, da gre za aditivni genski učinek oziroma za poligencko lastnost, ki je zato manj zanimiva za nadaljnje žlahtnjenje. Pri viru odpornosti iz sorte AA 7, ki je bil uporabljen pri žlahtnjenju kultivarja Wye Target in celotnem nadalnjem angleškem programu žlahtnjenja hmelja, pa je bilo na podlagi analize segregacijskih razmerij potomcev križanja določeno, da odpornost temelji na delovanju dveh komplementarnih dominantnih genov, kar potrjuje tudi relativno konstanten nivo odpornosti skozi več generacij potomcev (Darby, 2001).

Nedavno je bila pri hmelju opravljena genetska raziskava vira odpornosti na verticilijsko uvelost na F1 generaciji potomcev križanja odpornega kultivarja Wye Target in neodporne sorte hmelja BL2/1, pri kateri je bila ocenjena stopnja bolezenskih znamenj in izvedeno kartiranje kvantitativnih lokusov (QTL, ang. quantitative trait locus; Jakše in sod., 2013). Na ta način je bila identificirana pomembna QTL regija, povezana z odpornostjo na verticilijsko uvelost, ki pojasnjuje med 24,2 in 26,0 % fenotipske variabilnosti bolezenskih znamenj in potrjuje delovanje več kot enega gena. Pri tem sicer ni znano, koliko genov je zajetih v omenjeni QTL regiji, a segregacijska analiza F1 generacije križanja je bila skladna z omenjenim Darbyjevim modelom delovanja dveh komplementarnih dominantnih genov in kaže na verjetno vključenost vsaj enega od genov v omenjeni QTL regiji (Jakše in sod., 2013; Darby, 2001).

Mehanizem genetske odpornosti na verticilij je najbolje raziskan na primeru interakcije paradižnika z glivo *Verticillium dahliae*, kjer je za odpornost odgovoren Ve lokus, ki je bil s križanjem vnešen v komercialne kultivarje paradižnika že leta 1951 (Schaible in sod., 1951). Lokus Ve je bil kartiran leta 1999 (Diwan in sod., 1999), kmalu zatem pa so Kawchuk in sod. (2001) s pozicijskim kloniranjem iz lokusa Ve izolirali dva blizu ležeča, drug drugemu nasprotno obrnjena gena, Ve1 in Ve2, ter ugotovili, da predstavljata genski zapis za membranska receptorska proteina z zunaj-celično LRR domeno (ang. leucine-rich repeat, z leucinom bogata ponovitev); takšni receptorji so tipični za prepoznavo efektorskih proteinov (poglavje 2.3.1.2). Kasneje je bilo pokazano, da je za obrambo pred verticilijem odgovoren le receptor Ve1 (Fradin in sod., 2009) in sicer s sproženjem signalne kaskade ob asociaciji z receptorskimi kinazo SERK3/BAK1, ki deluje kot ko-receptor, in nadaljnjo aktivacijo signalnih komponent NDR1 in EDS1, kar vodi v uspešen obrambni odziv rastline (Fradin in sod., 2009; Fradin in sod., 2011). Omenjeni mehanizem omogoča odpornost le proti določenim sevom gliv *V. dahliae* in *V. albo-atrum*. To je prispevalo k identifikaciji glivnega efektorskega proteina Ave1, ki ga prepoznavata receptor Ve1 in je

ključnega pomena za aktivacijo odpornosti preko tega obrambnega mehanizma (de Jonge in sod., 2012).

Homologi receptorja Ve1 so bili identificirani v številnih rastlinah (poleg paradižnika npr. še v krompirju, jajčevcu, tobaku, bombaževcu, trti, solati itd.), kar kaže na starodaven izvor tega receptorja (Song in sod., 2016). Tudi v hmelju sta bila odkrita dva homologa Ve1, z 52 % in 51 % podobnostjo, in pokazano je bilo, da v listu tobakovca eden od homologov ob ko-ekspresiji z efektorjem Ave1 lahko sproži hiper-senzitivni odziv (Song in sod., 2016). Kljub temu, da hmelj vsebuje funkcionalni homolog Ve1, pa le-ta najverjetneje ni vključen v obrambo hmelja pred glivo *V. nonalfafae*, saj v sevih, ki okužujejo hmelj, ni bilo mogoče najti zaporedij gena za efektor Ave1.

Več raziskav kartiranja kvantitativnih lokusov za odpornost na verticilijsko uvelost je bilo narejeno tudi pri bombaževcu (*Gossypium hirsutum*), kjer to bolezen povzroča gliva *V. dahiae*. Tako je bila pri križanju odpornega in neodpornega kultivarja bombaževca večina regij QTL kartiranih na dve kromosomalni regiji, kar kaže na to, da odpornost na verticilij verjetno določa delovanja dveh ali več poglavitnih genov (Jiang in sod., 2009). Yang in sod. (2008) so pri križanju odpornega kultivarja bombaževca *Gossypium barbadense* z neodpornim kultivarjem bombaževca *G. hirsutum* identificirali 9 regij QTL za odpornost na verticilij, ki pojasnjujejo med 10,63 in 28,83 % fenotipske variabilnosti (Wang in sod., 2008).

Regije QTL za odpornost na verticilijsko uvelost so bile identificirane še v nekaterih drugih kulturnih rastlinah. Tako so na primer Rygulla in sod. (2008) pri oljni ogrščici (*Brassica napus*) odkrili dve večji in dve manjši regiji QTL za odpornost na glivo *V. longisporum*, Hayes in sod. (2011) pa so pri solati (*Lactuca sativa*) pri analizi QTL kartirali gen za odpornost na glivo *V. dahiae*, ki so ga poimenovali *Vr1* in ki si deli sekvenčno podobnost z genom *Ve1* iz paradižnika.

## 2.3 MEHANIZMI RASTLINSKE ODPORNOSTI

### 2.3.1 Splošni mehanizmi rastlinske odpornosti

Preden v naslednjih poglavjih preidemo k opisom znanih rastlinskih odzivov na glive rodu *Verticillium*, so v tem poglavju predstavljeni nekateri splošni koncepti rastlinske obrambe pred boleznimi in škodljivci.

Rastlinska obramba oz. rastlinska imunost je v veliki meri odvisna od avtonomnega odziva posameznih celic, ki je podoben odzivu prirojenega imunskega sistema pri živalih (Dodds in Rathjen, 2010). V grobem imajo rastlinske celice dve strategiji za zaznavo patogenih organizmov. Prva, imunost sprožena z molekularnimi vzorci, značilnimi za patogene, se odvija pretežno na površini celic ter skrbi za prepoznavo in odziv na široko paleto mikroorganizmov; druga, imenovana imunost sprožena z efektorji, pa se odvija pretežno v notranjosti rastlinskih celic in skrbi za prepoznavo specifičnih patogenov ter vodi v koevolucijsko dinamiko med gostiteljem in patogenom (Jones J. D. G. in Dangl, 2006;

Dodds in Rathjen, 2010). Strategiji sta nekoliko obširneje predstavljeni v poglavjih 2.3.1.1 in 2.3.1.2.

Informacija o prepoznavi patogena pa vseeno ni omejena izključno na posamezne celice – s pomočjo rastlinskih hormonov namreč poteka signalizacija o okužbi med sosednjimi celicami in različnimi tkivi in lahko vodi v t. i. sistemsko pridobljeno odpornost (Spoel in Dong, 2012). Pri obrambni signalizaciji poznamo dve glavni poti, pot salicilne kisline ter pot jasmonske kisline in etilena (Spoel in Dong, 2012). Ta vidik rastlinske obrambe je opisan v poglavju 2.3.1.3.

### 2.3.1.1 Imunost sprožena z molekularnimi vzorci, značilnimi za patogene

Najbolj osnovno raven rastlinske obrambe pred patogenimi mikroorganizmi predstavlja imunost sprožena z molekularnimi vzorci, značilnimi za patogene (PTI, ang. PAMP-triggered immunity), ki temelji na prepoznavi molekularnih vzorcev, ki so značilni za patogene mikroorganizme (PAMP, ang. pathogen-associated molecular patterns; Jones J. D. G. in Dangl, 2006; Dodds in Rathjen, 2010). Med takšne molekularne vzorce sodita na primer bakterijski flagelin in hitin iz gliv. V skupino molekularnih vzorcev, ki lahko izzovejo to vrsto imunosti, sodijo tudi tisti, ki izvirajo iz rastline same in se sproščajo ob poškodbah rastlinskega tkiva zaradi napredovanja patogenega mikroorganizma (Dodds in Rathjen, 2010; de Coninck in sod., 2015; Cook in sod., 2015). Takšni molekularni vzorci (DAMP, ang. damage-associated molecular patterns) so med drugim delci razgrajenih celičnih sten ali kutikule.

Pri zunajcelični zaznavi molekularnih vzorcev PAMP igrajo ključno vlogo t. i. receptorji za prepoznavo vzorcev (PRR, ang. pattern recognition receptor; Dodds in Rathjen, 2010; Jones J. D. G. in Dangl, 2006; Cook in sod., 2015). PRR se pojavljajo v dveh glavnih oblikah: kot trans-membranske receptorjem-podobne kinaze (RLK, ang. receptor-like kinases) in trans-membranski receptorjem-podobni proteini (RLP, ang. receptor-like proteins). Oboji vsebujejo zunajcelični del za prepoznavo in trans-membranski del, razlikujejo pa se v tem, da RLP ne vsebujejo kinazne signalizacijske domene (Dodds in Rathjen, 2010; Toer in sod., 2009). Ker ti receptorji prepoznavajo ohranjene molekularne vzorce, so tudi sami manj podvrženi evolucijskemu sprememjanju, kljub temu pa se jih je v rastlinah razvilo mnogo več (v repnjakovcu je bilo prepoznanih 610 RLK in 57 RLP) v primerjavi z živalmi (12 Toll-podobnih receptorjev), predvidoma na račun tega, da rastline za razliko od živali nimajo pridobljenega imunskega sistema (Dodds in Rathjen, 2010).

PTI predstavlja nespecifičen odziv rastlin na kar najširši nabor patogenov in obsega: tvorbo reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS, ang. reactive oxygen species), ki so neposredno toksične za patogena, hkrati pa utrujejo rastlinsko celično steno in delujejo kot signal za aktivacijo dodatnih genov za obrambo; povečano koncentracijo kalcijevih ionov, ki so prav tako vključeni v nadaljnjo obrambno signalizacijo; ter druge odzive, kot so depolarizacija membrane, povečanje pretoka ionov, tvorba fosfatidne kisline in nalaganje kaloze (Wu in sod., 2014; Dodds in Rathjen, 2010; de Coninck in sod., 2015; Luo in sod., 2014).

### 2.3.1.2 Imunost sprožena z efektorji

Kljub širokemu spektru prepozname in splošni učinkovitosti PTI uspešnim patogenim organizmom vseeno uspe okužiti rastlino, se v njej namnožiti in povzročiti bolezen. Za dosego tega cilja pa morajo zatreći to osnovno obliko rastlinskega imunskega odgovora, kar jim uspe s t. i. efektorskimi proteini (Dodds in Rathjen, 2010; Jones J. D. G. in Dangl, 2006). Gre za funkcionalno raznoliko skupino majhnih sekretornih proteinov, ki lahko delujejo v medceličnem prostoru ali pa vstopajo v gostiteljsko celico (Jones J. D. G. in Dangl, 2006). Efektorji lahko dosežejo oslabitev PTI z oviranjem rastlinske prepozname glive (npr. z vezavo hitina), z varovanjem glive pred rastlinskimi obrambnimi molekulami (npr. z inhibitorji proteaz) ali pa celo posežejo v samo signalizacijo rastlinskega imunskega odziva (Doehlemann in sod., 2014; Stergiopoulos in de Wit, 2009).

Rastline so v odgovor na efektorske proteine razvile mehanizem imunosti sprožene z efektorji (ETI, ang. effector-triggered immunity). Za razliko od PRR za prepozname molekularnih vzorcev se receptorji, ki prepoznavajo specifične efektorske proteine, praviloma nahajajo v notranjosti gostiteljskih celic (Jones W. J., 2010). Večina receptorjev za prepozname efektorskih proteinov pripada razredu receptorjev z domeno za vezavo na nukleotide (NB, ang. nucleotide binding domain) in domeno bogato s ponovitvami levcina (LRR, ang. leucine-rich repeat domain); slednja predstavlja del, s katerim receptor prepozna efektorski protein (Dodds in Rathjen, 2010). Prepoznamava je lahko neposredna, s fizično asociacijo z efektorskim proteinom, ali posredna, ko receptor ščiti tarčo efektorja, torej rastlinski protein, ob poškodbi katerega se sproži imunski odziv (Dodds in Rathjen, 2010). Posredna prepoznamava je v tem primeru učinkovitejša, saj na ta način rastlina tarčni protein zaščiti ne le pred specifičnim efektorjem, temveč pred vsemi efektorskimi proteini, ki bi jih patogeni mikroorganizmi lahko razvili za onemogočenje tarčnega proteina (Dodds in Rathjen, 2010).

Sam odziv pri ETI je zelo podoben odzivu PTI (poglavlje 2.3.1.1), le da je intenzivnejši in nastopi hitreje, pogosto pride tudi do t. i. hiper-senzitivnega odziva oz. pospešenega odmiranja gostiteljskih celic v okolini okužbe, s katerim rastlina onemogoči širjenje patogenega mikroorganizma v preostale dele (Jones J. D. G. in Dangl, 2006). V odgovor na ETI se patogeni mikroorganizmi lahko odzovejo z »izgubo« efektorskega proteina, kar sicer morda nekoliko zmanjša njihovo virulenco, a jim vseeno omogoča vsaj določeno stopnjo okužbe gostiteljske rastline; ali pa z razvojem dodatnih efektorskih proteinov, ki posežejo tudi v samo ETI (Cook in sod., 2015; Cui in sod., 2015; Dodds in Rathjen, 2010).

Pri ETI lahko govorimo o t. i. evolucijski tekmi (ang. evolutionary arms race) – zelo dinamičnem sočasnem evolucijskem razvoju efektorjev v patogenih mikroorganizmih in receptorjev za posamezne efektorje v gostiteljskih rastlinah (Jones J. D. G. in Dangl, 2006; Dodds in Rathjen, 2010). Evolucijska tekma med gostiteljsko rastlino in patogenim organizmom tako predstavlja krhko ravnovesje med obema stranema, pri čemer je enkrat v prednosti gostiteljska rastlina, ki razvije nov način kako zatreći vsiljivca, in drugič patogeni mikroorganizem, ki razvije novo strategijo, kako zaobiti rastlinske obrambne mehanizme.

Takšno ravnovesje opisuje t. i. cik-cak model interakcije med rastlino in patogenim mikroorganizmom.

Pri cik-cak modelu in razlikovanju med obema strategijama imunosti je potrebno omeniti, da v zadnjih letih številni avtorji predlagajo previdnost pri uporabi teh konceptov (Thomma in sod., 2011; Cook in sod., 2015; Pritchard in Birch, 2014). Kritikam je skupno, da sicer priznavajo njihovo veliko uporabnost za razumevanje interakcije med rastlinami in patogenimi mikroorganizmi, vendar zaradi pogostih dvoumnosti pri opredeljevanju konkretnih primerov in nekaterih drugih pomanjkljivosti opozarjajo, da omenjeni koncepti ne smejo predstavljalati omejitve pri našem mišljenju in razumevanju interakcij med rastlinami in patogenimi mikroorganizmi. Kot alternativo predlagajo različne bolj kontinuirane in dinamične modele, od katerih pa se ni v času pisanja disertacije še nobeden dobro uveljavil.

### 2.3.1.3 Hormonska signalizacija pri rastlinski obrambi

Medtem ko ostaja signalizacija neposredno po aktivaciji receptorjev ena večjih neznank v rastlinski imunosti, so nekatere navzdolnje (ang. downstream) signalizacijske poti bolje raziskane (Dodds in Rathjen, 2010). Odziv se v grobem deli na dve poti, poimenovani po hormonih, ki igrajo pri posamezni poti osrednjo vlogo: pot salicilne kisline, ki je vključena predvsem v odziv na biotrofne patogene mikroorganizme, ter pot jasmonske kisline in etilena, ki je vključena predvsem v odziv na nektrotrofne mikroorganizme in na insekte (de Coninck in sod., 2015; Dodds in Rathjen, 2010).

Salicilna kislina (Slika 3, levo) nastaja v kloroplastih s pomočjo encima izohorizmat sintaze in se nato prenese v citosol ter preko interakcije s transkripcijskim kofaktorjem NPR1 (ang. nonexpresser of PR genes 1) sproži prepis t. i. s patogenezo povezanih (PR, ang. pathogenesis related) genov (PR-1, PR-2 – glukanaze, PR-5 – taumatinu podobni proteini, idr.) in sintezo protimikrobnih spojin, s čimer nudi rastlini osnoven nivo obrambe (ang. basal defence; Berne in Javornik, 2016; van Loon in sod., 2006). Salicilna kislina se lahko v metilirani obliki (metilsalicilna kislina) prenaša po floemu v druge dele, kjer se na oddaljenem mestu pretvorí nazaj v salicilno kislino in rastlini omogoči sistemsko pridobljeno odpornost (SAR, ang. systemic acquired resistance) na široko skupino patogenih mikroorganizmov, in sicer s pripravo oddaljenih celic (ang. priming) za obrambni odziv še preden patogeni mikroorganizem te celice doseže (Spoel in Dong, 2012).

Jasmonska kislina (Slika 3, na sredini) nastaja v več korakih v kloroplastih in peroksisomih, v citosolu pa se transformira v končno, aktivno obliko s konjugacijo izolevcina (JA-Ile; Berne in Javornik, 2016). Jasmonska kislina aktivira skupino PR genov (PR-3 – hitinaze, PR-4 – heveinu podobni proteini, PR-12 – defenzini idr.) posredno preko interakcije s proteinom COI1 (ang. coronatine insensitive 1): ta ob vezavi aktivne oblike jasmonske kisline označi za razgradnjo proteine JAZ (ang. jasmonate ZIM domain), ki delujejo kot represorji omenjenih genov (Bari in Jones J. D. G., 2008; van Loon in sod. 2006).

Etilen (Slika 3, desno) je hormon v plinastem stanju, veže pa se na etilenski receptor ETR1 (ang. ethylene response 1), ki je v membrani endoplazemskega retikulum. Ob odsotnosti etilena ETR1 deluje kot negativni regulator transkripcijskega faktorja EIN2 (ang. ethylene insensitive 2), ob vezavi etilena pa se EIN2 aktivira in preko kompleksne signalne poti aktivira na etilen odzivne faktorje (ERFs, ang. ethylene response factors). Le-ti sprožijo prepis številnih genov, poleg tistih povezanih z obrambo pred patogenimi organizmi (etilen deluje sinergistično z jasmonsko kislino), tudi takšne, ki so vpleteni v odziv na abiotiski stres (geni povezani s slanostnim stresom, sušo, nizkimi ali visokimi temperaturami, idr.; Berne in Javornik, 2016; Mueller M. in Munne-Bosch, 2015).



Slika 3: Strukturne formule treh glavnih fitohormonov, vključenih v rastlinski obrambni odziv (ChemSpider, 2016)

Figure 3: Structural formulae of three main phytohormones, involved in plant defence response (ChemSpider, 2016)

Pot salicilne kisline ter pot jasmonske kisline in etilena v praksi delujeta do neke mere antagonistično, saj aktivacija posamezne poti lahko zavira drugo, kar lahko vodi celo do tega, da rastlina npr. ob močni aktivaciji poti salicilne kisline postane dovzetna za okužbo z mikroorganizmi, na katere je sicer odporna na račun poti jasmonske kisline in etilena, ter obratno (Koornneef in Pieterse, 2008; Caarls in sod., 2015; de Coninck in sod., 2015). Za ustrezni odziv na določen patogeni mikroorganizem je torej pomembno pravilno ravnovesje med obema potema, poleg salicilne kisline, jasmonske kisline in etilena, pa lahko na to ravnovesje sekundarno vplivajo tudi drugi hormoni, kot so abscizinska kislina, giberelini in avksini (Berne in Javornik, 2016; de Coninck in sod., 2015).

Zato številni efektorji patogenih organizmov dosežejo zatrje rastlinskega obrambnega odziva prav z vplivom na ravnovesje med hormonskimi potmi (Dodds in Rathjen, 2010; de Coninck, 2015). O primeru takšne interakcije poročajo Ralhan in sod. (2012), ki so raziskovali odziv različnih mutant repnjakovca (*A. thaliana*) na glivo *Verticillium longisporum* in pri mutanti *coi1* zaznali manj intenzivna bolezenska znamenja v primerjavi z rastlinami divjega tipa, kljub primerljivi kolonizaciji v začetnih fazah bolezni. Mutanta *coi1* ne vsebuje zgoraj omenjenega receptorja za jasmonsko kislino COI1 in avtorji so predpostavili, da v rastlinah divjega tipa do aktivacije COI1 s strani glive pride v koreninah ter da ta deluje kot signal med koreninami in nadzemnimi deli, ki sproži bolezenska znamenja (Ralhan in sod., 2012). O zelo podobnem vplivu COI1 na potek bolezni poročajo Thatcher in sod. (2009) pri interakciji med repnjakovcem in glivo *Fusarium oxysporum*, pri kateri gliva z aktivacijo COI1 (predvidoma z lastno produkcijo jasmonatov) tako rekoč

ugrabi pot jasmonske kisline in etilena v rastlini, s čimer pospeši simptome venenja in povzroči končno odmrtje rastline.

Pri verticilijski uvelosti je poznan še en primer vpliva glive na rastlinsko hormonsko ravnovesje pri razvoju bolezni, in sicer preko zgoraj omenjenega receptorja za etilen ETR1. Pantelides in sod. (2010) so pri študiji interakcije med repnjakovcem in glivo *Verticillium dahliae* ugotovili, da so bolezenska znamenja v mutanti *etr1* veliko manjši kot pri rastlinah divjega tipa, pri čemer je tudi rast glive v ksilemskem tkivu pri *etr1* precej okrnjena. Avtorji pri drugih mutantah faktorjev hormonskih signalnih poti etilena, jasmonske kisline in salicilne kisline (*ein2, ein3, ein4, ein5, jar1, pad3, pad4, sid2, npr1, NahG* in *eds5/sid1*) niso zaznali izboljšane odpornosti na okužbo z glivo *V. dahliae*, zaradi česar predpostavljajo, da igra ETR1 ključno vlogo pri občutljivosti repnjakovca na to glivo. Pri rastlinah *etr1* je bila zaznana močna aktivacija in povečana akumulacija genov za s patogenezo povezane PR proteine, hitinaze in druge obrambne proteine (Pantelides in sod., 2010). Johansson in sod. (2006) prav tako poročajo o nekoliko povišani odpornosti *etr1* mutant v primerjavi z rastlinami divjega tipa pri interakciji med repnjakovcem in glivo *V. longisporum*, medtem ko so bile mutante nekateri drugih faktorjev signalne poti etilena na glivo bolj občutljive od rastlin divjega tipa, pri preizkušenih mutantah faktorjev signalne poti salicilne kisline pa avtorji prav tako niso zaznali razlik v občutljivosti v primerjavi z rastlinami divjega tipa.

### 2.3.2 Rastlinski odziv na okužbo z glivami rodu *Verticillium*

Rastline se na glive rodu *Verticillium* odzovejo na dveh temeljnih ravneh – s fizično zamejitvijo glive v ksilemu ter nato z njeno kemično odstranitvijo ali inhibicijo (Pegg in Brady, 2002; Yadeta in Thomma, 2013). Pri tem kombinacija fizične omejitve glive s kemično obrambo predstavlja še posebno učinkovit način glivne eliminacije, saj je gliva na ta način izpostavljena rastlinskim protimikrobnim snovem, medtem ko je imobilizirana v določenem delu ksilemske žile.

Fizično omejevanje glive je preučeval že Talboys (1958a) pri interakciji hmelja in glive *V. nonalfalfa*. Ugotovil je, da prvi odziv rastline na okužbo predstavlja nalaganje lignina na stenah koreninskih epidermalnih in kortikalnih celic, ki pridejo v stik z glivo. Pri tem se tvori ligninska plast okoli glivnih hif, ki glivi sicer predstavlja oviro pri napredovanju kolonizacije, vendar je ne more povsem zamejiti. Ta mehanizem je intenzivnejši pri neodpornih rastlinah kot pri odpornih; pri odpornih rastlinah intenzivno nalaganje suberina v endodermalni plasti bolj učinkovito preprečuje vstop glive v prevodno tkivo (Talboys, 1958a).

Ko verticilij vstopi v ksilemsko tkivo, se fizično omejevanje nadaljuje z mašenjem ksilemskih žil s tvorbo tiloz (mehurčasti izrastki parenhimskih celic, ki se lahko razširijo v lumen ksilema), z nalaganjem kaloze in lignina na ksilemskih stenah, ter želiranjem ksilemskega soka (Talboys, 1958b; Pegg in Brady, 2002). Že sam obrambni mehanizem z mašenjem žil bi lahko povzročil venenje rastline, ki je eno od bolezenskih znamenj, kar pa rastline lahko kompenzirajo s t. i. ksilemsko hiperplazijo oz. z diferenciacijo novih ksilemskih žil iz inter-fascikularnega kambija (Talboys, 1958b).

Zanimivo je, da za razliko od poročil Talboysa (1958a; 1958b) v nedavni raziskavi odziva odpornega in neodpornega kultivarja hmelja na okužbo z glivo *V. nonalfalfa* (Cregeen in sod., 2015) ni prišlo do močnejše suberinizacije endodermalne plasti, tvorbe tiloz in ksilemske hiperplazije v odpornem kultivarju. Razlog za to je verjetno v uporabi različnih odpornih kultivarjev – medtem ko je Talboys uporabil kultivar Wye Challenger, so Cregeen in sod. uporabili kultivar Wye Target, ta kultivarja pa vsebujeta različna vira odpornosti na verticilijsko uvelost (Cregeen in sod., 2015; Neve, 1991).

Kemični obrambni mehanizmi vključujejo inhibicijo rasti glive in razgradnjo hif s številnimi snovmi s protimikrobnim delovanjem, kot so s PR proteini, fitoleksini in fenolne snovi. Sinteza in sproščanje teh snovi spada med splošne odzive rastline na okužbo (opisane v prejšnjih poglavjih) in je značilna tako za odporne kot za neodporne rastline (Pegg in Brady, 2002). Ob okužbi z verticilijem je značilno povečano izražanje peroksidaz, hitinaz in  $\beta$ -glukanaz, ki igrajo pomembno vlogo pri odstranjevanju glivnih hif iz prevodnih tkiv (Mandelc in sod., 2013).

Razlika med neodpornimi in odpornimi gostiteljskimi rastlinami se kaže v skorajšnji ali popolni odsotnosti kolonizacije ksilema pri odpornih rastlinah, medtem ko do okužbe koreninskega sistema pride tako pri neodpornih kot pri odpornih rastlinah (Pegg in Brady, 2002). Že Keyworth (1953) je predpostavil, da igrajo pri odpornosti ključno vlogo obrambni procesi v koreninah, ki preprečijo oziroma omejijo vstop glive v ksilem rastline, kar je dokazal na dva načina. Pri okuževanju stebel neodpornega kultivarja hmelja (Fuggle) z glivo *V. nonalfalfa* je opazil povezavo med količino inokulum in intenzivnostjo bolezenskih znamenj – ob injiciranju manj koncentrirane suspenzije spor so bili simptomi milejši, kot ob injiciranju bolj koncentrirane suspenzije spor. Nato je v poskusu s cepljenjem stebel neodpornega kultivarja hmelja (Fuggle) na korenine odpornega (OR 55) in obratno pokazal, da so v tem primeru bolezenska znamenja intenzivnejša v steblu odpornega kultivarja (s koreninami neodpornega), kot v steblu neodpornega kultivarja (s koreninami odpornega), kar naj bi odražalo različno količino inokulum, ki doseže steba skozi koreninski sistem odpornega oz. neodpornega kultivarja (Keyworth, 1953).

Nedavno je bilo narejeno veliko raziskav rastlinskega odziva na verticilijsko uvelost na molekularni in celični ravni. Odziv hmelja na okužbo z glivo *V. nonalfalfa* so na proteomskem in na transkriptomskem nivoju analizirali Mandelc in sod. (2013) ter Cregeen in sod. (2015). Mandelc in sod. (2013) so pri primerjalnem proteomskem profiliranju korenin odpornih in neodpornih kultivarjev, okuženih z letalnim patotipom glive, ugotovili, da se v koreninah neodpornih rastlin ob okužbi inducirajo številni obrambni proteini, med njimi hitinaze,  $\beta$ -glukanaze in peroksidaze, medtem ko ob okužbi odpornih rastlin ne pride do večjih sprememb v koreninskem proteomu. Cregeen in sod. (2015) tudi na transkriptomskem nivoju poročajo o izrazitem povečanju izražanja PR proteinov ob okužbi z glivo *V. nonalfalfa* v neodpornih rastlinah hmelja, medtem ko je bilo za odporne rastline specifično povečano izražanje genov, vpletenih v ubikvitinacijo in vezikularni transport, kar kaže na možno vpletene teh mehanizmov pri odpornosti na verticilijsko uvelost hmelja (Cregeen in sod., 2015). Obe študiji torej kažeta na izrazitejši

odziv neodpornih rastlin hmelja na okužbo z glivo *V. nonalfalfa*e v primerjavi z odpornimi rastlinami, tako na transkriptomski kot na proteomski ravni.

Robb in sod. (2012) tudi pri interakciji med paradižnikom in glivo *V. dahliae* poročajo, da pride v neodpornih rastlinah tako na transkriptomskem kot na proteomskem nivoju do veliko močnejšega sistemskega odziva na okužbo kot v odpornih rastlinah, ki vključuje močno indukcijo obrambnih proteinov, vendar ni učinkovit pri obrambi pred glivo. Van Esse in sod. (2009) prav tako poročajo o veliko intenzivnejšem odzivu neodpornega kultivarja paradižnika na okužbo z glivo *V. dahliae*, pri katerem je bilo po okužbi diferenčno izraženih skoraj 10-krat toliko genov kot pri odpornem kultivarju, odziv pa je bil še posebej intenziven v koreninah. Analiza funkcijске obogatitve je v koreninah neodpornega kultivarja pokazala na diferenčno izražanje genov, povezanih z obrambnim odzivom in v nadzemnih delih na diferenčno izražanje vzdrževalnih genov ter genov, povezanih z metabolizmom. Zaradi nižjega števila diferenčno izraženih genov avtorji pri odpornem kultivarju niso izvedli analize funkcijске obogatitve. Robb in sod. (2007) so primerjali izražanje genov ob okužbi neodpornega in odpornega kultivarja paradižnika z letalnim in blažjim patotipom glive *V. dahliae* in ugotovili precejšnje razlike med pogoji – izražanje nekaterih genov je bilo na primer povišano ob okužbi neodpornega kultivarja z letalnim patotipom glive in znižano ob okužbi z blažjim patotipom, ter nespremenjeno ob okužbi odpornega kultivarja s katerimkoli patotipom glive. Avtorji so predpostavili, da morda pride pri okužbi neodpornega kultivarja z letalnim patotipom glive do namernega pretiranega odziva, ki sicer škodi sami rastlini, a pomaga pri omejitvi širitev glive na sosednje rastline in na ta način pri zaščiti lokalne populacije paradižnika (Robb in sod., 2007).

Več transkriptomskih raziskav je bilo narejenih tudi pri odzivu bombaževca na verticilijsko uvelost. Xu in sod. (2011) so s pomočjo RNA-Seq v več časovnih točkah primerjali odziv odpornega kultivarja bombaževca ob okužbi z glivo *V. dahliae* z izražanjem v neokuženih rastlinah, pri čemer so identificirali 3.442 diferenčno izraženih genov. Z nadaljnjo analizo so pokazali vpletenost genov fenilpropanoidnega oziroma ligninskega metabolizma pri gostiteljski odpornosti, kar so potrdili še z analizo z RT-qPCR, histokemijsko analizo in analizo encimske aktivnosti. Vpletenost fenilpropanoidnega metabolizma v gostiteljsko odpornost so ugotovili tudi Sun in sod. (2013), ki so okuževali dve odporni vrsti bombaževca (vsako) z zelo virulentnim ter z manj virulentnim sevom glive *V. dahliae* in s pomočjo RNA-Seq pri primerjavi posameznih odzivov z neokuženimi rastlinami ustrezne vrste odkrili skupno 1.975 diferenčno izraženih genov, pri čemer pa odziv obeh vrst ni bil povsem identičen, iz česar so sklepali, da igrajo pri odpornosti vlogo različni mehanizmi. Chen in sod. (2015) so s pomočjo RNA-Seq proučevali transkripcijski odziv homologov znanih genov R za odpornost (ang. resistance genes) v koreninah odpornega kultivarja bombaževca ob okužbi z glivo *V. dahliae*. Od 1.004 identificiranih homologov genov za odpornost jih je bilo ob okužbi diferenčno izraženih 451. Avtorji so nadalje odkrili 26 genomskih regij, obogatenih z omejenimi homologi, od katerih se jih 12 nahaja v bližini znanih regij QTL za odpornost bombaževca na verticilijsko uvelost.

Tudi na modelni rastlini, repnjakovcu (*A. thaliana*), je bilo izvedenih več raziskav odziva na verticilijsko uvelost. Iven in sod. (2012) so proučevali diferenčno izražanje v koreninah repnjakovca ob okužbi z glivo *V. longisporum*, pri čemer so identificirali 269 diferenčno izraženih genov 1 dan po okužbi in 490 diferenčno izraženih genov 3 dni po okužbi. Med diferenčno izraženimi geni so bile najbolj obogatene funkcijске skupine za biosintezo kamaleksina, biosintezo indolnih fitoaleksinov, katabolizem toksinov, katabolizem hitina in druge z obrambnim odzivom povezane funkcijске skupine. Poleg tega so zaznali močno povečano izražanje genov, povezanih s proizvodnjo sekundarnih metabolitov nastalih iz triptofana, kar kaže na morebitno vlogo teh spojin pri obrambi rastline proti verticiliju. Tischner in sod. (2010) so ob okužbi repnjakovca z glivo *V. longisporum* z uporabo mikromrež v koreninah identificirali 732 diferenčno izraženih genov, ki so bili večinoma povezani s celično steno, proteolizo in transkripcijskimi faktorji, ter 474 diferenčno izraženih genov v nadzemnih delih; ti so bili večinoma povezani s proteolizo, obrambo in signalizacijo. Floerl in sod. (2012) so analizirali sekretom in metabolom repnjakovca po okužbi z glivo *V. longisporum*. Ta je vplivala na povečano proizvodnjo celične stene s spremenjeno sestavo in povečano lignifikacijo, spremembo nivojev signalnih in obrambnih molekul ter povišan nivo protiglivnih proteinov v apoplastu. Zaznano je bilo tudi povišanje nivoja šestih apoplastnih proteinov, vključenih v obrambo in v modifikacije celične stene, od katerih gre pri treh za peroksidaze.

Transkriptomske študije odziva na okužbo z verticilijem so bile narejene še na nekaterih drugih rastlinskih vrstah. Tai in sod. (2013) so primerjali odziv tolerantnega in delno odpornega kultivarja krompirja na okužbo z glivo *V. dahiae* in zaznali relativno nižje izražanje genov povezanih z obrambo v tolerantnem v primerjavi z delno odpornim kultivarjem, enak vzorec izražanja pa je imel tudi transkripcijski faktor WRKY. Klosterman in sod. (2011) so proučevali odziv neodporne sorte solate (*L. sativa*) na okužbo z glivo *V. dahiae* in poročajo o specifičnem izražanju genov *PR-3*, *PR-5* in cisteinske proteaze *LsCP2* le v okuženih listih. Floerl in sod. (2008) pa so proučevali proteomski odziv oljne ogrščice (*B. napus*) na glivo *V. longisporum*. V listnem apoplastu so identificirali povišano izražanje endohitinaze, peroksidaze, proteina *PR-4* in  $\beta$ -glukanaze, v ksilemskem soku pa povišano izražanje proteina *PR-4*,  $\beta$ -glukanaze in neidentificiranega proteina.

## 2.4 TRANSKRIPTOMSKO PROFILIRANJE Z METODO RNA-Seq

### 2.4.1 Princip delovanja in primerjava z drugimi metodami

RNA-Seq (sekvenciranje RNA) je metoda za profiliranje transkriptoma (nabora izraženih informacijskih RNA v vzorčenih celicah), ki temelji na neposrednem štetju odčitkov, pridobljenih z uporabo tehnologije masovno paralelnega sekvenciranja vzorca RNA oz. cDNA.

Masivno paralelno sekvenciranje, znano tudi kot sekvenciranje naslednje generacije (NGS, ang. next generation sequencing), združuje tehnologije, ki večinoma temeljijo na sekvenciranju ob sintezi (Mutz in sod., 2013). Od klasičnega sekvenciranja po Sangerjevi

kapilarni metodi se, poleg neprimerno večjega obsega izhodnih podatkov (in zato veliko nižji ceni), razlikuje še v dveh pomembnih značilnostih: nekoliko krajših dolžinah odčitkov (med 50 in 300 nukleotidov pri najbolj uporabljenih platformah, v primerjavi z okoli 800 nukleotidov pri Sangerjevi metodi) ter večjem deležu napak pri sekvenciranju (tipično približno 1 % v primerjavi z 0,001 % pri Sangerjevi metodi; Goodwin in sod., 2016; Kuczynski in sod., 2012). Med najpogosteje uporabljane platforme masivno paralelnega sekvenciranja sodijo sistemi Illumina Genome Analyzer HiSeq in MiSeq; IonTorrent in IonProton; ter PacBio (nekoliko dražja metoda, ki pa omogoča tudi precej daljše odčitke). RNA-Seq je relativno nova metoda, ki se je s povečanjem zmogljivosti platform za masivno paralelno sekvenciranje dobro uveljavila šele z letom 2008, ko je bilo objavljenih več člankov, temelječih na analizi transkriptoma s pomočjo platforme Illumina (McGettigan, 2013).

Na sekvenciranju temelječe metode za določanje in kvantifikacijo transkriptoma (RNA-Seq) imajo več prednosti pred hibridizacijskimi metodami, kot so npr. mikromreže – RNA-Seq ima veliko večji dinamični razpon od mikromrež in se izogne težavam z občutljivostjo, zasičenjem in navzkrižno hibridizacijo sond, poleg tega pa je ena glavnih prednosti RNA-Seq v tem, da metoda ni omejena na detekcijo prepisov (ang. transcript) z vnaprej znanim nukleotidnim zaporedjem, zaradi česar je omogočeno profiliranje transkriptomov nemodelnih organizmov ter podrobnejša analiza izražanja različnih spojitev oblik prepisov (ang. splicing forms) ter nekodirajoče RNA (Wang Z. in sod., 2009). Trenutno pri RNA-Seq glavni omejitvi predstavljlata zahtevnost bioinformatske analize, kjer je potrebna velika natančnost in računalniška zmogljivost pri sestavljanju transkriptoma (ang. assembly) in anotaciji pridobljenih podatkov, ki so izhodiščno v obliki velikega števila relativno kratkih odčitkov, ter možnost pristransnosti pri izdelavi knjižnic cDNA, ki lahko nastanejo pri fragmentaciji večjih molekul RNA oziroma cDNA (fragmentacija je neobhoden korak pri tehniki masivno paralelnega sekvenciranja; Wang Z. in sod., 2009).

Med najpomembnejše parametre RNA-Seq sodijo dolžina odčitkov ter način (enostranski ali obojestranski odčitki) in globina sekvenciranja (število odčitkov). Na splošno gre pri metodah sekvenciranja naslednje generacije, kot že omenjeno, za relativno kratke odčitke, pri čemer pa je lahko v pomoč način sekvenciranja – poleg enostranskih odčitkov (ang. single-end reads) je namreč pri številnih platformah možno tudi sekvenciranje obojestranskih odčitkov (ang. paired-end reads), pri katerem se zaporedje nekoliko daljšega fragmenta cDNA določi z obeh strani in končna informacija o fragmentu tako vsebuje kratki zaporedji koncev fragmenta z oceno razdalje med njima (Ozsolak in Milos, 2011). Vendar pa igrata dolžina in način odčitkov vlogo predvsem pri sestavljanju transkriptoma *de novo*, torej kadar referenčne sekvene za poravnavo odčitkov niso znane, medtem ko na analizo izražanja že znanih zaporedij omenjeni lastnosti nimata večjega vpliva (Trapnell in sod., 2012). Za analizo izražanja genov je bistvenega pomena predvsem globina sekvenciranja, torej število sekvenciranih odčitkov, saj lahko ob nizki globini najmanj izraženi geni zaradi naključnosti sekvenciranja ostanejo brez odčitkov, oziroma jih je težko ločiti od šuma (Trapnell in sod., 2012).

Pri hmelju je bila poleg že opisane objave osnutka genoma in transkriptoma (Natsume in sod., 2014; poglavje 2.1.5) do zdaj objavljena le ena študija z uporabo RNA-Seq, v kateri so Clark in sod. (2013) merili izražanje hmeljnih genov, povezanih z biosintezo  $\alpha$ - in  $\beta$ -kislin ter njihovih prekurzorjev.

#### 2.4.2 Bioinformatska obdelava podatkov pridobljenih z RNA-Seq

Po samem sekvenciranju sledi, kot že omenjeno, zahtevna bioinformatska obdelava podatkov pridobljenih z RNA-Seq, ki obsega odstranitev ali krajšanje manj kvalitetnih odčitkov, *de novo* sestavljanje transkriptoma (ob odsotnosti referenčnega genom), poravnavo na genska zaporedja ter normalizacijo; v primeru ugotavljanja razlik v intenzivnosti izražanja genov v različnih vzorcih, pa predstavlja zelo pomemben korak tudi način ocene diferenčnega izražanja.

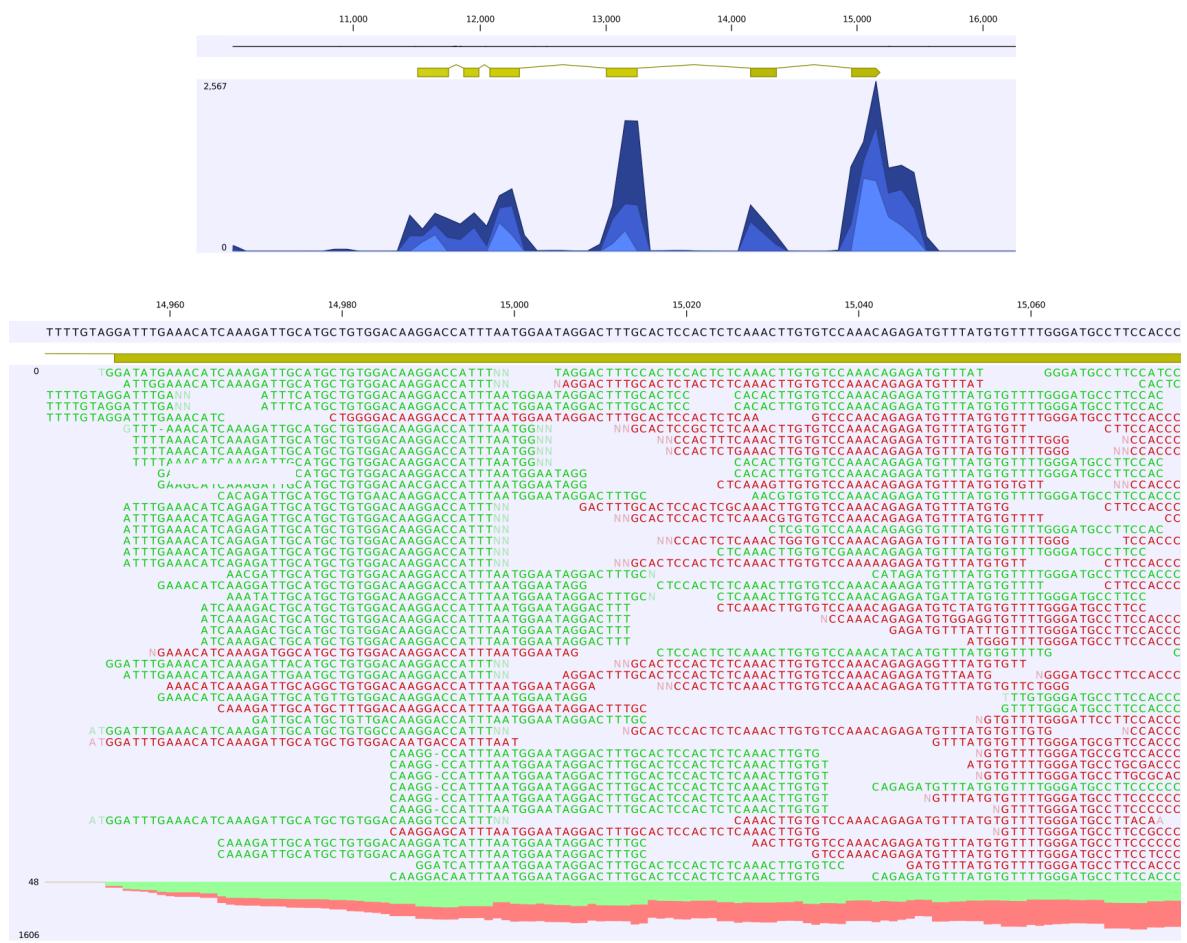
Odstranitev in krajšanje manj kvalitetnih odčitkov predstavlja prvi korak pred njihovo nadaljnjo analizo, ki je še posebej pomemben, če bodo odčitki uporabljeni za *de novo* sestavljanje transkriptoma, saj omogoča vsaj delno odstranitev napak, ki nastanejo ob sekvenciranju in bi se sicer vgradile v model transkriptoma (Gongora-Castillo in Buell, 2013). Identifikacija napak je omogočena preko ocene kvalitete (ang. quality score), ki jo naprava za sekvenciranje dodeli vsakemu posameznemu nukleotidu v odčitkih. Poleg odstranitve napak pa je pomembno tudi, da se odstrani adapterska zaporedja, ki so bila uporabljena pri pripravi knjižnic in katerih zaporedja so poznana (Gongora-Castillo in Buell, 2013).

V primeru, da za organizem, na katerem želimo izvesti RNA-Seq, genom še ni znan, je treba v naslednjem koraku sestaviti transkriptom *de novo*. Za ta korak obstaja več programskeh orodij, tudi odprto-kodnih, ki večinoma temeljijo na podobnem principu, katerega jedro predstavlja delitev odčitkov na manjše k-mere in njihovo povezovanje v t. i. de Bruijnovi grafe – učinkovita računska metoda, ki je omogočila sestavljanje transkriptomov brez potrebe po nadpovprečno zmogljivih računalnikih (Grabherr in sod., 2011). Za sestavitev natančnega in robustnega transkriptoma je, kot že omenjeno, še vedno potrebna čim večja globina sekvenciranja s čim daljšimi in po možnosti obojestranskimi odčitki (Gongora-Castillo in Buell, 2013).

Za oceno izražanja genov je potrebno odčitke poravnati na zaporedja genov (Slika 4) – ta lahko izhajajo iz predhodno znanega in anotiranega genoma, ali pa iz *de novo* sestavljenega transkriptoma. Če predhodno znan genom nima anotiranih genov, predstavljajo pri poravnavi odčitkov težavo intronska zaporedja. Ta se po prepisu mRNA izrežejo in zato jih sekvencirani odčitki ne vsebujejo. Odčitki, ki pokrivajo med-eksonske spoje se zato ne poravnajo na referenčni genom, posledično pa se na gene z več introni proporcionalno poravna manj odčitkov kot na tiste z manj introni (Oshlack in sod., 2010). V primeru anotiranih genomov programi za poravnavo odčitkov lahko upoštevajo med-eksonske spoje in se omenjeni težavi izognejo.

Na takšen način lahko za vsak gen določimo število odčitkov, ki se nanj poravnajo, in to število odraža zastopanost mRNA tega gena v vzorcu (več kot je kopij mRNA tega gena v

vzorcu, večkrat bo naključno sekvencirana). Za primerjavo izražanja med geni in med različnimi knjižnicami (vzorci), je potrebno število odčitkov normalizirati. Najbolj pogost način normalizacije je RPKM (ang. reads per kilobase per million mapped reads) – število odčitkov na tisoč nukleotidov gena na milijon poravnanih odčitkov (Mortazavi in sod., 2008). Ta način normalizacije kompenzira dva faktorja: faktor dolžine gena (ob enakem izražanju ima sicer daljši gen več odčitkov kot krajši gen), s čimer je omogočena primerjava izražanja med geni znotraj posameznega vzorca, ter faktor globine sekvenciranja posameznega vzorca (če je bilo v eni knjižnici skupno sekvenciranih več odčitkov kot v drugi, imajo geni ob enaki absolutni izraženosti v prvem primeru več odčitkov), s čimer je omogočena še primerjava izraženosti genov med vzorci.



Slika 4: Primer poravnave odčitkov na referenčno zaporedje

Slika zajeta iz programa CLC Genomics. Zgoraj: z rumeno je označen gen s šestimi eksoni, z modro pa je ponazorjena gostota poravnanih odčitkov. Spodaj: povečava zadnjega eksona istega gena; nad oznako eksona (rumeno) je vidno referenčno zaporedje, pod oznako pa so vidni poravnani odčitki.

Figure 4: An example of read mapping to reference sequence

A screenshot of CLC Genomics software. Above: six exons of a gene are shown in yellow, density of reads is shown in blue. Below: magnification of the last exon from the same gene; above the exon (in yellow), reference sequence is visible (black letters), and below the exon, read sequences are shown.

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 PRIPRAVA IN OKUŽEVANJE RASTLIN

##### 3.1.1 Priprava rastlinskega materiala in okuževanje

Priprava rastlinskega materiala in okuževanje je bilo izvedeno na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo v Žalcu. Za poskus so bili pripravljeni eno leto stari ukoreninjeni potaknjenci neodpornega (*Celeia*) in odpornega (*Wye Target*) kultivarja hmelja. Za okuževanje je bil uporabljen letalni PG2 patotip glive *Verticillium nonalfalfa*.

Rastline obeh kultivarjev so bile pripravljene v razmnoževalnem rastlinjaku in nato izpostavljene obdobju dormance. Po dormanci so bile prestavljene v kontrolirane pogoje, kjer je bila izvedena inokulacija z metodo namakanja korenin v vodni raztopini konidijev glive ( $5 \times 10^6$  konidijev/ml) za 10 minut (Radišek in sod., 2006). Okuževanje je bilo izvedeno v februarju 2013. Polovica rastlin je bila kontrolna – namesto inokulum je bila uporabljena sterilna destilirana voda. Rastline so bile nato presajene v komercialen, sterilni substrat in gojene pod kontroliranimi pogoji v rastni komori z 12-urno fotoperiodo, pri  $22^{\circ}\text{C}$  in 65 % relativne zračne vlažnosti med svetlo periodo ter  $20^{\circ}\text{C}$  in 70 % relativne vlažnosti med temno periodo.

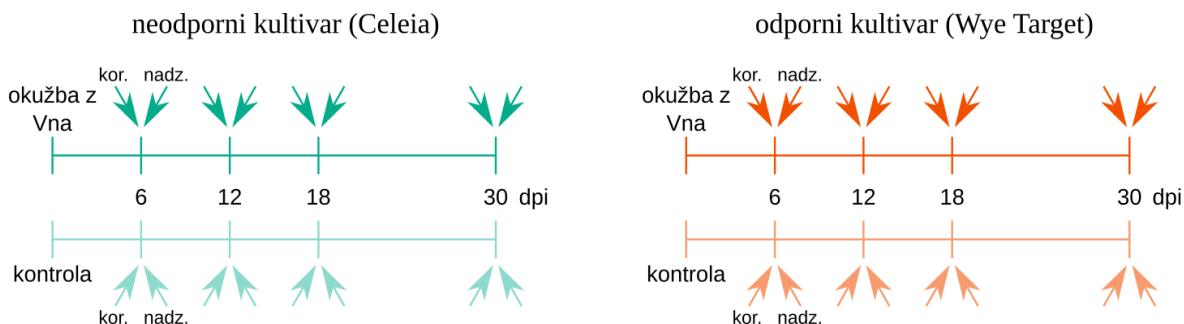
##### 3.1.2 Vzorčenje in mletje vzorcev

Rastlinski material je bil vzorčen pri štirih časovnih točkah: 6, 12, 18 in 30 dni po inokulaciji (dpi). Za vsako časovno točko so bile rastline na dan vzorčenja prepeljane iz Žalca v Ljubljano na Katedro za genetiko, biotehnologijo, statistiko in žlahtnjenje rastlin (Biotehniška fakulteta), kjer je potekalo vzorčenje. Pri vsaki časovni točki smo pridobili vzorce iz okuženih in kontrolnih rastlin obeh kultivarjev, v več bioloških ponovitvah. Za določanje prisotnosti ali odsotnosti glive v rastlini smo uporabili reisolacijski test in določanje s qPCR iz vzorčne DNA (Cregeen in sod., 2015), tako da so bile zagotovljene po tri potrjeno okužene oz. neokužene rastline na eksperimentalni pogoj. Korenine in nadzemni deli posameznih rastlin so bili vzorčeni ločeno. Tako so bili vzorci pridobljeni iz skupno 32 različnih pogojev – 4 časovne točke  $\times$  2 kultivarja  $\times$  2 obravnavi (okuženo/kontrola)  $\times$  2 organa, s po 3 biološkimi ponovitvami na pogoj (Slika 5).

Za vzorčenje so bile rastline odstranjene iz lončkov, korenine pa smo očistili prsti s fizičnim odstranjevanjem, kratkim namakanjem v vodi in spiranjem pod tekočo vodo. Rastline smo nato ločili na korenine in nadzemne dele, posamezen organ je bil sesekljan, spravljen v aluminijasto folijo in nemudoma zamrznjen s tekočim dušikom. Sesekljani vzorci so bili nato do mletja shranjeni pri  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Mletje vzorcev je bilo izvedeno v keramičnih terilnicah s pomočjo tekočega dušika. Pred mletjem so bile terilnice oprane ter dodatno očiščene z namakanjem v 3 M HCl (za razgradnjo morebitnih ostankov nukleinskih kislin od predhodnega uporabe), nato pa ponovno splaknjene s sterilno destilirano vodo in osušene. Rastlinske vzorce smo iz skrinje ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) prenesli do terilnic, kjer smo jih zmleli in spravili v 50 ml centrifugirke ter jih

prenesli nazaj v skrinjo. Pri tem smo poskrbeli, da so bili vzorci ves čas v tekočem dušiku in se niso odtajali. Zmleti vzorci so bili do izolacije RNA in DNA shranjeni pri -80 °C.



Slika 5: Shema zasnove poskusa

Vsaka puščica predstavlja posamezen pogoj (skupno 32). Pri vsakem pogoju so bili pridobljeni trije vzorci iz različnih rastlin (biološke ponovitve).

Figure 5: Experimental design

Each arrow indicates an individual treatment (32 in total). For each treatment, samples from three different plants were obtained (biological replicates).

### 3.2 IZOLACIJA RNA IN PREVERJANJE KAKOVOSTI

Za izolacijo RNA smo uporabili komercialni komplet Spectrum Plant Total RNA Kit (Sigma-Aldrich), pri čemer smo sledili protokolu proizvajalca in uporabili tudi pomožen korak odstranjevanja genomske DNA s pomočjo kompatibilnega kompleta On-Column DNase I Digestion Set (Sigma-Aldrich). Pred in med izolacijo RNA smo delovno površino in delovni pribor večkrat dekontaminirali s pršilom RNaseZAP (Sigma-Aldrich), da ne bi prišlo do razgradnje vzorcev z RNazami.

RNA smo eluirali s 50 µl elucijskega pufra iz zgoraj omenjenega kompleta za izolacijo. Koncentracijo in nečistoče v izolirani RNA smo ocenili z mikrospektrofotometrom NanoVue (Spectrophotometry ..., 2012). Naprava je koncentracijo ocenila na podlagi meritve absorbance vzorca pri valovni dolžini 260 nm, kontaminacijo s proteini in fenoli na podlagi razmerja absorbanc pri 260 nm in 280 nm (A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>), ter kontaminacijo z drugimi nečistočami (ogljikovodiki, EDTA, fenoli itd.) z razmerjem absorbanc pri 260 nm in 230 nm (A<sub>260</sub>/A<sub>230</sub>).

Stopnjo razgrajenosti izolirane RNA smo ocenili s pomočjo naprave Agilent 2100 Bioanalyzer, za katero je predpisan standardiziran postopek (Schroeder in sod., 2006; Mueller O. in sod., 2004), ki vzorcem RNA omogoča določitev integritetne vrednosti RIN (ang. RNA integrity number). Vzorce smo do nadaljnje uporabe shranili v skrinji na -80 °C.

### 3.3 SEKVENCIRANJE IN FILTRIRANJE ODČITKOV

Za sekvenciranje je bila pri vsakem od pogojev RNA iz treh posameznih bioloških ponovitev združena v en skupni vzorec (po 1 µg od vsake biološke ponovitve), s čimer je

bilo pridobljenih 32 končnih združenih vzorcev, ki so bili poslani na sekvenciranje pri komercialnemu ponudniku storitev sekvenciranja naslednje generacije – IGA Technology Services (Udine, Italija).

Sekvenciranje je bilo opravljeno na napravi Illumina Genome Analyzer HiSeq2000 z uporabo Illumina TruSeq mRNA Sample Prep Kit za pripravo ustreznih cDNA knjižnic. Vzorci so bili sekvencirani z nastavijo za 50 nukleotidov dolge enosmerne odčitke, za vsak vzorec pa je bilo pridobljenih vsaj 20 milijonov odčitkov. Sekvencirane odčitke smo naložili v podatkovno bazo European Nucleotide Archive (ENA), kjer so javno dostopni pod oznako študije PRJEB14243 (<http://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/PRJEB14243>).

Preverjanje kvalitete in odstranitev manj kvalitetnih odčitkov je bilo sicer izvedeno že v okviru storitve s strani IGA Technology Services, vendar smo vseeno izvedli dodatno filtriranje odčitkov s pomočjo programskega orodja CLC Genomics (CLC ..., 2016). Pri filtriranju smo skrajšali (ang. trim) in odstranili odčitke, ki so vsebovali nukleotide s pripisano nizko kvaliteto ali prepoznavna adapterska zaporedja (poglavlje 2.4.2). Natančni parametri, uporabljeni za filtriranje odčitkov v programu CLC Genomics, so podani v Prilogi A.

### 3.4 PORAVNAVA ODČITKOV NA HMELJNI GENOM IN NORMALIZACIJA

#### 3.4.1 Poravnavo odčitkov na hmeljni genom

Za oceno izražanja posameznih hmeljnih genov smo sekvencirane odčitke poravnali na zaporedja osnutka genoma hmelja, kultivarja Shinshu Wase (Natsume in sod., 2014; več v poglavju 2.1.5). Osnutek genoma in anotacije predvidenih genov smo pridobili iz podatkovne zbirke HopBase (HopBase ..., 2015). Poravnavo je bila izvedena s pomočjo programskega orodja CLC Genomics, ki pri poravnavi upošteva tudi gene. S tem se program izogne napakam pri poravnavi (med-eksonski odčitki se sicer ne bi poravnali – opisano v poglavju 2.4.2), hkrati pa lahko neposredno poroča število odčitkov, ki se je poravnalo na vsak posamezni gen. Kot pogoj za poravnavo smo nastavili, da mora referenčnemu zaporedju ustrezzati vsaj 90 % dolžine odčitka z vsaj 90 % podobnostjo. Natančni parametri, uporabljeni za poravnavo odčitkov na sekvene hmeljnega genoma v programu CLC Genomics so podani v Prilogi A.

Podatki o izražanju genov pri vsakem od pogojev (število odčitkov, ki se je pri vsakem pogoju poravnalo na posamezen gen), so bili izvoženi v obliki tabel, ki so bile nato s pomočjo skript preoblikovane za nadaljnjo uporabo v programskejem okolju R (The R Project ..., 2016).

#### 3.4.2 Normalizacija

V programskem okolju R smo za lažjo nadaljnjo obdelavo števila poravnanih odčitkov podatke predstavili v obliki matrike, v kateri so stolpci predstavljalii posamezen vzorec (32 stolpcov), vrstice pa posamezen gen (46.735 vrstic). Normalizacija je bila izvedena s pomeri narejenimi skriptami v programskejem okolju R.

Najprej smo stolpce normalizirali glede na njihovo sestavo oz. porazdelitev števila poravnanih odčitkov na posamezne gene, za kar smo uporabili metodo TMM (ang. trimmed mean of M-values), ki sta jo opisala Robinson in Oschlack (2010). V skriptah za izračun smo uporabili R knjižnico edgeR (Robinson in sod., 2010).

Naslednji korak normalizacije se je nanašal na razlike v skupnem številu poravnanih odčitkov v posameznem vzorcu (na račun razlik pri globini sekvenciranja) – za normalizacijo teh smo izračunali vrednosti CPM (ang. counts per million):

$$CPM = \frac{\text{št. odčitkov poravnanih na genski model}}{\text{št. odčitkov poravnanih na celoten vzorec v milijonih}} \quad \dots (1)$$

Za gene, ki so bili v vseh vzorcih zelo nizko izraženi ( $CPM < 1$ ), smo predvidevali, da sploh niso bili izraženi, saj njihovega izražanja ni bilo mogoče ločiti od podatkovnega šuma (gre za standardni postopek, opisan tudi v navodilih za uporabo zgoraj omenjene R knjižnice edgeR).

Tako nam je ostalo 23.755 izraženih genov, CPM vrednosti izražanja smo zaradi velikih razlik številskih vrednosti še logaritmirali in vrednosti predstavili kot  $\log_2(CPM)$ , ki smo jih nato uporabili za nadaljnjo analizo.

### 3.5 OCENA DIFERENČNEGA IZRAŽANJA

Izhodišče za oceno diferenčnega izražanja genov je predstavljala primerjava  $\log_2(CPM)$  vrednosti med ustrezнимi pari okuženih in kontrolnih vzorcev. Preizkušene so bile tri metode, ki so na kratko opisane v nadaljevanju.

Metode smo primerjali med seboj, pri čemer so bila pri metodah FC in MAQR, za primerljivost z metodo FunPat, uporabljena povprečja štirih časovnih točk za vsako od štirih kombinacij kultivar-organ. Za vsako od teh kombinacij smo nato izbrali 100 najbolj diferenčno izraženih genov glede na posamezno metodo in jih predstavili v Vennovih diagramih.

#### 3.5.1 Metoda razmerja spremembe (FC)

Razmerje spremembe (FC, ang. fold-change) je pogosto uporabljena vrednost za oceno diferenčnega izražanja genov in predstavlja enostavno razmerje med izraženostjo posameznega transkripta v okuženih in v kontrolnih vzorcih:

$$FC = \frac{CPM_{\text{okužen vz.}}}{CPM_{\text{kontrola}}} \quad \dots (2)$$

Razmerje spremembe se pri analizi diferenčnega izražanja genov pogosto navaja v logaritmizirani obliki in ker za logaritme velja, da je logaritem razmerja dveh števil enak razliki logaritmov teh števil, smo logaritem razmerja spremembe zelo enostavno izračunalni kot razliko  $\log_2(CPM)$  vrednosti:

$$\log_2(FC) = \log_2(CPM_{\text{okužen vz.}}) - \log_2(CPM_{\text{kontrola}}) \quad \dots (3)$$

Za oceno diferenčnega izražanja po tej metodi se običajno izbere mejna vrednost (ang. cutoff value), ki določa diferenčno izražene gene.

### 3.5.2 Metoda z rangi kvantilne regresije grafov MA (MAQR)

Rang kvantilne regresije grafa MA (MAQR, ang. MA-plot quantile regression rank) je izvirna metoda, ki smo jo razvili za analizo podatkov tekom doktorske naloge. Temelji na t.i. grafih MA (primer grafa MA je na Sliki 11), ki prikazujejo na vertikalni osi logaritmirano razmerje spremembe M, na horizontalni osi pa povprečno logaritmirano množino A (ang. mean log abundance):

$$M = \log_2(CPM_{okužen.vz.}) - \log_2(CPM_{kontrola}) \quad \dots (4)$$

in:

$$A = \frac{\log_2(CPM_{okužen.vz.}) + \log_2(CPM_{kontrola})}{2} \quad \dots (5)$$

Kot vidimo, je vrednost na vertikalni osi M torej enaka logaritmiranemu razmerju spremembe  $\log_2(FC)$ . V prvem koraku so bile na tak način izračunane vrednosti za grafe MA za vsak par okužen vzorec – kontrola.

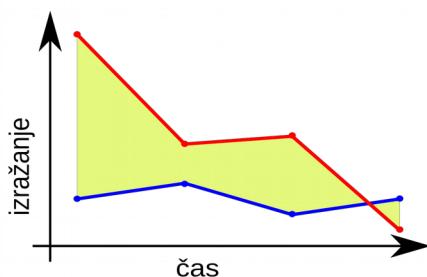
Nato smo na vzorcih izvedli kvantilno regresijo s pomočjo R knjižnice quantreg (Koenker, 2016). Linearna kvantilna regresija je bila izvedena korakoma za vse možne vrednosti  $\tau$  (za vse možne kvantile), pri čemer je bil vsakemu na novo zajetemu genu, ki je bili izražen tako v okuženem vzorcu kot v kontroli, dodeljen nov rang. Višji absolutni rang tako pomeni močnejše diferenčno izražanje, genom z zmanjšanim izražanjem v okuženem vzorcu pa je bil dodeljen negativen rang.

Celotna R funkcija za izračun rangov z metodo MAQR iz vrednosti  $\log_2(CPM)$  je podana v Prilogi B.

### 3.5.3 Metoda s površino omejene ploskve (FunPat)

Tretja metoda, ki smo jo preizkusili za oceno diferenčnega izražanja genov, je bila objavljena tekom analize podatkov za pričajoče doktorsko delo. Gre za metodo, ki je posebej prilagojena za izračun diferenčnega izražanja v poskusih, ki vsebujejo časovna zaporedja in temelji na izračunu površine ploskve, ki bi jo omejili profili izražanja gena v okuženih vzorcih in v kontrolnih vzorcih po časovnih točkah (Slika 6). Metodo so razvili in opisali di Camillo in sod. (2007).

Metoda se formalno nekoliko razlikuje od prejšnjih dveh, saj tukaj primerjamo celotne časovne profile okuženih in kontrolnih vzorcev. Zato smo vzorce razdelili v štiri kombinacije kultivar-organ (korenine odpornega kultivarja, nadzemni deli odpornega kultivarja, korenine neodpornega kultivarja ter nadzemni deli neodpornega kultivarja). Izračuni, rangiranje in statistično ovrednotenje s to metodo je bilo izvedeno s pomočjo R skript z uporabo knjižnice FunPat (Sanavia in sod., 2015).



Slika 6: Prikaz površine omejene ploskve

Figure 6: Surface of bounded area

### 3.6 ANALIZA FUNKCIJSKE OBOGATITVE DIFERENČNEGA IZRAŽANJA

#### 3.6.1 Funkcijska anotacija genov hmelja

Za proučevanje mehanizmov odziva hmelja na okužbo z glivo *V. nonalfalfa* je bilo potrebno predvideti funkcije hmeljnih genov. Kot smo že opisali v poglavju 2.1.5, se o teh običajno sklepa na podlagi podobnosti zaporedja neznanega gena z zaporedji genov, ki imajo že pripisane funkcije.

Zato smo s programom BlastX (Altschul in sod., 1997) izvedli poravnavo vseh šestih aminokislinskih prevodov genov hmelja na eno največjih podatkovnih zbirk za proteine, NCBI 'nr' (NCBI..., 2016). Poravnavo je bila izvedena samo na sekvence, ki izhajajo iz zelenih rastlin (*Viridiplantae*), pri tem pa smo nastavili še dve omejitvi – največ 10 najboljših zadetkov za vsak gen in e-vrednost manj od 0,001. Za ovrednotenje anotacij in določitev pojmov Gene Ontology (GO) (Ashburner in sod., 2000) posameznih genov smo uporabili programsko orodje Blast2GO (Conesa in sod., 2005). Poleg pojmov GO smo genom določili tudi nekoliko splošnejše pojme Plant GO Slim.

Za potrebe mrežne analize s programom ClueGO (opisane v naslednjem poglavju) smo gene označili tudi z identifikatorjem TAIR ID najbolj podobnega proteina iz repnjakovca (TAIR ..., 2016). Za določitev najbolj podobnega proteina iz repnjakovca smo izvedli BlastX poravnavo vseh šestih aminokislinskih prevodov genov hmelja, le da smo kot podatkovno zbirko tokrat uporabili 'TAIR10 representative protein database' (TAIR ..., 2010). Za določitev TAIR ID je bil nato upoštevan najboljši zadelek. V primeru, da ni bilo nobenega zadetka z e-vrednostjo nižjo od 0,1, genu ni bil določen identifikator TAIR ID.

#### 3.6.2 Mrežna analiza funkcijске obogatitve diferenčnega izražanja

Za določitev funkcijске obogatitve najbolj diferenčno izraženih genov smo uporabili program ClueGO (Bindea in sod., 2009), ki deluje znotraj programskega orodja Cytoscape (Shannon in sod., 2003). Program izvede mrežno analizo obogatitve posameznih pojmov GO in skupin le-teh z diferenčno izraženimi geni. Deluje tako, da izberemo organizem z vnaprej določeno mrežo med seboj povezanih sorodnih pojmov GO (v našem primeru smo izbrali modelno rastlino repnjakovec *A. thaliana*, saj za hmelj in sorodnejše vrste takšna

mreža še ni na voljo) in v program vnesemo seznam identifikatorjev diferenčno izraženih genov. Za posamezne pojme GO se nato določi obogatitev na podlagi primerjave deleža pojmu pripisanih diferenčno izraženih (vnešenih) genov z deležem pojmu pripisanih genov iz celotnega genoma, obogatitev pa program tudi statistično ovrednoti. Poleg tega ovrednoti tudi obogatitev širših funkcijskih skupin – skupin med seboj povezanih (sorodnih) obogatenih pojmov GO.

Kot že omenjeno smo mrežno analizo obogatitve izvedli na podatkih za mrežo GO *A. thaliana*, da bi bila analiza mogoča, pa smo za diferenčno izražene gene vnašali identifikatorje TAIR najbolj podobnih proteinov iz *A. thaliana* (opisano v prejšnjem poglavju). Mrežno analizo smo izvedli ločeno za vse štiri kombinacije kultivar-organ in sicer za 100 najbolj diferenčno izraženih genov za posamezno kombinacijo, določenih po metodi FunPat (opisano v poglavju 3.5.3). Mrežna analiza je bila izvedena s srednjo specifičnostjo (ravni GO med 3 in 8) in z uporabo enostranskega hipergeometričnega testa z Bonferroni korekcijo p-vrednosti (Bindea in sod., 2009).

### 3.7 IZBOR KANDIDATNIH GENOV

Kandidatni geni s potencialno vlogo v odgovoru hmelja na okužbo z glivo *V. nonalfafae* so bili izbrani na podlagi ročnega pregleda genov, ki so bili značilno diferenčno izraženi vsaj v eni izmed kombinacij kultivar-organ po metodi FunPat (popravljena p-vrednost  $< 0,05$ ). Za lažji proces izbiranja smo gene predstavili v HTML preglednici – v tej so bili pri vsakem genu navedeni funkcijski anotaciji, povezava na najbolj podobna zadetka v NCBI-nr in TAIR10 (poglavlje 3.6.1), ter grafi vzorcev izražanja in statistike FunPat za vse štiri kombinacije kultivar-organ. V preglednici je bilo omogočeno tudi sortiranje in filtriranje genov po iskalnih pojmih.

Pri izbiri kandidatnih genov smo v prvi vrsti upoštevali rang in popravljeno p-vrednost diferenčnega izražanja, pri čemer smo iskali kandidate s čim večjimi razlikami med izražanjem med okuženimi in kontrolnimi vzorci. Poleg tega smo proučili tudi grafe časovnih vzorcev izražanja in upoštevali, ali se je izražanje genov ob okužbi povišalo ali znižalo, kako visoko in stabilno je bilo izražanje v kontrolnih rastlinah in kako se je izražanje spremenjalo med časovnimi točkami. Upoštevali smo tudi razlike in podobnosti v diferenčnem izražanju odpornega in neodpornega kultivarja, v koreninah in v nadzemnih delih. Pri izboru smo upoštevali tudi funkcijski anotacije genov, njihovo skladnost z rezultati mrežne analize funkcijski obogatitve in s predhodnimi objavami o vlogi pri verticilijski uvelosti. Po več krogih izbiranja in izločevanja smo izbor zožili na 8 kandidatnih genov, njihove vzorce izražanja pa smo dodatno preverili z RT-qPCR.

### 3.8 PREVERJANJE VZORCEV IZRAŽANJA Z RT-qPCR

Vzorce izražanja kandidatnih genov smo preverili na istih eksperimentalnih vzorcih, kot smo jih uporabili za RNA-Seq (poglavlji 3.1 in 3.2), le da za RT-qPCR nismo združevali bioloških ponovitev, temveč smo jih analizirali individualno, da smo lahko ocenili variabilnost izražanja genov v različnih rastlinah pod enakimi pogoji.

### 3.8.1 Obratna transkripcija

Prvi korak za analizo izražanja genov z RT-qPCR predstavlja obratna transkripcija (RT, ang. reverse transcription). Za obratno transkripcijo smo uporabili komplet High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems), ki je narejen za nespecifičen prepis celotne RNA v cDNA, saj vsebuje mešanico velikega števila naključnih začetnih oligonukleotidov.

Obratna transkripcija je bila izvedena po navodilih proizvajalca kompleta v 20 µl reakcijah. Za prepis vsakega posameznega vzorca v cDNA je bil uporabljen 1 µg RNA.

### 3.8.2 Začetni oligonukleotidi za kandidatne gene in referenčni geni

Pari začetnih oligonukleotidov (ZO; v angleščini: primer) za tarčne gene so bili zasnovani na podlagi zaporedij kandidatnih genov iz osnutka hmeljnega genoma iz podatkovne zbirke HopBase (poglavje 2.1.5). Namen načrtovanja ZO je bil zagotoviti specifično in učinkovito pomnoževanje posameznega tarčnega gena.

Pare ZO smo načrtovali s pomočjo programa Primer3 4.0.0 (Untergasser in sod., 2012). Pri načrtovanju smo uporabili privzete nastavitev z naslednjimi ročnimi spremembami:

- talilna temperatura posameznega ZO: med 58,0 °C in 60,0 °C
- maksimalna razlika med talilnima temperaturama ZO: 1,0 °C
- velikost produkta: med 90 in 120 nt

Izmed parov ZO, ki jih je program vrnil in so ustrezali pogoju, smo za vsako tarčo izbrali po dva takšna para, ki sta izkazovala čim večjo specifičnost za tarčni gen. Specifičnost smo preverjali s pomočjo poravnave BlastN (Altschul in sod., 1990) na osnutek genoma hmelja. Zaporedja končnih uporabljenih parov ZO so podana v Preglednici 4.

Za normalizacijo rezultatov qPCR je potrebna uporaba t.i. referenčnih genov, ki pri različnih pogojih izkazujejo čim manjšo variabilnost izražanja. Za naš poskus smo uporabili ZO za referenčne gene YLS8, DRH1 in CAC, ki so jih prav za takšen tip eksperimentov (okuževanje hmelja z glivo *V. nonalfalfa*e) v predhodni raziskavi razvili Štajner in sod. (2013).

### 3.8.3 Kvantitativna verižna reakcija s polimerazo (qPCR)

Za izvedbo kvantitativne verižne reakcije s polimerazo (qPCR, ang. quantitative polymerase chain reaction) smo uporabili sistem 7500 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems) in reakcijsko mešanico SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Reakcije so bile izvedene v skladu s protokolom proizvajalca, s končnim reakcijskim volumenom 10 µl in z uporabo 2 ng cDNA na reakcijo. Za preverjanje specifičnosti ZO in morebitne tvorbe dimerov je bila pri vseh vzorcih pripravljena tudi disociacijska krivulja.

Za vsak eksperimentalni pogoj smo preverili po tri biološke in dve tehnični ponovitvi. Pri postavitev vzorcev na qPCR ploščo smo skušali optimizirati razporeditev na tarčo (vsi vzorci z isto tarčo na isti plošči), a ker smo delali s qPCR ploščami s 96 luknjicami, smo

morali zaradi velikega števila vzorcev (32 pogojev × 3 biološke ponovitve × 2 tehnični ponovitvi = 192 vzorcev + kontrolni vzorci) le-te za posamezno tarčo razdeliti na 3 plošče. Na vsaki plošči smo poleg eksperimentalnih vzorcev preverjali tudi kontrole brez cDNA (NTC, ang. no-template control) za preverjanje kontaminacij in tvorbe dimerov, ter med-ploščne kalibratorske vzorce (IRC, ang. inter-run calibrator) – mešanico vseh eksperimentalnih vzorcev, ki je služila za preverjanje primerljivosti rezultatov qPCR med ploščami.

Preglednica 4: Zaporedja začetnih oligonukleotidov, uporabljenih za določevanje vzorcev izražanja kandidatnih genov s kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo s predhodno obratno transkripcijo

Table 4: Sequences of primers, used in determination of expression patterns of candidate genes with reverse transcription quantitative polymerase chain reaction

Kandidatni gen	HopBase ID	Začetni oligonukleotidi
<i>HIPR-1</i>	HL.SW.v1.0.G035683	5'- GGG TGA ATG AGA AGG CCA AC -3' 5'- TTA GCA CAC CCC AAA CGA AC -3'
<i>HILTP</i>	HL.SW.v1.0.G036575	5'- GAC AGC TGT GGT TGC ATT GA -3' 5'- CGG TGT CAG CCA GTT TGT C -3'
<i>HIPR-6</i>	HL.SW.v1.0.G023951	5'- GGA GAA GAA GCA AAG GAA ACG A -3' 5'- CCC AAA CCC TAA CCC TCT CA -3'
<i>HIPx4</i>	HL.SW.v1.0.G024563	5'- ACA AAC ATT AAG CCA AGC CCT -3' 5'- AAT TTA TCC CGG CAC CCA AAA -3'
<i>HIPME2</i>	HL.SW.v1.0.G030241	5'- ACC CAC CCA ACA AAA CCA AC -3' 5'- GAC GAT TTC AGG TCC GAA GC -3'
<i>HICYP86A</i>	HL.SW.v1.0.G009568	5'- TCC TTG AAA CGG CTC AGC TA -3' 5'- AAA GCG TTT GTG GGT CCT TC -3'
<i>HIGLIP</i>	HL.SW.v1.0.G015902	5'- ATT ACG TGG ACC CAA CTC GT -3' 5'- CCA CCA ATC TTC GTC CTC CT -3'
<i>HIMLP423</i>	HL.SW.v1.0.G017076	5'- CAA GTC CAG CGT TCA AGT GG -3' 5'- ATC CTT GAC GAC TGT TGG GT -3'

Pred izvedbo qPCR s tarčnimi in referenčnimi geni na eksperimentalnih vzorcih smo vse pare ZO za tarčne in referenčne gene validirali, torej določili učinkovitost reakcije qPCR (prisotnost morebitne inhibicije) in dinamično območje (zasičenje, meja detekcije). V ta namen smo pripravili dva združena vzorca cDNA – iz korenin in iz nadzemnih delov – ter iz vsakega izpeljali redčitveno vrsto (preračunano 50 ng, 10 ng, 2 ng, 0,4 ng in 0,08 ng cDNA na reakcijo).

### 3.8.4 Analiza rezultatov RT-qPCR

V prvem koraku smo rezultate RT-qPCR analizirali s programom 7500 Software (Applied Biosystems). Najprej smo poskrbeli za izločitev neustreznih vzorcev (prevelika tehnična raznolikost, neustrezne krivulje pomnoževanja), nato pa smo za vsako tarčo posebej nastavili mejo za določevanje mejnih ciklov (C<sub>t</sub>, ang. threshold cycle), tako da je bila ta, če se je le dalo, v linearinem delu krivulj pomnoževanja vseh vzorcev.

Nato smo vrednosti C<sub>t</sub> uvozili v programsko okolje R, v katerem smo s po meri izdelanimi skriptami izvedli nadaljnje analize. Pri umeritvenih krivuljah za tarčne in referenčne gene smo na redčitvenih vrstah izvedli linearno regresijo in izračunali naklone, s čimer smo preverili, če je učinkovitost reakcije primerna (med 80 in 120 %) ter se odločili za najbolj ustrezno količino vzorca za reakcijo (v linearinem delu umeritvene krivulje).

Za posamezne pogoje smo določili diferenčno izražanje med okuženimi in kontrolnimi rastlinami po metodi ΔΔC<sub>t</sub> (Livak in Schmittgen, 2001). Vrednosti C<sub>t</sub> vzorcev za posamezno tarčo smo najprej normalizirali na referenčne gene (YLS8, DRH1 in CAC – poglavje 3.8.2):

$$\Delta C_t = C_{t_{tarča}} - \frac{C_{t_{YLS8}} + C_{t_{DRH1}} + C_{t_{CAC}}}{3} \quad \dots (6)$$

Nato smo za vsak eksperimentalni pogoj izračunali povprečne vrednosti bioloških ponovitev ΔC<sub>t</sub> ter njihov standardni odklon (SD) ter standardno napako (SE).

Relativno izraženost okuženih vzorcev glede na neokužene kontrolne vzorce smo izračunali z razliko njunih povprečnih vrednosti ΔC<sub>t</sub>:

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t_{okužen\,vz.}} - \Delta C_{t_{kontrola}} \quad \dots (7)$$

Pri tem smo upoštevali propagacijo standardne napake po naslednji formuli:

$$SE_{\Delta\Delta C_t} = \sqrt{SE_{\Delta C_{t_{okužen\,vz.}}}^2 + SE_{\Delta C_{t_{kontrola}}}^2} \quad \dots (8)$$

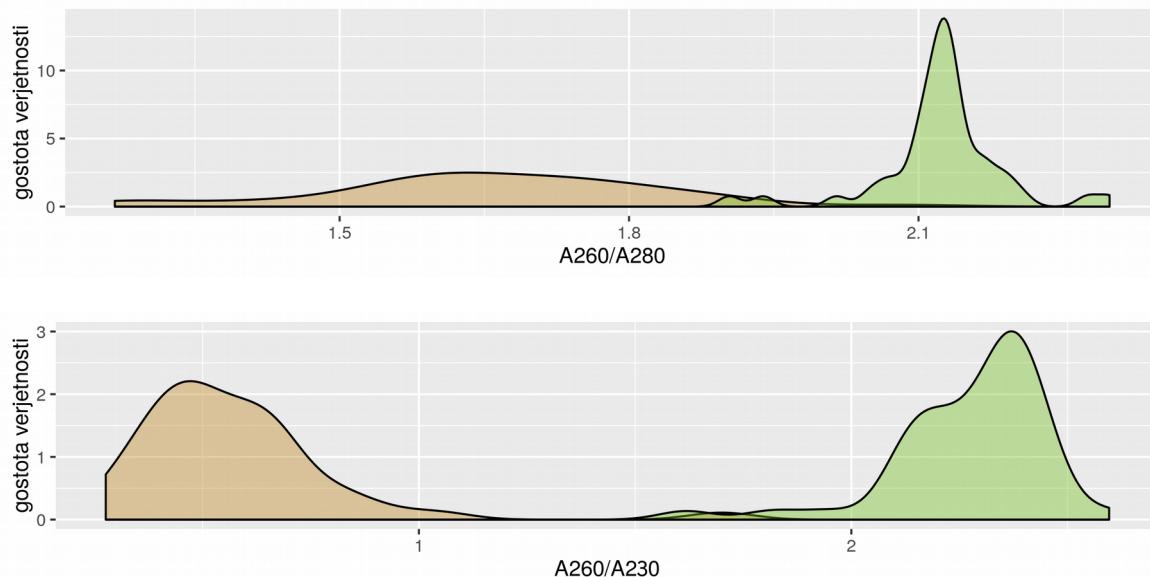
Vrednosti ΔΔC<sub>t</sub> pravzaprav predstavljajo logaritmirana razmerja spremembe oz. log<sub>2</sub>(FC) vrednosti, s čimer je bila omogočena primerjava vzorcev izražanja po tej metodi z vzorci izražanja glede na metodo RNA-Seq.

## 4 REZULTATI Z RAZPRAVO

### 4.1 KAKOVOST VZORCEV RNA

Izoliranim vzorcem RNA (po 3 biološke ponovitve za vsakega od 32 eksperimentalnih pogojev; Slika 5) smo z mikrospektrofotometrom izmerili koncentracijo: povprečna koncentracija je bila 173,2 ng/µl, najnižja izmerjena 54,0 ng/µl, najvišja pa 610,8 ng/µl. Koncentracije, ki smo jih za vzorce določili z aparaturom Agilent 2100 Bioanalyzer, so bile zelo primerljive (Pearsonov koeficient korelacije 0,802), vendar smo za nadaljnje račune vseeno uporabili koncentracije izmerjene z mikrospektrofotometrom, saj je ta metoda zaradi načina merjenja manj občutljiva na morebitne napake pri pipetiranju.

Preverili smo tudi kakovost izoliranih vzorcev RNA in sicer smo ocenili prisotnost nečistoč ter stopnjo razgrajenosti RNA. Prisotnost nečistoč smo prav tako preverjali z mikrospektrofotometrom in sicer z razmerjem absorbanc  $A_{260}/A_{280}$  in  $A_{260}/A_{230}$ . Kot se je izkazalo, se je ocenjena kontaminiranost vzorcev zelo razlikovala med koreninskimi in nadzemnimi vzorci (Slika 7). Za obe razmerji je pri vzorcih RNA priporočljivo, da imata vrednost nad 1,8 (Imbeaud in sod., 2005) oz. 2,0 (Spectrophotometry ..., 2012) in kot je razvidno iz Slike 7, to večinoma velja za nadzemne vzorce, ne pa tudi za koreninske.



Slika 7: Ocenjeni porazdelitvi gostote verjetnosti za razmerji absorbanc  $A_{260}/A_{280}$  in  $A_{260}/A_{230}$  pri izoliranih vzorcih RNA

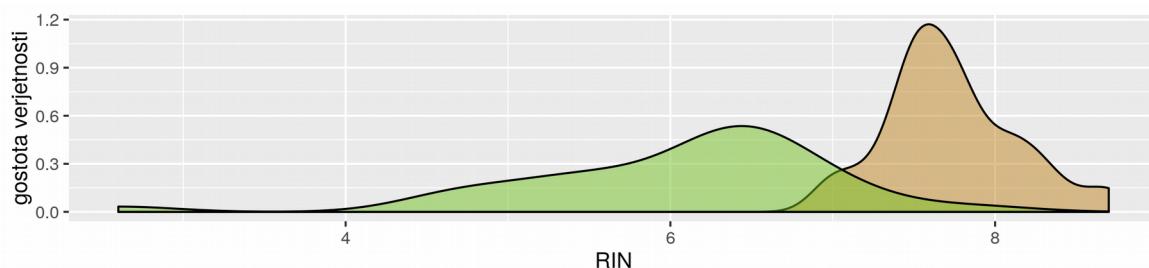
Zgoraj: razmerje absorbanc  $A_{260}/A_{280}$ ; spodaj: razmerje absorbanc  $A_{260}/A_{230}$ . Z ravo barvo so označeni koreninski vzorci, z zeleno barvo pa vzorci, izolirani iz nadzemnih delov.

Figure 7: Estimated probability density for absorbance ratios  $A_{260}/A_{280}$  and  $A_{260}/A_{230}$  of the extracted RNA samples

Above: absorbance ratio  $A_{260}/A_{280}$ ; below: absorbance ratio  $A_{260}/A_{230}$ . Brown represents root samples and green represents shoot samples.

V koreninskih vzorcih so bile torej prisotne nečistoče, ki se jim z uporabljenim načinom izolacije ni bilo mogoče izogniti. Ker so korenine organ, ki je v neposrednem stiku z zemljo, predvidevamo, da kontaminacije izvirajo iz ostankov prsti, ki jih ni bilo mogoče odstraniti s korenin z enostavnim spiranjem pod vodo. Wang Y. in sod. (2012) v primeru izolacije mikrobine RNA iz vzorcev prsti navajajo, da so poglavite nečistoče, ki se izolirajo hkrati z RNA, humične in fulvične kisline. Fulvične kisline lahko inhibirajo PCR, vendar le v visokih koncentracijah, medtem ko humične kisline predstavljajo večji problem, saj lahko motijo encimske reakcije, obratno transkripcijo, PCR ter druge reakcije in meritve (Wang Y. in sod., 2012). Odstranitev humičnih in fulvičnih kislin ni enostavna, saj se v korakih izolacije obnašajo podobno kot nukleinske kisline, v kislem pH pa se lahko humične kisline celo ireverzibilno vežejo na nukleinske kisline; avtorji med možnimi postopki za zmanjšanje kontaminacije s humičnimi in fulvičnimi kislinami zato priporočajo fenolno ekstrakcijo in precipitacijo z izopropanolom ali polietilen glikolom namesto etanola, ter naknadno čiščenje z ionsko izmenjevalno kromatografijo in/ali ustrezno gelsko filtracijo, pri čemer pa se kontaminacij še vedno ne da popolnoma izničiti (Wang Y. in sod., 2012).

Poleg preverjanja prisotnosti nečistoč smo kakovost izoliranih vzorcev RNA ocenili še z določitvijo vrednosti RIN, ki meri stopnjo razgrajenosti RNA v vzorcu. Tudi pri vrednostih RIN (Slika 8) so se pokazale velike razlike med koreninskimi (rjava) in nadzemnimi vzorci (zelena). Fleige in Pfaffl (2006) za RT-qPCR priporočata, naj bodo vrednosti RIN vzorcev nad 5,0, Gallego Romero in sod. (2014) pa poročajo, da RIN sicer vpliva na rezultate RNA-Seq, ki pa se jih da delno kompenzirati z normalizacijo vzorcev in v svojem poskusu ugotavlja, da izključitev vzorcev z nižjimi RIN (med 4,0 in 6,4) ne bi bila smiselna.

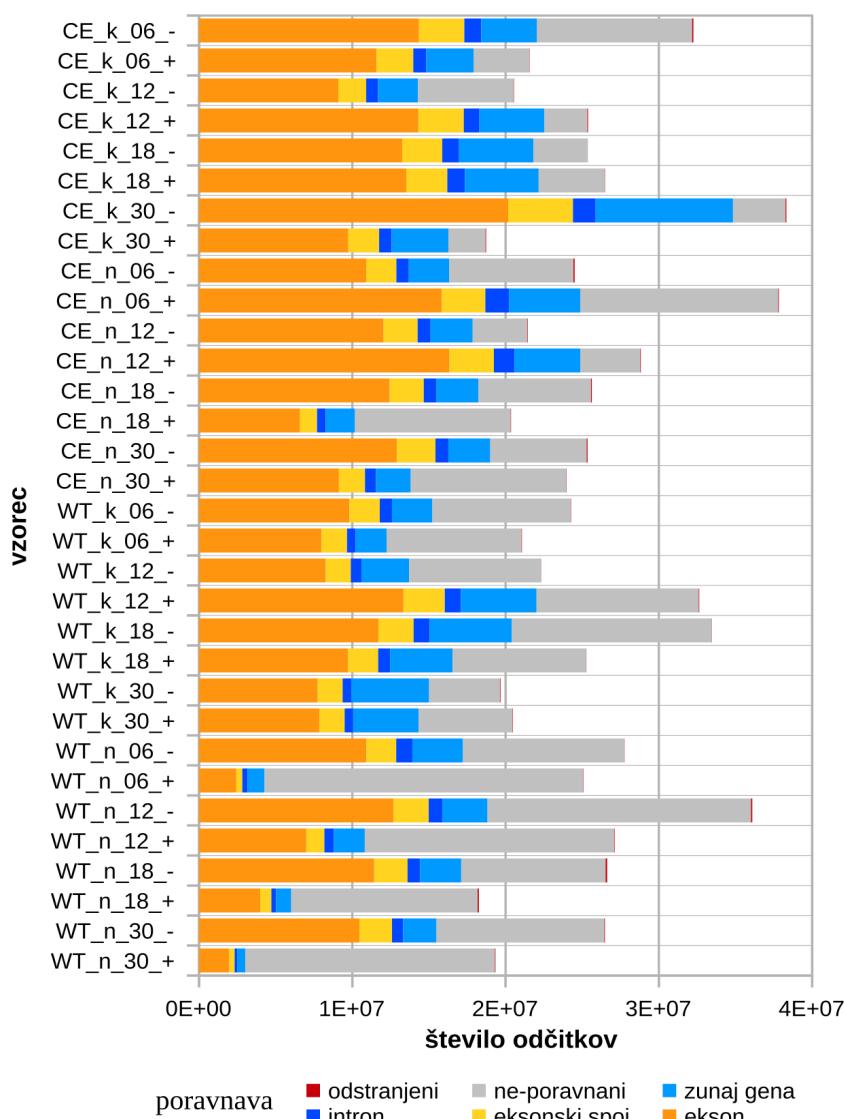


Slika 8: Ocenjena porazdelitev gostote verjetnosti za vrednosti RIN pri izoliranih vzorcih RNA  
Z ravo barvo so označeni koreninski vzorci, z zeleno barvo pa vzorci, izolirani iz nadzemnih delov.  
Figure 8: Estimated probability density for RIN values of the extracted RNA samples  
Brown represents root samples and green represents shoot samples.

Pri naših vzorcih RNA smo torej opazili, da imajo v splošnem koreninski vzorci višje vrednosti RIN kot nadzemni in da je torej stopnja razgrajenosti RNA v nadzemnih vzorcih nekoliko višja. Rezultat je zanimiv glede na to, da so nadzemni vzorci po drugi strani manj kontaminirani z nečistočami, večjo stopnjo razgrajenosti pa bi verjetno lahko pojasnili z občutljivejšo naravo nadzemnih vzorcev v primerjavi z robustnejšimi koreninami – tako je do začetka razgradnje RNA morda lahko prišlo že med pranjem in mletjem vzorcev.

## 4.2 SEKVENCIRANJE IN PORAVNAVA ODČITKOV NA GENOM HMELJA

Rezultati sekvenciranja (število sekvenciranih odčitkov na vzorec), odstranjevanja odčitkov nizke kakovosti (delež odstranjenih odčitkov na vzorec) in poravnave na hmeljni genom so podani grafični oblici na Sliki 9 in v tabelarni oblici v Preglednici 5. Na Sliki 9 so deleži odčitkov, ki so se poravnali na gene (na eksonske regije ali na med-eksonske spoje) označeni v oranžnih odtenkih; deleži odčitkov, ki so se poravnali na genom, a zunaj genov (na intronske regije ali na zunaj-genske regije) v modrih odtenkih; neporavnani odčitki v sivi; in odstranjeni odčitki v rdeči.



Slika 9: Prikaz števila sekvenciranih odčitkov na posamezni vzorec

Z barvami so označeni deleži odčitkov v vzoru, ki so se poravnali na hmeljni genom. Barve so pojasnjene v legendi, imena vzorcev pa so po ključu: WT/CE (Wye Target – odporni kultivar / Celeia – neodporni kultivar), k/n (korenine / nadzemni deli), 06/12/18/30 (dpi), +/- (okužene / neokužene rastline).

Figure 9: Visualization of number of sequenced reads per sample

The colours indicate portions sample of reads that aligned to the hop genome. Colours are explained in the legend and samples follow the key: WT/CE (Wye Target / Celeia), k/n (roots / shoots), 06/12/18/30 (dpi), +/- (infected / control).

Preglednica 5: Število sekvenciranih odčitkov na posamezni vzorec in odstotki odčitkov v vzorcu, ki so se poravnali na hmeljni genom

Ključ za vzorce: WT/CE (Wye Target / Celeia), k/n (korenine / nadzemni deli), 06/12/18/30 (dpi), +/- (okužene / neokužene rastline).

Table 5: Number of sequenced reads per sample and percentage of sample reads that aligned to the reference genome

Samples key: WT/CE (Wye Target / Celeia), k/n (roots / shoots), 06/12/18/30 (dpi), +/- (infected / control plants).

vzorec	št. sekvenciranih odčitkov	% poravnanih na eksone	% poravnanih na eksonske spoje	% poravnanih na introne	% poravnanih zunaj genov	% brez poravnave	% odstranjenih
CE_k_06_-	32256517	0,44	0,09	0,03	0,11	0,31	0,003
CE_k_06_+	21579206	0,54	0,11	0,04	0,14	0,17	0,001
CE_k_12_-	20545300	0,44	0,09	0,04	0,13	0,30	0,001
CE_k_12_+	25384661	0,56	0,12	0,04	0,17	0,11	0,002
CE_k_18_-	25364066	0,52	0,10	0,04	0,19	0,14	0,000
CE_k_18_+	26500504	0,51	0,10	0,04	0,18	0,16	0,001
CE_k_30_-	38324060	0,53	0,11	0,04	0,23	0,09	0,001
CE_k_30_+	18737578	0,52	0,11	0,04	0,20	0,13	0,002
CE_n_06_-	24510732	0,44	0,08	0,03	0,11	0,33	0,003
CE_n_06_+	37823403	0,42	0,08	0,04	0,12	0,34	0,001
CE_n_12_-	21460288	0,56	0,10	0,04	0,13	0,17	0,002
CE_n_12_+	28820938	0,57	0,10	0,05	0,15	0,14	0,001
CE_n_18_-	25630310	0,49	0,09	0,03	0,11	0,29	0,002
CE_n_18_+	20360218	0,32	0,05	0,03	0,09	0,50	0,001
CE_n_30_-	25350646	0,51	0,10	0,03	0,11	0,25	0,002
CE_n_30_+	23978043	0,38	0,07	0,03	0,09	0,42	0,001
WT_k_06_-	24273096	0,40	0,08	0,03	0,11	0,37	0,001
WT_k_06_+	21071987	0,38	0,08	0,03	0,10	0,42	0,001
WT_k_12_-	22339654	0,37	0,07	0,03	0,14	0,39	0,000
WT_k_12_+	32639145	0,41	0,08	0,03	0,15	0,32	0,001
WT_k_18_-	33465098	0,35	0,07	0,03	0,16	0,39	0,000
WT_k_18_+	25273525	0,38	0,08	0,03	0,16	0,34	0,000
WT_k_30_-	19674197	0,39	0,08	0,03	0,26	0,23	0,002
WT_k_30_+	20482682	0,38	0,08	0,03	0,21	0,30	0,001
WT_n_06_-	27766006	0,39	0,07	0,04	0,12	0,38	0,000
WT_n_06_+	25092282	0,10	0,02	0,01	0,04	0,83	0,001
WT_n_12_-	36100092	0,35	0,06	0,02	0,08	0,48	0,002
WT_n_12_+	27116247	0,26	0,04	0,02	0,07	0,60	0,001
WT_n_18_-	26631399	0,43	0,08	0,03	0,10	0,35	0,004
WT_n_18_+	18257284	0,22	0,04	0,02	0,05	0,67	0,004
WT_n_30_-	26481258	0,40	0,08	0,03	0,08	0,41	0,002
WT_n_30_+	19342374	0,10	0,02	0,01	0,03	0,84	0,002

Skupno je bilo sekvenciranih 822,6 M odčitkov z dolžino 50 nukleotidov, kar skupno predstavlja 41 Gbp sekvenčnih podatkov. Na posamezen vzorec je bilo sekvenciranih med 18,3 M in 38,3 M odčitkov (v povprečju 25,7 M), pri čemer ni bilo opaznih razlik med vzorci korenin in nadzemnih delov. Pri odstranjevanju odčitkov nizke kakovosti je bilo

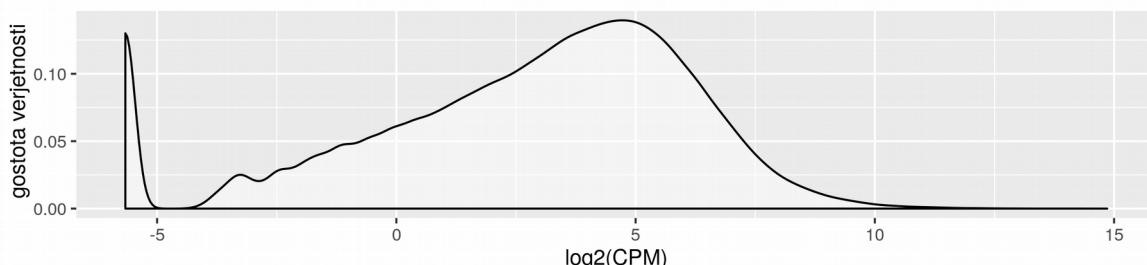
odstranjenih relativno malo odčitkov (manj kot 0,5 % na vzorec), saj so bili odčitki že predhodno filtrirani s strani ponudnika storitve sekvenciranja.

Deleži odčitkov, ki so se poravnali na genom hmelja, so pokazali precejšno variabilnost in so obsegali med 16 % in 91 % sekvenciranih odčitkov na vzorec (v povprečju 65 %). Kot je razvidno iz Slike 9, so najbolj izstopali okuženi vzorci nadzemnih delov odpornega kultivarja Wye Target – le v teh vzorcih se je na genom poravnala manj kot polovica sekvenciranih odčitkov (med 16 % in 40 %). Žal razloga za takšno razliko v poravnavi pri omenjenih vzorcih nismo uspeli določiti.

Na gene (eksonske regije in med-eksonske spoje) se je poravnalo med 2,3 M in 24,4 M odčitkov (v povprečju 12,7 M) in ti odčitki so po normalizaciji (opisani v poglavju 3.4.2) predstavljeni izhodišče za nadaljnjo analizo izražanja genov. Skupno so odčitki, ki so se poravnali na gene, predstavljeni 181,5-kratno povprečno pokritost zaporedij genov (ang. fold coverage) oz. v povprečju 5,7-kratno pokritost genov na posamezen vzorec.

Na podlagi pogoja za minimalno izražanje gena ( $\text{CPM} \geq 1$  pri vsaj enem vzorcu – prav tako opisano v poglavju 3.4.2) je bilo za izražene v vsaj enem pogoju določenih 51 % oz. 23.755 od vseh anotiranih genov (46.735). Od teh jih je bilo 13.391 (29 %) izraženih ( $\text{CPM} \geq 1$ ) v vseh 32 vzorcih.

Ocenjena porazdelitev gostote verjetnosti za  $\log_2(\text{CPM})$  vrednosti vseh 23.755 izraženih genov je prikazana na Sliki 10. Največja dosežena  $\log_2(\text{CPM})$  vrednost je bila 14,86, mediana pa je bila pri 3,34. Na sliki je poleg pričakovane porazdelitve razviden tudi ozek vrh pri najnižjih vrednostih – ta vrh predstavlja tiste primere, ko se na gen v posameznem pogoju ni poravnal niti en odčitek.



Slika 10: Ocenjena porazdelitev gostote verjetnosti za vse  $\log_2(\text{CPM})$  vrednosti (vse kombinacije izraženih genov in eksperimentalnih pogojev)

Vrh na levi predstavlja primere, ko se na gen v posameznem pogoju ni poravnal noben odčitek.

Figure 10: Estimated probability density for all  $\log_2(\text{CPM})$  values (all combinations of expressed genes and experimental treatments)

Peak on the left represents the cases, when no reads were mapped to a gene in individual treatment.

## 4.3 DIFERENČNO IZRAŽANJE

### 4.3.1 Primerjava metod za oceno diferenčnega izražanja

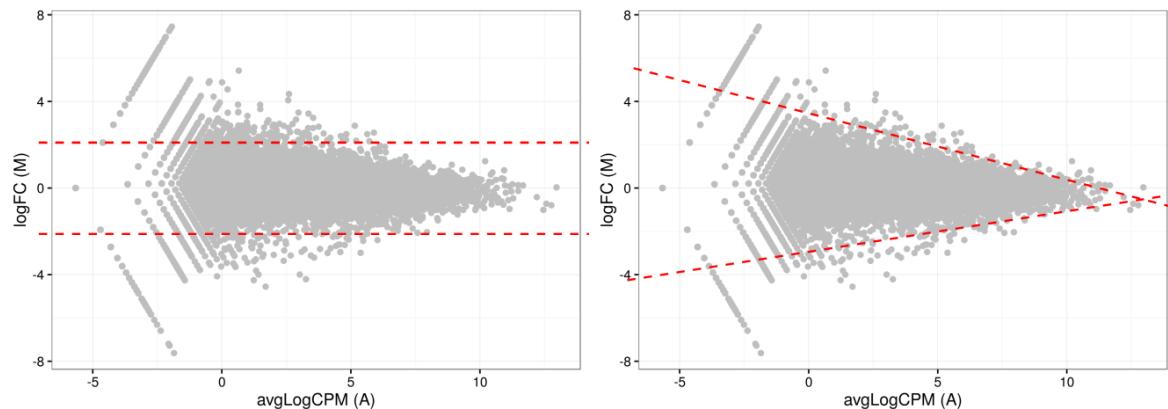
Diferenčno izražanje (DI) smo ocenjevali med okuženimi in neokuženimi kontrolnimi vzorci v posameznih eksperimentalnih pogojih, da bi določili razlike in podobnosti med transkripcijsko aktivacijo ali utišanjem celičnih procesov v koreninah in nadzemnih delih odpornih in neodpornih rastlin hmelja po okužbi z glivo *V. nonalfalfa*, ter da bi s tem lahko identificirali kandidatne gene, potencialno vključene v obrambo hmelja pred glivo.

Ker pri sekvenciranih vzorcih nismo uporabljali ločenih bioloških ponovitev (po tri biološke ponovitve so bile za sekvenciranje združene v enoten vzorec), smo bili pazljivi pri izbiri metode za oceno DI. Da bi kljub temu dobili čim bolj točne in zanesljive rezultate, smo primerjali tri metode za določitev DI.

Metoda razmerja spremembe je najpogosteje uporabljena pri določevanju DI genov in temelji na enostavnem razmerju med izražanjem gena v okuženem in kontrolnem vzorcu in potencialni določitvi mejne vrednosti, ki definira DI genov (poglavlje 3.5.1). Ta metoda je sicer učinkovita in enostavna, vendar lahko ob odsotnosti ocene naravne variabilnosti v stopnji izražanja gena (zaradi odsotnosti bioloških ponovitev) vodi v pristransko precenitev pomembnosti DI pri nizko izraženih genih, ki imajo zaradi nizkega števila poravnanih odčitkov zmanjšano razmerje signal-šum, to pa lahko posledično vodi v napačno identifikacijo mnogih nizko izraženih genov kot DI.

Da bi se izognili takšni napaki, smo razvili metodo, ki temelji na grafih MA in kvantilni regresiji za rangiranje (MAQR, opisano v poglavju 3.5.2). Iz grafov MA smo izhajali, ker poleg logaritmiranega razmerja spremembe prikazujejo tudi povprečno logaritmirano stopnjo izražanja gena (Slika 11) in zato jasno prikazujejo omenjeno pristranskost pri oceni DI nizko izraženih genov (Slika 11 levo). Z linearno kvantilno regresijo (kratek uvod v metodo je na voljo npr. v Cade in Noon, 2003) lahko skozi postopno zviševanje tarčnih kvantilov prilegamo regresijsko premico tako, da je vsakič zajet po en nov gen – tako lahko genom določimo rang na podlagi izstopanja na grafu MA (Slika 11 desno), s čimer upoštevamo tako razmerje spremembe kot tudi povprečno izražanje gena. Razlika je najbolj jasna ob vizualni primerjavi metod na Sliki 11.

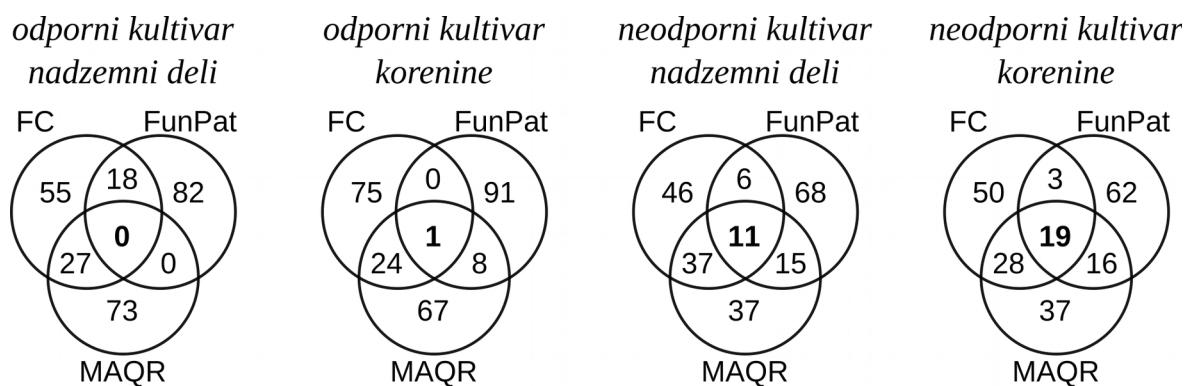
Poleg omenjenih metod smo v primerjavo vključili še pred kratkim objavljeno metodo, ki je bila razvita specifično za eksperimente RNA-Seq, ki vključujejo časovne točke, in temelji na izračunu površine ploskve, ki bi jo omejili profili izražanja gena v okuženih vzorcih in v kontrolnih vzorcih po časovnih točkah (metoda FunPat, Sanavia in sod., 2015; opisano v poglavju 3.5.3). Ker se po tej metodi DI ocenjuje s pomočjo več časovnih točk, se s tem do neke mere kompenzira tudi pomanjkanje bioloških ponovitev in je omogočena določitev statistične značilnosti izračunanih vrednosti DI genov. V našem primeru smo s to metodo ocenili DI genov pri štirih kombinacijah kultivar-organ (nadzemni deli neodpornega, korenine neodpornega, nadzemni deli odpornega ter korenine odpornega kultivarja).



Slika 11: Ilustracija prednosti določitve mejne vrednosti z metodo MAQR v primerjavi z metodo  $\log_2(\text{FC})$   
 Levo: metoda  $\log_2(\text{FC})$ ; desno: metoda MAQR. Na obeh grafih MA so prikazani isti ekspresijski podatki. Vertikalna os predstavlja logaritmirano razmerje spremembe (M), horizontalna os pa povprečno logaritmirano množino (A).

Figure 11: Illustration of advantages of determining cutoff with MAQR method in comparison with  $\log_2(\text{FC})$  method  
 Left:  $\log_2(\text{FC})$  method; right: MAQR method. Both MA plots represent the same expression data.  
 Vertical axis represents logarithmized fold-change (M), horizontal axis represents average logarithmized abundance (A).

Za primerjavo omenjenih treh metod smo primerjali po sto najbolj izraženih genov v vsaki od štirih kombinacij kultivar-organ in skupne gene predstavili v Vennovih diagramih (Slika 12). Primerjavo smo omejili na po sto najbolj izraženih genov, ker metodi FC in MAQR nimata določene mejne vrednosti za diferenčno izražanje genov kot jo ima FunPat, zato bi morali le-to določiti arbitralno; vse tri metode pa gene rangirajo po stopnji diferenčnega izražanja zaradi česar se nam je zdelo bolj smiselno primerjati tiste z najvišjimi rangi po posamezni metodni. Prekrivanje med metodami je bilo presenetljivo nizko, še posebno v odpornem kultivarju (0 skupno določenih genov v nadzemnih delih in 1 v koreninah),



Slika 12: Primerjava metod za oceno diferenčnega izražanja genov  
 Vennovi diagrami skupnih genov med 100 najbolj diferenčno izraženimi geni po vsaki izmed metod.  
 Figure 12: Comparison of methods for determination of differential gene expression  
 Venn diagrams of common genes among 100 most differentially expressed genes according to each of the three methods.

medtem ko je bilo pri neodpornem kultivarju vseeno nekaj skupno določenih genov (11 v nadzemnih delih in 19 v koreninah). Pri vseh štirih kombinacijah kultivar-organ je bilo več prekrivanja med metodama FC in MAQR (med 25 in 48 skupnih genov) kot med MAQR in FunPat (med 0 in 35 skupnih genov) ali med FC in FunPat (med 1 in 22 skupnih genov). To je bilo sicer pričakovano, saj sta metodi FC in MAQR konceptualno sorodnejši med sabo kot pa z metodo FunPat, ki deluje po bistveno drugačnem principu.

Da bi ocenili točnost teh treh metod, smo ročno pregledali gene, ki so bili po posamezni metodi uvrščeni med 100 najbolj DI, pri čemer smo upoštevali njihove funkcionalne anotacije in še posebej pojme Gene Ontology (GO), ki so jim bili pripisani (poglavje 3.6.1). Izkazalo se je, da je bilo DI genom, ki so bili določeni z metodo FunPat, pripisanih veliko več pojmov GO, ki se nanašajo na obrambni odziv (npr. »response to biotic stimulus« – odziv na biološki dražljaj; »defense response to fungus« – obrambni odziv na glivo itd.), kot jih je bilo pripisano DI genom, določenim po drugih dveh metodah. Preglednice s po 100 najbolj DI geni na kombinacijo kultivar-organ po metodi FunPat so podane v prilogi C.

Ker je analiza z metodo FunPat določila DI gene z najbolj smiselnimi pripisanimi funkcijami in ker z upoštevanjem celotnih časovnih zaporedij inherentno kompenzira pomanjkanje bioloških ponovitev za posamezne časovne točke, se nam je ta metoda zdela najučinkovitejša. Zato smo za nadaljnjo analizo DI genov uporabili rezultate metode FunPat. V bodoče bi bilo morda smiselno v primerjavo dodati še druga programska orodja, kot je na primer programsko orodje za statistično modeliranje Voom (Law in sod., 2014). Voom omogoča obdelavo podatkov RNA-Seq v povezavi z dobro uveljavljenim programskim orodjem Limma (Smyth, 2005), ki je bilo sicer razvito za statistično obdelavo podatkov mikromrež.

#### 4.3.2 Diferenčno izražanje genov

Ker smo za analizo diferenčnega izražanja (DI) genov uporabili metodo FunPat, smo pri vseh nadalnjih analizah uporabili delitev na štiri kombinacije kultivar-organ. Od 23.755 izraženih genov jih je bilo 5.497 določeno kot DI med okuženimi in kontrolnimi rastlinami v vsaj eni skupini kultivar-tkivo.

Najočitnejša razlika v številu DI genov je bila med nadzemnimi deli in koreninami (Preglednica 6), pri čemer je bila ta poudarjena predvsem v odpornem kultivarju (58,3-krat manj DI genov v koreninah; pri neodpornem kultivarju 2,8-krat manj). Največja razlika med kultivarjema je bila zato prav v koreninah, kjer je bilo v odpornem kultivarju 11,7-krat manj DI genov kot v neodpornem kultivarju. Pri vseh pogojih je bilo število genov z znižanim izražanjem večje kot število genov z zvišanim izražanjem, ta razlika pa je bila največja v nadzemnih delih odpornega kultivarja, kjer je bilo 2,5-krat toliko genov z znižanim izražanjem kot tistih z zvišanim.

Najočitnejša razlika med skupinami kultivar-organ je torej v zelo nizkem številu DI genov v koreninah odpornega kultivarja. Takšen rezultat je sicer v nasprotju z intuitivnim pričakovanjem, da bo prišlo v odpornem kultivarju do intenzivnejšega odziva na okužbo,

ki bo zagotovil uspešno obrambo pred glivo *V. nonalfalfa*. Vendar pa je bil manj intenziven odziv v odpornem kultivarju v primerjavi z odzivom neodpornega kultivarja pokazan že v predhodnih študijah odziva na okužbo z verticilijem – tako pri hmelju (na transkriptomski in proteomski ravni; Cregeen in sod., 2015; Mandelc in sod., 2013), kot tudi npr. pri paradižniku (Robb in sod., 2012; van Esse in sod., 2009).

Preglednica 6: Število diferenčno izraženih genov za vse štiri kombinacije kultivar-organ  
Diferenčno izraženi geni so bili določeni z metodo FunPat (popravljena p-vrednost $<0,05$ ), smer regulacije (zvišanje/znižanje izražanja) pa na podlagi razlike povprečnih  $\log_2(\text{CPM})$  vrednosti.

Table 6: Number of differentially expressed genes for all four cultivar-tissue combinations  
Differentially expressed genes were determined with the FunPat method (adjusted p-value $<0,05$ ) the direction of regulation (up/down) was based on differences of average  $\log_2(\text{CPM})$  values.

	<b>neodporen kultivar</b>	<b>odporen kultivar</b>
<b>nadz. deli</b>	1.026 zviš. $\Sigma=2.259$ 1.233 zniž.	1.137 zviš. $\Sigma=4.020$ 2.883 zniž.
<b>korenine</b>	355 zviš. $\Sigma= 804$ 449 zniž.	32 zviš. $\Sigma= 69$ 37 zniž.

#### 4.4 FUNKCIJSKA OBOGATITEV DIFERENČNEGA IZRAŽANJA

##### 4.4.1 Funkcijska anotacija in pojmi GO Slim

Kot je bilo opisano v poglavju 3.6.1, so bile hmeljnimi genom pripisane funkcijске anotacije na podlagi podobnosti njihovih (prevedenih) zaporedij z zaporedji proteinov z že opisanimi funkcijami.

Najprej smo s pomočjo programa BlastX za vsak gen poiskali po 10 najbolj podobnih rastlinskih (*Viridiplantae*) proteinov v podatkovni zbirkvi NCBI 'nr'. Na ta način smo 98,0 % genom poiskali podobne proteine, za 2,0 % genov pa teh ni bilo mogoče najti v omenjeni podatkovni bazi, zato so ostali brez funkcijskih anotacij.

V naslednjem koraku smo rezultate poravnave BlastX uporabili za anotacijo genov s pojmi Gene Ontology (GO) in Gene Ontology Slim Plant (GO Slim). Za to smo uporabili program Blast2GO, ki je uspešno določil kategorije GO oz. GO Slim za 49,6 % genov. Za 11,6 % genov je bila določena tudi encimska oznaka EC (ang. Enzyme Code).

Ker nas je zanimala funkcijска obogatitev DI genov, smo analizirali relativne frekvence posameznih pojmov GO Slim med DI geni po posameznih kombinacijah kultivar-organ. Preglednica z odstotki DI genov pripisanih posameznemu pojmu GO Slim je podana v Prilogi D.

Med pojmi GO Slim iz ontologije bioloških procesov (BP, ang. biological process) se je splošni pojem 'celični proces' pri DI genih pojavljal najpogosteje v vseh štirih pogojih, sledili pa so mu podobno splošni pojmi 'biosintezi proces', 'proses modifikacije celičnih

proteinov', 'metabolni proces spojin z nukleobazami' in 'proces metabolizma ogljikovodikov'. Nekoliko relevantnejši pojem 'odziv na stres' se je pojavljal pri DI genih relativno pogosto pri vseh pogojih, a še najmanj pri koreninah odpornega kultivarja.

Pri pojmih GO Slim iz ontologije molekularnih funkcij (MF, ang. Molecular Function) je bil pri DI genih vseh štirih pogojih najbolj pogost pojem 'katalitska aktivnost', po pogostosti pa so mu sledili pojmi 'hidrolazna aktivnost', 'vezava nukleotidov' in 'vezava'.

Nekaj več raznolikosti med pogoji kultivar-organ je bilo pri pojmih GO Slim iz ontologije celičnih predelkov (CC, ang. Cellular Component). 'Membrana' je bil najbolj pogost takšen pojem pri DI genih v vseh pogojih. V nadzemnih delih neodpornega kultivarja sta mu po odstotku DI genov sledila pojma 'plastid' in 'tilakoida', medtem ko pri DI genih v nadzemnih delih odpornega kultivarja ta nista bila tako dobro zastopana, kar morda kaže na intenzivnejšo regulacijo fotosinteze pri neodpornem kultivarju. Pri DI genih v vseh štirih pogojih je bil relativno pogost še pojem 'zunaj-celično območje', ki je pogosto povezan z odzivom na patogene mikroorganizme.

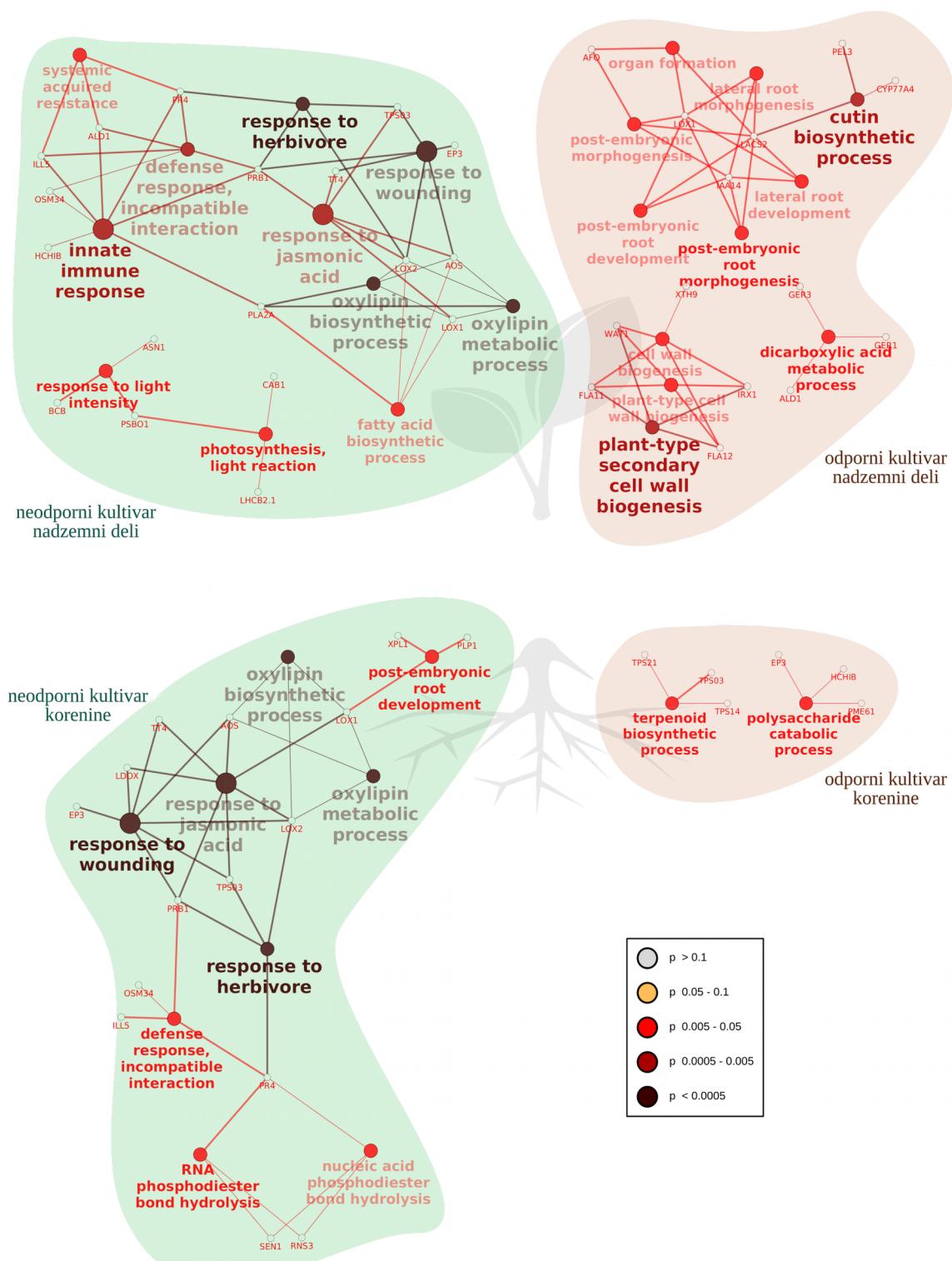
Za glavno težavo pri analizi funkcijске obogatitve DI genov z enostavnimi frekvencami pojmov GO Slim se je torej izkazala prevelika splošnost rezultatov, ki na ta račun izgubi informativno vrednost. Zato smo poskušali najti drugačno rešitev, ki bi nam omogočila natančnejši vpogled v odziv hmelja na okužbo z glivo *V. nonalfalfa*e. Za boljšo alternativo se je izkazala mrežna analiza funkcijске obogatitve, ki je opisana v naslednjem poglavju.

#### 4.4.2 Mrežna analiza funkcijске obogatitve

Za potrebe mrežne analize smo genom hmelja dodelili identifikatorje TAIR (poglavlje 3.6.1). V ta namen smo ponovno uporabili program BlastX, a tokrat smo gene poravnali na proteinsko podatkovno zbirko TAIR in jih anotirali z identifikatorjem najbolj podobnega proteina. Na ta način je bilo anotiranih 95,1 % genov.

Nato smo po 100 najbolj DI genov v posameznih kombinacijah kultivar-organ (Priloga C) uporabili za mrežno analizo s programom ClueGO (poglavlje 3.6.2), da bi ugotovili, kateri pojmi oz. skupine pojmov GO so obogatene z najbolj DI geni. Rezultati so predstavljeni v Preglednici 7 in grafično na Sliki 13 (opisi pojmov GO so navedeni dobesedno in so zato v angleškem jeziku).

V nadzemnih delih odpornega kultivarja sta bili z DI geni najbolj obogateni skupini pojmov GO biosinteza kutina in biogeneza sekundarne celične stene, ki so jima sledile skupine pojmov GO povezane z metabolnimi procesi, razvojem stranskih korenin in s celičnima predelkoma celična stena in vakuola (Preglednica 7 in Slika 13). V koreninah odpornega kultivarja so bili najbolj obogateni pojmi GO povezani s katabolizmom polisaharidov in biosintezo terpenoidov.



Slika 13: Prikaz rezultatov mrežne analize funkcijalne obogatitve diferenčnega izražanja genov s programom ClueGO

Krogi predstavljajo pojme ali skupine pojmov Gene Ontology, njihova velikost je sorazmerna s številom pripadajočih diferenčno izraženih genov, barva pa označuje statistično značilnost.

Figure 13: Visualization of the results of network analysis of functional enrichment of differentially expressed genes with ClueGO software

Circles represent Gene Ontology terms or groups of terms, their size is proportional to the number of associated differentially expressed genes, while the colour indicates statistical significance.

Preglednica 7: Mrežna analiza obogatitve pojmov Gene Ontology s programom ClueGO  
 Pojmi Gene Ontology so sortirani po skupinah, kot jih je razdelil ClueGO, znotraj skupin pa so sortirani po p-vrednosti.

Table 7: Network analysis of Gene Ontology terms enrichment according to ClueGO software  
 Gene Ontology terms were sorted into groups by ClueGO. Inside groups, they are sorted by p-value.

**Neodporni kultivar – nadzemni deli**

GO ID	pojem GO	p[pojem]	p[skupina]
GO:0016701	MF - oxidoreductase activity, acting on ...	1,7e-4	9,2e-5
GO:0080027	BP - response to herbivore	3,5e-6	2,5e-4
GO:0031408	BP - oxylipin biosynthetic process	1,8e-5	
GO:0031407	BP - oxylipin metabolic process	1,8e-5	
GO:0009611	BP - response to wounding	6,6e-4	
GO:0009753	BP - response to jasmonic acid	1,0e-3	
GO:0006633	BP - fatty acid biosynthetic process	1,6e-2	
GO:0008061	MF - chitin binding	1,6e-4	4,0e-4
GO:0004568	MF - chitinase activity	6,2e-4	
GO:0045087	BP - innate immune response	9,1e-4	4,5e-4
GO:0009814	BP - defense response, incompatible interaction	2,4e-3	
GO:0009627	BP - systemic acquired resistance	1,3e-2	
GO:0016835	MF - carbon-oxygen lyase activity	1,2e-2	1,2e-2
GO:0052689	MF - carboxylic ester hydrolase activity	2,1e-2	1,5e-2
GO:0009642	BP - response to light intensity	2,4e-2	1,6e-2
GO:0010287	CC - plastoglobule	9,4e-4	1,7e-2
GO:0009523	CC - photosystem II	1,4e-2	
GO:0019684	BP - photosynthesis, light reaction	1,7e-2	
GO:0009521	CC - photosystem	2,0e-2	

**Neodporni kultivar – korenine**

GO ID	pojem GO	p[pojem]	p[skupina]
GO:0080027	BP - response to herbivore	1,5e-6	7,9e-7
GO:0009611	BP - response to wounding	2,0e-5	1,7e-4
GO:0009753	BP - response to jasmonic acid	3,4e-5	
GO:0031408	BP - oxylipin biosynthetic process	4,0e-4	
GO:0031407	BP - oxylipin metabolic process	4,0e-4	
GO:0051213	MF - dioxygenase activity	1,0e-2	
GO:0008061	MF - chitin binding	7,6e-5	2,2e-4
GO:0004568	MF - chitinase activity	2,9e-4	
GO:0009814	BP - defense response, incompatible interaction	1,1e-2	6,3e-3
GO:0048528	BP - post-embryonic root development	1,6e-2	1,1e-2
GO:0004540	MF - ribonuclease activity	7,8e-3	1,3e-2
GO:0090305	BP - nucleic acid phosphodiester bond hydrolysis	9,2e-3	
GO:0090501	BP - RNA phosphodiester bond hydrolysis	1,0e-2	
GO:0004518	MF - nuclease activity	1,6e-2	
GO:0000325	CC - plant-type vacuole	1,9e-2	1,4e-2

(se nadaljuje)  
 (continues)

(nadaljevanje preglednice 7)

(continuation of table 7)

**Odporni kultivar – nadzemni deli**

GO ID	pojem GO	p[pojem]	p[skupina]
GO:0010143	BP - cutin biosynthetic process	7,3e-4	3,6e-4
GO:0009834	BP - plant-type secondary cell wall biogenesis	7,4e-4	4,1e-3
GO:0042546	BP - cell wall biogenesis	9,0e-3	
GO:0009832	BP - plant-type cell wall biogenesis	1,4e-2	
GO:0016830	MF - carbon-carbon lyase activity	8,5e-3	8,2e-3
GO:0016831	MF - carboxy-lyase activity	2,4e-2	
GO:0016903	MF - oxidoreductase activity, acting on ...	2,4e-2	
GO:0043648	BP - dicarboxylic acid metabolic process	2,5e-2	
GO:0010102	BP - lateral root morphogenesis	1,0e-2	1,0e-2
GO:0010101	BP - post-embryonic root morphogenesis	1,0e-2	
GO:0048528	BP - post-embryonic root development	1,5e-2	
GO:0048527	BP - lateral root development	2,0e-2	
GO:0048645	BP - organ formation	2,2e-2	
GO:0009886	BP - post-embryonic morphogenesis	2,3e-2	
GO:0031225	CC - anchored component of membrane	2,2e-2	1,1e-2
GO:0009505	CC - plant-type cell wall	2,4e-2	1,2e-2
GO:0000325	CC - plant-type vacuole	2,0e-2	1,3e-2

**Odporni kultivar – korenine**

GO ID	pojem GO	p[pojem]	p[skupina]
GO:0000272	BP - polysaccharide catabolic process	1,4e-2	9,3e-3
GO:0010333	MF - terpene synthase activity	1,8e-4	8,7e-2
GO:0016838	MF - carbon-oxygen lyase activity, acting on ...	2,4e-4	
GO:0016835	MF - carbon-oxygen lyase activity	1,0e-2	
GO:0000287	MF - magnesium ion binding	1,0e-2	
GO:0016114	BP - terpenoid biosynthetic process	1,8e-2	

Funkcijska obogatitev DI v neodpornem kultivarju se je precej razlikovala od tiste v odpornem kultivarju. Tako v nadzemnih delih kot v koreninah so bili pojmi GO z največ DI geni povezani z odzivom na herbivore, jasmonsko kislino, odzivom na poškodbo, obrambnim odzivom in hitinazno aktivnostjo (Preglednica 7 in Slika 13). V nadzemnih delih so bili obogateni tudi pojmi GO v zvezi z oksido-reduktazno aktivnostjo, metabolnimi procesi in fotosintezo. V koreninah pa so bili obogateni še pojmi GO povezani z razvojem korenin, RNazno aktivnostjo in celičnim predelkom vakuolo.

Eden najbolj očitnih rezultatov mrežne analize je torej, da se neodporne rastline na okužbo z glivo *V. nonalfalfa*e odzovejo z dosti bolj poudarjenim nespecifičnim obrambnim odzivom kot odporne rastline. Kot je bilo omenjeno že v poglavju 4.3.2, je intenzivnejši nespecifični obrambni odziv neodpornih rastlin hmelja na verticilij v skladu s predhodnimi transkriptomskimi in proteomskimi raziskavami (Cregeen in sod., 2015; Mandelc in sod., 2013). Glede na mrežno analizo pri odpornem kultivarju igrajo najpomembnejšo vlogo procesi, povezani s spremembami celične stene in z biosintezo kutina. Podrobnejša analiza

omenjenih izstopajočih procesov, vključno z analizo vzorcev izražanja z njimi povezanih kandidatnih genov, sledi v naslednjih poglavjih.

## 4.5 ANALIZA KANDIDATNIH GENOV PO FUNKCIJSKIH SKLOPIH

### 4.5.1 Kandidatni geni

Na podlagi profilov izražanja in funkcijalne anotacije so bili izbrani posamezni hmeljni kandidatni geni s potencialno vlogo pri obrambi hmelja pred glivo *V. nonalfafae*. (poglavje 3.7). Kandidatni geni in njihove predvidene funkcije ter lastnosti so podani v Preglednici 8.

Med kandidatne gene, povezane s splošno obrambo rastlin, sodijo PR-1 protein *HIPR-1*, protein za prenos lipidov *HILTP* in inhibitor serinskih proteinaz *HIPR-6*. S spremembami v celičnih stenah sta povezana peroksidaza *HIPx4* in pektin metilesteraza *HIPME2*. K metabolizmu kutina spadata citokrom P450 86A *HICYP86A* in GDSL lipaza *HIGLIP*. Med drugimi odzivi bo predstavljen še MLP protein *HIMLP423*.

Vzorci izražanja posameznih kandidatov in njihove predvidene vloge v obrambnem odzivu so predstavljeni v naslednjih podpoglavjih v kontekstu posameznih funkcijalnih skupin: splošna obramba rastlin; procesi, povezani s spremembami celične stene; metabolizem kutina; ter ostali odzivi.

Preglednica 8: Kandidatni geni in njihove predvidene funkcije in lastnosti

Table 8: Candidate genes and their predicted functions and characteristics

Ime gena	HopBase ID	TAIR ID	TAIR opis	Dolžina (ak)	M (kDa)	pI	SignalP
<b><i>HIPR-1</i></b>	HL.SW.v1.0.G035683	AT4G33720	CAP* superfamily protein	163	17.9	9.2	+
<b><i>HILTP</i></b>	HL.SW.v1.0.G036575	AT2G38540	Lipid transfer protein 1	121	12.8	5.9	+
<b><i>HIPR-6</i></b>	HL.SW.v1.0.G023951	AT5G43580	Unusual serine protease inhibitor	72	8.0	7.1	-
<b><i>HIPx4</i></b>	HL.SW.v1.0.G024563	AT1G14540	Peroxidase 4	322	35.3	10.0	+
<b><i>HIPME2</i></b>	HL.SW.v1.0.G030241	AT2G45220	Pectin methylesterase 17	528	57.6	9.0	+
<b><i>HICYP86A</i></b>	HL.SW.v1.0.G009568	AT2G45970	CYP86A8, Lacerata	549	62.1	7.7	-
<b><i>HIGLIP</i></b>	HL.SW.v1.0.G015902	AT5G45950	GDSL esterase/acyltransferase/lipase	368	40.6	8.6	+
<b><i>HIMLP423</i></b>	HL.SW.v1.0.G017076	AT1G24020	MLP-like protein 423	152	17.1	5.5	-

\* Cysteine-rich secretory proteins, Antigen 5, and Pathogenesis-related 1 protein

#### 4.5.1.1 Primerjava vzorcev izražanja z RT-qPCR in z RNA-Seq

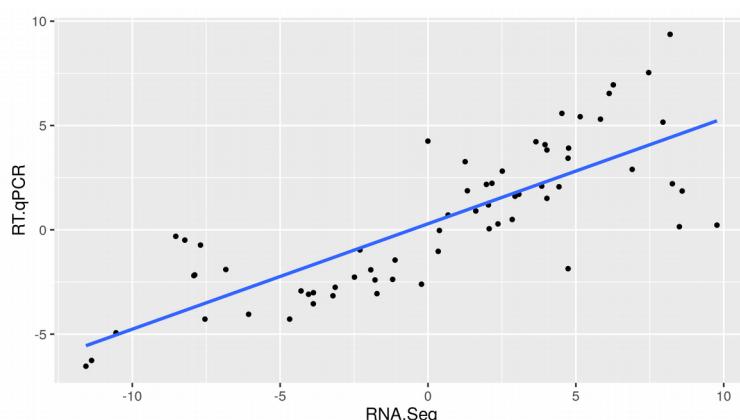
Odločili smo se, da vzorce izražanja kandidatnih genov preverimo še z metodo RT-qPCR. To smo storili, ker smo želeli določiti stopnjo biološke variabilnosti v izražanju gena med različnimi rastlinami v enakih pogojih, ter da bi potrdili veljavnost vzorcev izražanja RNA-Seq še z dodatno metodo.

RT-qPCR smo izvedli pri enakih 32 pogojih kot RNA-Seq (poglavje 3.1.2), le da za razliko od RNA-Seq nismo združevali po treh bioloških ponovitev na pogoj, temveč smo vsako od ponovitev analizirali posamično.

Pri analizi koreninskih vzorcev z RT-qPCR smo naleteli na težavo: krivulje pomnoževanja koreninskih vzorcev so bile namreč zelo popačene, biološka in tudi tehnična variabilnost pa sta bili zelo visoki. Zaradi tega za večino kandidatnih genov v koreninah ni bilo mogoče določiti vzorcev izražanja s to metodo, kjer je bilo vzorce izražanja mogoče določiti, pa so se ti zelo razlikovali od vzorcev izražanja, določenih z RNA-Seq.

Predvidevamo, da so težave pri RT-qPCR koreninskih vzorcev povzročale nečistoče, prisotne ob izolaciji RNA vzorcev, ki smo jih izmerili z razmerji absorbanc A260/A280 in A260/A230 in ki so bile specifične za koreninske vzorce (poglavlje 4.1, Slika 7). V poglavju 4.1 smo predpostavili, da verjetno nečistoče v koreninskih vzorcih predstavljajo humične in fulvične kisline. Sidstedt in sod. (2015) so v raziskavi inhibitornih učinkov humičnih in fulvičnih kislin na qPCR ugotovili, da imata obe zvrsti inhibitoren učinek na pomnoževanje z DNA polimerazo, pri tem pa humične kisline močno vplivajo tudi na detekcijo s fluorescenčnimi barvili (tudi SYBR Green, ki smo ga uporabili v našem eksperimentu), kar bi lahko bil verjeten razlog za naše težave pri kvantifikaciji izražanja koreninskih vzorcev z RT-qPCR.

Povsem drugačna slika se je pokazala pri analizi nadzemnih vzorcev z RT-qPCR. Krivulje pomnoževanja so bile pričakovanih oblik, tudi s tehnično ponovljivostjo ni bilo težav in zato smo lahko določili vzorce izražanja za vse preizkušene kandidatne gene. Ker vrednosti  $\Delta\Delta Ct$  pravzaprav predstavljajo logaritmirano razmerje spremembe oz. vrednosti  $\log_2(FC)$ , smo povprečne vrednosti  $\log_2(FC)$  bioloških ponovitev po metodi RT-qPCR (povprečne  $\Delta\Delta Ct$ ) primerjali z vrednostmi  $\log_2(FC)$ , določenimi po metodi RNA-Seq za vsak pogoj vsakega kandidatnega gena. Med obema metodama se je pokazala dobra korelacija (Slika 14). Izračunani Pearsonov koeficient korelacije za vrednosti  $\log_2(FC)$  po obeh metodah je 0,79 (s 95 % intervalom zaupanja 0,67 do 0,87).



Slika 14: Korelacija med metodama sekvenciranja RNA in kvantitativne verižne reakcije s polimerazo s predhodno obratno transkripcijo  
Prikazana so povprečja bioloških ponovitev za  $\log_2(FC)$  izražanja kandidatnih genov v nadzemnih delih.

Figure 14: Correlation between RNA sequencing and reverse transcription quantitative polymerase chain reaction  
Averages of biological replicates for  $\log_2(FC)$  for expression of candidate genes in shoots.

Z metodo RT-qPCR smo torej uspeli potrditi vzorce izražanja kandidatnih genov v vzorcih iz nadzemnih delov. S tem smo posredno potrdili splošno veljavnost rezultatov RNA-Seq v našem eksperimentu za vzorce nadzemnih delov.

Ker za koreninske vzorce nismo mogli potrditi vzorcev izražanja, smo pri interpretaciji DI kandidatnih genov v naslednjih poglavjih upoštevali predvsem njihovo izražanje v nadzemnih delih, medtem ko smo podatke RNA-Seq o izražanju v koreninah upoštevali le informativno. Razmerja sprememb (FC – nelogaritmizane vrednosti) izražanja kandidatov v nadzemnih delih po metodi RT-qPCR so podana v Preglednici 9.

V grafih, ki sledijo, smo predstavili vzorce izražanja kandidatnih genov glede na metodo RT-qPCR, ki nam je omogočila tudi oceno biološke variabilnosti izražanja v obliki standardne napake (SE), povprečja pa so, kot omenjeno, v dobi korelaciji z vrednostmi, določenimi z RNA-Seq. Diferenčno izražanje je v grafih predstavljeno v obliki logaritmiranega razmerja sprememb  $\log_2(\text{FC})$  okuženih vzorcev glede na neokužene.

Preglednica 9: Razmerja sprememb izražanja kandidatnih genov v nadzemnih delih po metodi kvantitativne verižne reakcije s polimerazo s predhodno obratno transkripcijo  
Vrednosti so podane kot faktor razmerja spremembe (FC) in niso logaritmizane.

Table 9: Fold-changes of candidate genes expression in shoots as determined by reverse transcription quantitative polymerase chain reaction  
The values are given as fold-changes (FC) and are not logarithmized.

	neodporni kultivar - nadz. deli				odporni kultivar - nadz. deli			
	6 dpi	12 dpi	18 dpi	30 dpi	6 dpi	12 dpi	18 dpi	30 dpi
HIPR-1	1,6	1,0	123,4	661,6	3,7	-1,0	4,3	15,1
HILTP	9,6	4,7	47,9	92,9	4,5	1,9	3,3	14,2
HЛИPR-6	10,8	4,2	7,4	185,6	18,7	1,2	3,0	39,5
HIPx4	19,0	-2,0	-3,6	1,2	35,8	1,1	4,6	16,9
HIPME2	7,0	1,4	3,6	42,9	2,3	-2,0	-1,7	2,8
HlCYP86A	-3,8	-2,7	-5,2	-1,2	-8,1	-19,4	-30,6	-4,5
HIGLIP	-6,1	-8,5	-5,3	-7,6	-11,7	-9,0	-92,9	-4,6
HIMLP423	-4,8	-8,3	-6,8	-1,4	-19,4	-16,6	-76,8	-3,7

#### 4.5.2 Odzivi genov, vključenih v splošno obrambo rastlin

Spolšni odzivi rastlin na okužbo s patogenim mikroorganizmom se sprožijo ob prepoznavi molekularnih vzorcev PAMP in DAMP in vključujejo tvorbo proti-mikrobnih fitoaleksinov in PR proteinov. Gre za nespecifičen odziv rastline na okužbo. Imunost sprožena z molekularnimi vzorci, značilnimi za patogene, je opisana v poglavju 2.3.1.1.

Ena od značilnosti splošnega obrambnega odziva je torej tvorba proteinov PR. Ti proteini predstavljajo raznoliko skupino, ki obsega proteine s širokim spektrom funkcij: glukanaze, hitinaze, endoproteinaze, proteinazne inhibitorje, peroksidaze, defenzine, tionine, proteine za prenos lipidov, ribonukleaze, oksalat-oksidaze in tudi proteine z neznanimi funkcijami

(van Loon in van Strien, 1999; van Loon, in sod., 2006). Proteini PR se pogosto pojavljajo kot skupine izrazito sorodnih proteinov z zelo podobnimi zaporedji in so na podlagi tega razvrščeni v 17 družin proteinov, označenih PR-1, PR-2 ipd. (van Loon in sod., 2006). V odziv na različne patogene organizme se v rastlini inducirajo tudi različne skupine proteinov PR, na kar vpliva predvsem hormonska signalizacija (Spoel in Dong, 2012) – kot je bilo opisano v poglavju 2.3.1.3 je pri odzivu namreč pomembno razmerje dveh glavnih, deloma antagonistično delujočih hormonskih poti: poti salicilne kislina, ki je povezana predvsem z odzivom na biotrofne mikroorganizme, ter poti jasmonske kislino in etilena, ki je povezana predvsem z odzivom na nekrotrofne organizme.

Glede na rezultate mrežne analize funkcijске obogatitve s programom ClueGO do splošnega obrambnega odziva pride predvsem v neodpornem kultivarju, pri katerem so tako v nadzemnih delih kot v koreninah obogatene skupine pojmov GO, ki so povezane s pripojenim imunskim odzivom, z obrambnim odzivom nekompatibilne interakcije, z odzivom na poškodbe, z odzivom na jasmonsko kislino in s hitinazno aktivnostjo (Preglednica 7 in Slika 13).

Na podlagi vzorcev izražanja in povezanosti z obrambnim odzivom smo kot kandidatne gene izbrali tri gene za proteine podobne proteinom PR: PR-1 podoben *HlPR-1*, lipidnemu prenašalcu (PR-14) podoben *HILT*P in proteaznemu inhibitorju podoben *HlPR-6* (Preglednica 8). Spodaj so opisani njihovi vzorci izražanja in predvidene vloge pri odgovoru na okužbo.

#### 4.5.2.1 Gen za PR-1 protein *HlPR-1*

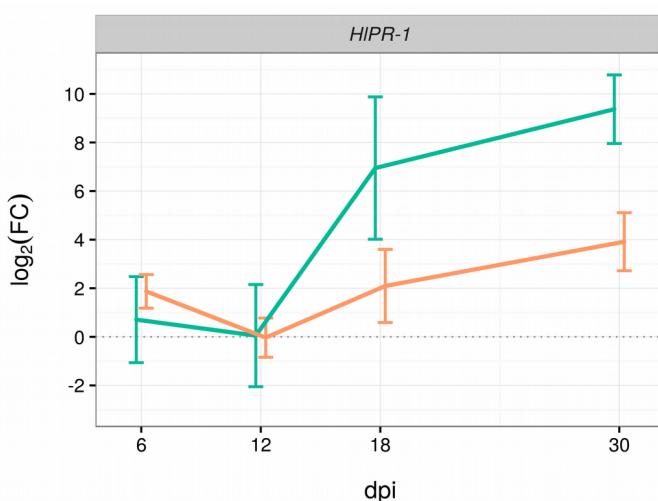
Proteini PR-1 so zelo ohranjena skupina zunajceličnih proteinov, ki se univerzalno pojavljajo v vseh rastlinah (van Loon in sod., 2006). Gre za majhne proteine, ki so si strukturno zelo podobni in so sestavljeni iz štirih α-heliksov, štirih β-trakov in številnih ohranjenih aminokislin, vključno s 6 cisteini; njihova ohranjenost in vsesplošna prisotnost kažeta na vključenost v evolucijsko pomembne procese, vendar njihova funkcija žal ni znana (van Loon in sod., 2006). Ker se izražanje genov *PR-1* inducira ob okužbi s patogenimi mikroorganizmi ali ob dodajanju salicilne kislino, se geni *PR-1* pogosto uporablajo kot označevalci za sistemsko pridobljeno odpornost (van Loon in van Strien, 1999).

V našem poskusu se je izražanje *HlPR-1* po okužbi z glivo *V. nonalfalfa*e močno povišalo pri obeh kultivarjih in sicer predvsem v poznejših časovnih točkah (Slika 15). Sprememba izražanja je bila najmočnejša pri neodpornem kultivarju, in je pri točki 30 dpi dosegla kar 661,6-kratno povišanje izražanja (Preglednica 9). Pri odpornem kultivarju je bila sprememba precej manjša in je pri 30 dpi znašala 15,1-kratno povišanje izražanja.

Močno povišanje izražanja gena *PR-1* je bilo pokazano že v predhodni raziskavi odziva hmelja na okužbo z glivo *V. nonalfalfa*e, ki so jo izvedli Cregeen in sod. (2015). Poročali so o močnejšem povišanju izražanja v neodpornem kultivarju v primerjavi z odpornim pri časovni točki 10 dpi (153-kratno povišanje v neodpornem kultivarju in le 1,5-kratno v odpornem), medtem ko je bilo v kasnejših točkah povišanje izražanja *PR-1* v obeh

kultivarjih primerljivo (okoli 64-kratno). Jiang in sod. (2005) so poročali o močni indukciji gena *PR-1* pri repnjakovcu ob aplikaciji toksinskega izolata iz glive *V. dahliae*. Pri rižu se je ob okužbi z glivo *Magnaporthe grisea* povišalo izražanje genov *PR-1* v odpornih in neodpornih rastlinah, pri čemer je bilo povišanje izražanja rahlo bolj poudarjeno v neodpornih rastlinah (Mitsuhara in sod., 2008).

V poskusih *in vitro* proteini *PR-1* sicer izkazujejo protiglivni učinek (Alexander in sod., 1993; Nideman in sod., 1995), vendar njihovo konstitutivno izražanje v transgenih rastlinah ne poveča rastlinske odpornosti na patogene mikroorganizme (van Loon in sod., 2006).



Slika 15: Vzorci izražanja kandidatnega gena *HlPR-1* v nadzemnih delih hmelja po okužbi z glivo *V. nonalfafae*, določeni z metodo kvantitativne verižne reakcije s polimerazo s predhodno obratno transkripcijo

Zelena: neodporni kultivar, oranžna: odporni kultivar. Črte predstavljajo povprečno logaritmizirano razmerje spremembe med izražanjem v okuženih in kontrolnih rastlinah  $\log_2(\text{FC})$ . Prikazana je tudi standardna napaka (SE; n=3).

Figure 15: Expression patterns for candidate gene *HlPR-1* in hop shoots following infection with *V. nonalfafae*, determined with reverse transcription quantitative polymerase chain reaction  
Green: susceptible cultivar, orange: resistant cultivar. Lines represent average logarithmized fold-change between expression in infected and control plants  $\log_2(\text{FC})$ . Bars represent standard error (SE; n=3).

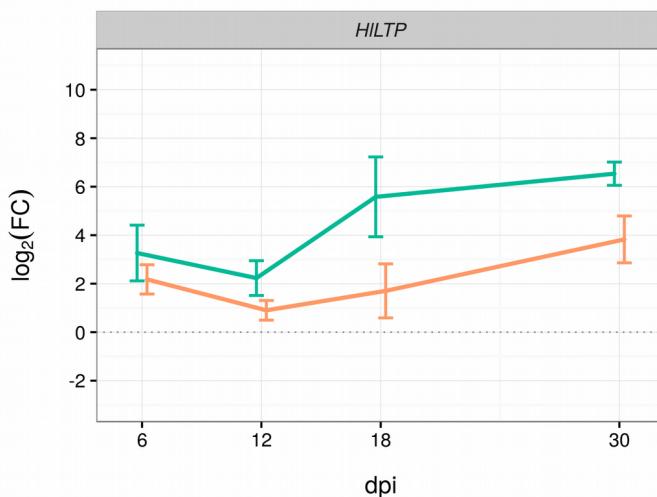
#### 4.5.2.2 Gen za lipidni prenašalec *HlLTP*

Lipidni prenašalci (LTP, ang. lipid transfer proteins) so majhni proteini z ohranjenim motivom osmih cisteinov in notranjim hidrofobnim žepkom, ki predstavlja vezavno mesto za lipide in omogoča LTP proteinom vezavo in prenos fosfolipidov med membranami (Carvalho in Gomes, 2007; Sels in sod., 2008). Imajo tudi signalni peptid in se povezujejo z zunanjim stranom celične stene (Garcia-Olmedo in sod., 1995; Carvalho in Gomes, 2007), kjer so verjetno vključeni v sekrecijo oz. nalaganje kutina in voskov (Garcia-Olmedo in sod., 1995; Sels in sod., 2008). LTP proteini so lokalizirani v velikih koncentracijah na izpostavljenih površinah rastline ter v prevodnem tkivu (Garcia-Olmedo in sod., 1995). Na izražanje LTP proteinov med drugim vplivajo tudi okužbe s patogenimi mikroorganizmi in

dodajanje elicitorjev, zato so bili uvrščeni v družino s patogenezo povezanih proteinov PR-14 (Sels in sod., 2008; van Loon in sod., 2006).

Za LTP proteine sicer v splošnem velja, da so bazični (Sels in sod., 2008; Liu in sod., 2015), medtem ko smo za naš homolog *HILTP* predvideli nizko izoelektrično točko (Preglednica 8). Med LTP proteini je kislost specifična za DIR-1 (Mitton in sod., 2009; Lascombe in sod., 2008), ki naj bi bil odgovoren za prenos signala na daljavo pri sistemsko pridobljeni odpornosti (Maldonado in sod., 2002).

V našem poskusu je bilo izražanje *HILTP* po okužbi z glivo *V. nonalfafae* povišano pri obeh kultivarjih (Slika 16). Izražanja je bilo ponovno močneje povišano v neodpornih rastlinah, z vrhom pri 30 dpi (92,9-kratno povišanje), medtem ko je bilo v odpornem kultivarju izražanje LTP povišano do 14,2-krat (Preglednica 9).



Slika 16: Vzorci izražanja kandidatnega gena *HILTP* v nadzemnih delih hmelja po okužbi z glivo *V. nonalfafae*, določeni z metodo kvantitativne verižne reakcije s polimerazo s predhodno obratno transkripcijo

Zelena: neodporni kultivar, oranžna: odporni kultivar. Črte predstavljajo povprečno logaritmizirano razmerje spremembe med izražanjem v okuženih in kontrolnih rastlinah  $\log_2(\text{FC})$ . Prikazana je tudi standardna napaka (SE; n=3).

Figure 16: Expression patterns for candidate gene *HILTP* in hop shoots following infection with *V. nonalfafae*, determined with reverse transcription quantitative polymerase chain reaction. Green: susceptible cultivar, orange: resistant cultivar. Lines represent average logarithmized fold-change between expression in infected and control plants  $\log_2(\text{FC})$ . Bars represent standard error (SE; n=3).

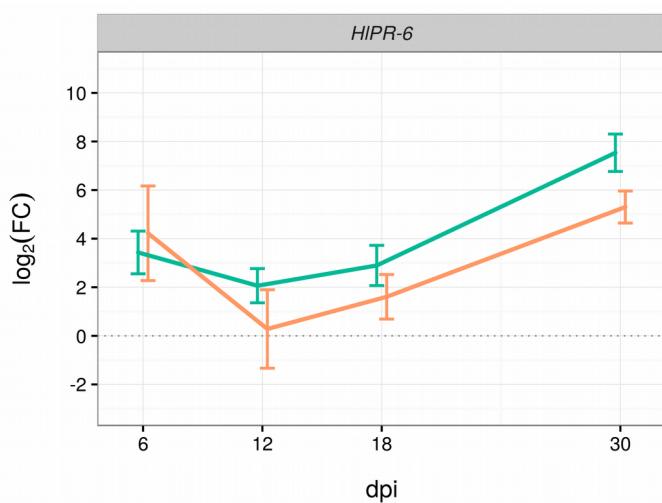
Pri eksperimentih na drugih patosistemih poročajo o nekoliko drugačnih vzorcih izražanja LTP gena po okužbi s patogenimi glivami. Tako je pri ječmenu okužba z glivo *Blumeria graminis* povzročila povečano izražanje LTP tako v odpornih kot v neodpornih rastlinah, medtem ko je ob okužbi z glivo *Rhynchosporium secalis* do povečanega izražanja LTP prišlo le v odpornih rastlinah (Garcia-Olmedo in sod., 1995). Podobno je do povečanja izražanja LTP le v odpornih rastlinah prišlo ob okužbi pšenice z glivo *B. graminis* (Li A. L. in sod., 2006).

Tudi za proteine LTP je bil *in vitro* pokazan inhibitorni učinek na rast gliv in bakterij (Garcia-Olmedo in sod., 1995; Molina in Garcia-Olmedo, 1997). Poleg že omenjene vloge pri sistemsko pridobljeni imunosti (Maldonado in sod., 2002), so vključeni tudi v odpornost. Tako je na primer čezmerno izražanje LTP povečalo odpornost pšenice na glivo *B. graminis* (Li A. L. in sod., 2006), repnjakovca na glivo *Botrytis cinerea* in na bakterijo *Pseudomonas syringae* (Chassot in sod., 2007; Jung in sod., 2005), ter tobakovca na oomiceto *Phytophthora nicotianae* in na bakterijo *P. syringae* (Sarowar in sod., 2009).

#### 4.5.2.3 Gen za proteazni inhibitor *HIPR-6*

Družina s patogenezo povezanih proteinov PR-6 predstavlja proteazne inhibitorje, katerih izražanje se v rastlinah inducira ob poškodbah (Sels in sod., 2008). Rastlinski proteazni inhibitorji lahko prispevajo k obrambnemu odzivu na dva načina – z inhibicijo proteaz patogenega mikroorganizma ali pa preko regulacije endogenih proteaz – in so predvidoma vpleteni predvsem v imunost sproženo z efektorji (Sels in sod., 2008; Jashni in sod., 2015).

Za homolog *HIPR-6* iz repnjakovca (inhibitor serinskih proteaz, AT5G43580; Preglednica 8) je bilo pokazano, da je vključen v odpornost proti nekrotrofnim glivam, da je njegovo izražanje inducirano z jasmonsko kislino, salicilno kislino in abscizinsko kislino ter da se akumulira znotraj- in zunaj-celično, kar kaže na možnost učinkovanja tako na endogene proteaze kot na proteaze patogenega mikroorganizma (Laluk in Mengiste 2011).



Slika 17: Vzorci izražanja kandidatnega gena *HIPR-6* v nadzemnih delih hmelja po okužbi z glivo *V. nonalfiae*, določeni z metodo kvantitativne verižne reakcije s polimerazo s predhodno obratno transkripcijo

Zelena: neodporni kultivar, oranžna: odporni kultivar. Črte predstavljajo povprečno logaritmizirano razmerje spremembe med izražanjem v okuženih in kontrolnih rastlinah  $\log_2(\text{FC})$ . Prikazana je tudi standardna napaka (SE; n=3).

Figure 17: Expression patterns for candidate gene *HIPR-6* in hop shoots following infection with *V. nonalfiae*, determined with reverse transcription quantitative polymerase chain reaction. Green: susceptible cultivar, orange: resistant cultivar. Lines represent average logarithmized fold-change between expression in infected and control plants  $\log_2(\text{FC})$ . Bars represent standard error (SE; n=3).

Izražanje *HlPR-6* je bilo v našem eksperimentu po okužbi z glivo *V. nonalfalfa*e povišano v obeh kultivarjih hmelja, pri čemer je bilo pri 6 dpi izražanje nekoliko bolj povišano v odpornem kultivarju, v ostalih točkah pa je bilo znatno bolj povišano v neodpornem kultivarju (Slika 17). Pri obeh kultivarjih je bilo izražanje najbolj povišano pri 30 dpi, in sicer 185,6-krat v neodpornem kultivarju in 39,5-krat v odpornem (Preglednica 9).

Gottwald in sod. (2012) so pri poskusu na pšenici ugotovili, da je po okužbi z glivo *Fusarium graminearum* izražanje inhibitorja serinskih proteaz prav tako povišano v odpornih in v neodpornih rastlinah, pri čemer je bilo povišanje izražanja zgodnejše in izrazitejše v odpornih rastlinah. V študiji na paradižniku Pautot in sod. (1991) poročajo, da se po okužbi z bakterijo *Pseudomonas syringae* proteazni inhibitorji nabirajo v listih hitreje pri odpornih kot pri neodpornih rastlinah.

#### 4.5.3 Odzivi genov, povezanih s spremembami celične stene

Rezultati mrežne analize s ClueGO v nadzemnih delih odpornega kultivarja odražajo obogatitev DI genov, povezanih z biogenezo celične stene (Slika 13 in Preglednica 7). Celična stena je pomemben del rastlinske obrambe in predstavlja vnaprejšnjo zaščito rastlinskih celic pred patogenimi mikroorganizmi, ki se morajo za kolonizacijo rastlinskega tkiva prebiti skoznjo (Bellincampi in sod., 2014). Celična stena ne služi le kot statična oblika zaščite, temveč se dinamično odziva na biotski stres z nalaganjem lignina in kaloze, oblikovanjem papil in navzkrižnim povezovanjem, torej s preoblikovanjem in posledičnim ojačanjem strukturnih elementov celične stene na mestu stika s potencialnim vsiljivcem (Bellincampi in sod., 2014; Cook in sod., 2015). Celična stena igra pomembno vlogo tudi pri zaznavanju patogenega mikroorganizma, saj poleg strukturnih elementov vsebuje tudi številne proteinske receptorje, delovanje škodljivega mikroorganizma pa lahko prepozna tudi posredno z zaznavo molekularnih vzorcev DAMP, ki se sproščajo ob razgradnji celične stene na mestu napada patogenega mikroorganizma (Cantu in sod., 2008) in za ksilemske patogene kot je tudi gliva *V. nonalfalfa*e je značilno, da ob stiku z gostiteljsko rastlino izločajo veliko encimov, ki razgrajujejo celično steno (ang. cell wall-degrading enzymes, CWDE; Yadeta in Thomma, 2013).

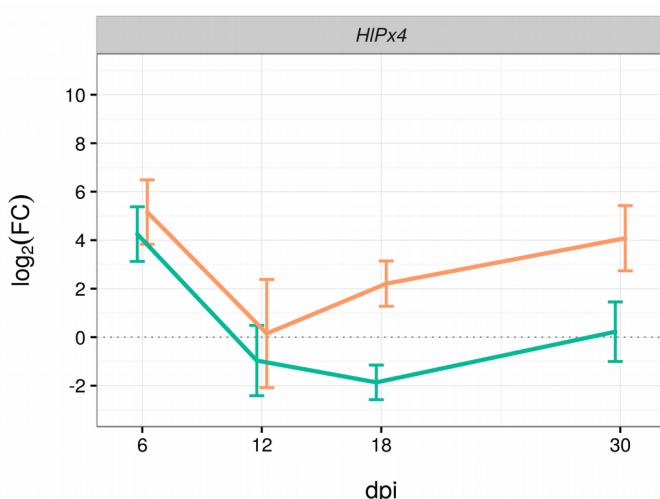
V podrobnejšo analizo smo zato vključili dva hmeljna kandidatna gena, povezana s spremenjanjem celične stene – ligninsko peroksidazo *HlPx4* in pektin metilesterazo *HlPME2*. Njune predvidene lastnosti so podane v Preglednici 8.

##### 4.5.3.1 Gen za peroksidazo *HlPx4*

Kandidatni gen *HlPx4* glede na analizo zaporedja z orodjem PeroxiScan v okviru spletne podatkovne zbirke PeroxiBase (Koua in sod., 2009) najbolj ustreza poddružini peroksidaz razreda III. Tovrstne peroksidaze so vključene v tvorbo lignina in suberina, navzkrižno povezovanje elementov celične stene, sintezo fitoleksinov in v metabolizem reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS, ang. reactive oxygen species; Almagro in sod., 2009). K rastlinski obrambi tako lahko prispevajo fizično, z zaščito pred vdorom oz. zamejitvijo patogenega mikroorganizma z ojačanjem celičnih sten ter nalaganjem lignina in suberina, ali pa v

obliki kemične eliminacije patogena mikroorganizma preko toksičnih ROS in fitoaleksinov (Yadeta in Thomma, 2013).

V našem poskusu se je izražanje kandidatnega gena *HIPx4* po okužbi z glivo *V. nonalfalfa*e povišalo predvsem v odpornem kultivarju (Slika 18). Izražanje je bilo sicer v obeh kultivarjih najbolj povišano pri točki 6 dpi – 35,8-krat v odpornem in 19,0-krat v neodpornem kultivarju (Preglednica 9). Pri obeh kultivarjih se je stopnja diferenčnega izražanja zmanjšala pri točkah 12 in 18 dpi, pri neodpornem kultivarju je bilo izražanje v teh točkah celo nižje v okuženih kot v kontrolnih rastlinah. Pri odpornem kultivarju je sledil še sekundarni vrh pri 30 dpi, kjer je bilo izražanje v okuženih za 16,9-krat višje kot v kontrolnih rastlinah.



Slika 18: Vzorci izražanja kandidatnega gena *HIPx4* v nadzemnih delih hmelja po okužbi z glivo *V. nonalfalfa*e, določeni z metodo kvantitativne verižne reakcije s polimerazo s predhodno obratno transkripcijo  
Zeleni: neodporni kultivar, oranžna: odporni kultivar. Črte predstavljajo povprečno logaritmirano razmerje spremembe med izražanjem v okuženih in kontrolnih rastlinah  $\log_2(\text{FC})$ . Prikazana je tudi standardna napaka (SE; n=3).

Figure 18: Expression patterns for candidate gene *HIPx4* in hop shoots following infection with *V. nonalfalfa*e, determined with reverse transcription quantitative polymerase chain reaction  
Green: susceptible cultivar, orange: resistant cultivar. Lines represent average logarithmized fold-change between expression in infected and control plants  $\log_2(\text{FC})$ . Bars represent standard error (SE; n=3).

Nekoliko v nasprotju z izražanjem v našem eksperimentu je bila v predhodni proteomskej študiji na enakem patosistemu hmelj – gliva *V. nonalfalfa*e po okužbi zaznana povečana prisotnost različnih peroksidaz v koreninah neodpornega, ne pa tudi odpornega kultivarja (Mandelc in sod., 2013). Pri tem velja izpostaviti, da se rezultati transkriptomskih analiz pogosto razlikujejo od rezultatov na nivoju proteinov in njihove aktivnosti, saj so pri nekaterih proteinih poleg transkripcijske pomembni tudi drugi nivoji regulacije. Vogel in Marcotte (2012) navajata oceno, da nivo mRNA običajno lahko pojasni le okoli 40 % variabilnosti v koncentraciji proteinskih produktov, saj na slednjo vplivajo tudi procesiranje prekurzorske mRNA v zrelo mRNA, učinkovitost prepisa in stabilnost oz. hitrost razpada proteinskega produkta.

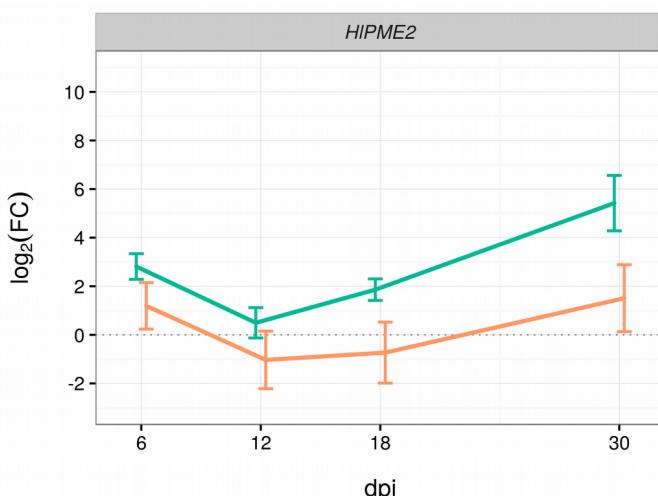
Tudi pri paradižniku je bilo po okužbi z glivo *V. dahliae* zaznano povečanje peroksidazne aktivnosti, pri čemer je bil v odpornih rastlinah višji tako konstitutivni nivo kot razmerje povečanja (Reuveni in Ferreira, 1985). V drugi študiji na istem patosistemu Gayoso in sod. (2010) poročajo, da pride do povišanja nivoja peroksidaz le v koreninah odpornega kultivarja in sicer z vrhom med 24 in 48 ur po okužbi. Do povišanja peroksidazne aktivnosti po okužbi z glivo *V. dahliae* pride tudi pri bombaževcu, in sicer tako v koreninah kot v nadzemnih delih, povišanje pa je zgodnejše in izrazitejše pri odpornem kultivarju (Xu in sod., 2011). O povečanju izražanja peroksidaz v neodpornih rastlinah poročajo po okužbi repnjakovca in oljne ogrščice z glivo *Verticillium longisporum* (Floerl in sod., 2008; Floerl in sod., 2012). Pri rižu je bilo ugotovljeno, da po okužbi z bakterijo *Xanthomonas oryzae* pride do akumulacije peroksidaz v ksilemskih parenhimskih celicah, v korelaciji z debelitvijo sekundarne ksilemske stene (Hilaire in sod., 2001).

#### 4.5.3.2 Gen za pektin metilesterazo *HlPME2*

Pektin metilesteraze (PME) katalizirajo reakcijo de-metilesterifikacije pektinov, ki se sicer v celično steno nalagajo v metilesterificirani obliki; v reakciji se sproščajo kisle oblike pektinov in metanol, posledica pa so spremembe v strukturi in lastnostih celične stene (Raiola in sod., 2011). Aktivnost PME naredi celično steno bolj dovetno za razgradnjo s pektolitičnimi encimi patogenih organizmov in jim s tem olajša proces okuževanja, zato je toliko bolj nenavadno, da se izražanje PME v rastlinah pogosto poviša ob zaznavi patogenega mikroorganizma (Raiola in sod., 2011). Po drugi strani je bilo pri repnjakovcu pokazano, da se po okužbi z bakterijo *Pseudomonas syringae* poviša le izražanje določenih PME s specifičnimi vzorci de-metilesterifikacije, ki pravzaprav prispevajo k odpornosti na to bakterijo, hkrati pa ne vplivajo na celokupno pektin metilesterazno aktivnost (Bethke in sod., 2014). Komarova in sod. (2015) izpostavljo tudi pomembno vlogo metanola, hlapnega razgradnega produkta ob delovanju PME, ki predstavlja molekularni vzorec DAMP in lahko vodi v imunost sproženo z molekularnimi vzorci, značilnimi za patogene, v ogroženi in okoliških rastlinah.

Izražanje hmeljnega kandidatnega gena *HlPME2* je bilo po okužbi z glivo *V. nonalfalfa* povišano v neodpornem kultivarju v vseh časovnih točkah z vrhom pri 30 dpi (49,2-kratno povišanje izražanja), medtem ko v odpornem kultivarju gen ni bil zelo diferenčno izražen in je bilo njegovo izražanje tako višje (2,8-krat pri 30 dpi) kot nižje (2,0-krat pri 12 dpi) v primerjavi s kontrolnimi rastlinami (Slika 19 in Preglednica 9).

Kot že omenjeno, okužbam rastlin s patogenimi organizmi pogosto sledi povišano izražanje PME. Pri repnjakovcu je bilo povišanje izražanja PME zaznano 48 ur po okužbi z glivo *Alternaria brassicicola* in 24 ur po okužbi z bakterijo *Pseudomonas syringae*; avtorji so predpostavili, da izražanje PME predvidoma sproži patogeni mikroorganizem s poseganjem v signalno pot jasmonske kisline in etilena (Bethke in sod., 2014). Tudi v drugi raziskavi na repnjakovcu je bilo ugotovljeno povišano izražanje PME po okužbi z glivo *Botrytis cinerea* ali z bakterijo *Pectobacterium carotovorum*, izražanje ene od PME pa je bilo celo ključnega pomena za začetek kolonizacije (Raiola in sod., 2011).



Slika 19: Vzorci izražanja kandidatnega gena *HIPME2* v nadzemnih delih hmelja po okužbi z glivo *V. nonalfalfa*e, določeni z metodo kvantitativne verižne reakcije s polimerazo s predhodno obratno transkripcijo  
Zelena: neodporni kultivar, oranžna: odporni kultivar. Črte predstavljajo povprečno logaritmizirano razmerje spremembe med izražanjem v okuženih in kontrolnih rastlinah  $\log_2(\text{FC})$ . Prikazana je tudi standardna napaka (SE; n=3).

Figure 19: Expression patterns for candidate gene *HIPME2* in hop shoots following infection with *V. nonalfalfa*e, determined with reverse transcription quantitative polymerase chain reaction  
Green: susceptible cultivar, orange: resistant cultivar. Lines represent average logarithmized fold-change between expression in infected and control plants  $\log_2(\text{FC})$ . Bars represent standard error (SE; n=3).

#### 4.5.4 Odzivi genov, vključenih v metabolizem kutina

Metabolizem kutina je bil po mrežni analizi z ClueGO najbolj z DI geni obogaten pojem GO v odpornem kultivarju (Preglednica 7). To je bilo nekoliko v nasprotju z našimi pričakovanji, saj spremembe v metabolizmu kutina ne sodijo med običajno obrambne odzive rasline na patogena in jih v literaturi ni zaslediti v povezavi z verticilijsko uvelostjo.

Kutin je poliester in je v večjem delu sestavljen iz oksigeniranih dolgoverižnih maščobnih kislin ter v manjšem delu iz fenilpropanoidov in glicerola, v povezavi z raznoliko skupino voskov in lipidov pa tvori kutikulo, ki predstavlja zaščitno plast na površini izpostavljenih nadzemnih delov rastlin (Fich in sod., 2016). Kutinu zelo soroden polimer je suberin, ki ima podobno sestavo in si z njim tudi deli biosintetske in regulatorne poti, akumulira pa se predvsem v apoplastnem območju periderma, endoderma in koreninskega eksoderma (Fich in sod., 2016). Številni patogeni mikroorganizmi zato izločajo kutinaze, encime za razgradnjo kutina, s pomočjo katerih lahko prodrejo skozi kutikulo in s tem omogočijo kolonizacijo rastline (Serrano in sod., 2014). Pri glivi *V. dahliae* je bila na primer pokazana pozitivna korelacija med izražanjem gena za kutinazo in agresivnostjo seva (Gharbi in sod., 2015).

Monomeri kutina, ki nastajajo pri njegovi razgradnji, pa po drugi strani lahko v nekaterih patosistemih delujejo kot molekularni vzorci DAMP in rastlino opozorijo na napad patogenega organizma (Serrano in sod., 2014). Ta mehanizem očitno igra pomembno

vlogo, saj je transgeni repnjakovec, ki je konstitutivno izražal glivno kutinazo, postal imun na okužbo z glivo *Botrytis cinerea* (Chassot in sod., 2007). Zanimivo je, da je bil ta odziv neodvisen od glavnih hormonskih poti (opisanih v poglavju 2.3.1.3), vključeval pa je povišano izražanje lipidnih prenašalcev (LTP), peroksidaz in proteaznih inhibitorjev, ki so tudi ob kasnejših poskusih s prekomernim izražanjem vsak posamezno pripomogli k odpornosti (Chassot in sod., 2007). Geni iz prav teh skupin so bili določeni kot kandidatni geni tudi v našem eksperimentu (*HlLTP*, *HlPx4* in *HlPR-6*), vsi pa so imeli po okužbi z glivo *V. nonalfafae* večinoma povišano izražanje (Preglednica 9 ter Slike 16, 17 in 18).

Tudi pri predhodni transkriptomski raziskavi odziva hmelja na glivo *V. nonalfafae*, ki so jo izvedli Cregeen in sod. (2015), sta bila med DI geni zaznana dva, ki sta povezana z metabolizmom kutina: epoksid hidrolaza, katere izražanje je bilo bolj povišano v odpornem kultivarju, in acil-CoA vezavni protein, katerega izražanje je bilo povišano v odpornem kultivarju, v neodpornem pa se je izražanje po okužbi znižalo.

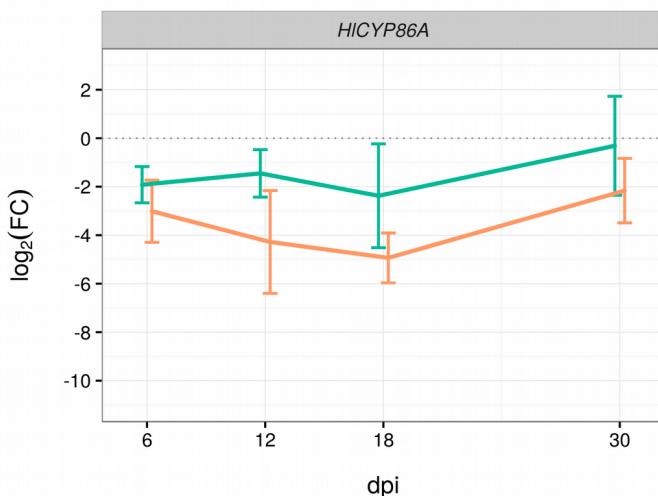
V pričujočem eksperimentu smo določili dva z metabolizmom kutina povezana gena – gen za citokrom P450 86A, *HlCYP86A*, ter gen za GDSL lipazo, *HlGLIP* (Preglednica 8).

#### 4.5.4.1 Gen za citokrom P450 86A *HlCYP86A*

Citokromi CYP86A predstavljajo poddržino citokromov P450, katere člani so omega-hidrolaze maščobnih kislin in so vključeni v sintezo kutina, tvorbo signalnih molekul in preprečevanje nabiranja prostih maščobnih kislin do toksičnega nivoja (Duan in Schuler, 2005). Ker so vključeni v sintezo kutina in suberina imajo številne in raznolike učinke na morfologijo in razvoj rastlin ter na odpornost na patogene mikroorganizme (Pinot in Beisson, 2011). Vpliv članov CYP86A na odpornost je kompleksen, saj lahko vplivajo tako na povečanje kot na zmanjšanje odpornosti. V repnjakovcu je na primer izbitje gena CYP86A2 povzročilo močno znižanje vsebnosti kutina v kutikuli, kar je imelo za posledico poleg večje propustnosti za vodo tudi zmanjšano odpornost na bakterijo *Pseudomonas syringae* (Xiao in sod., 2004), medtem ko je izbitje gena CYP86A8 sicer tudi povečalo propustnost kutikule, a je imelo za posledico bistveno izboljšanje odpornosti na glivo *Botrytis cinerea* (Bessire in sod., 2007).

V našem eksperimentu je bilo izražanje gena *HlCYP86A* pri obeh kultivarjih hmelja po okužbi z glivo *V. nonalfafae* zmanjšano v vseh časovnih točkah (Slika 20). Znižanje izražanja je bilo nekoliko močnejše v odpornem kultivarju in je bilo pri časovni točki 18 dpi za 30,6-krat nižje kot v kontrolnih rastlinah, medtem ko je bilo to v neodpornem kultivarju nižje za 5,2-krat (Preglednica 9).

O podobnem znižanju izražanja poročajo Xiao in sod. (2004) v repnjakovcu po okužbi z bakterijo *P. syringae*; do znižanja izražanja CYP86A2 je prišlo ob uporabi različno agresivnih in tudi negostiteljskih bakterijskih sevov. Drugačen odziv je bil po okužbi ječmena z glivo *Fusarium graminearum* – izražanje CYP86A2 je bilo po okužbi povečano v odpornih rastlinah, medtem ko v neodpornih ni prišlo do sprememb v izražanju.



Slika 20: Vzorci izražanja kandidatnega gena *HlCYP86A* v nadzemnih delih hmelja po okužbi z glivo *V. nonalfafae*, določeni z metodo kvantitativne verižne reakcije s polimerazo s predhodno obratno transkripcijo

Zelena: neodporni kultivar, oranžna: odporni kultivar. Črte predstavljajo povprečno logaritmizirano razmerje spremembe med izražanjem v okuženih in kontrolnih rastlinah  $\log_2(\text{FC})$ . Prikazana je tudi standardna napaka (SE; n=3).

Figure 20: Expression patterns for candidate gene *HlCYP86A* in hop shoots following infection with *V. nonalfafae*, determined with reverse transcription quantitative polymerase chain reaction  
Green: susceptible cultivar, orange: resistant cultivar. Lines represent average logarithmized fold-change between expression in infected and control plants  $\log_2(\text{FC})$ . Bars represent standard error (SE; n=3).

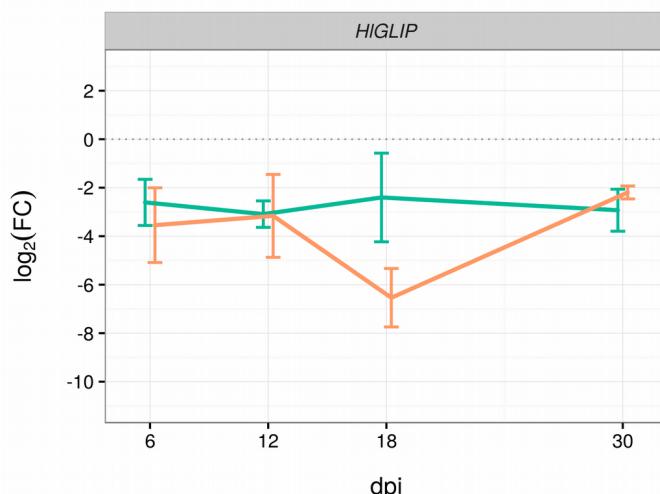
#### 4.5.4.2 Gen za lipazo GDSL *HlGLIP*

Lipaze GDSL predstavljajo obsežno družino lipaz, za katere je značilen motiv GDSL in več zelo ohranjenih domen (Volokita in sod., 2011). Lipaze GDSL so v rastlinah vključene v vrsto procesov, med drugim v obrambne odzive, odzive na abiotski stres, regulacijo rasti ter metabolizem kutina in voskov (Volokita in sod., 2011). Vloga lipaz GDSL je predvidoma povezana s signalizacijo: v repnjakovcu je lipaza GDSL 2 negativni regulator avksinske signalizacije (Lee D. S. in sod., 2009), medtem ko lipaza GDSL 1 lahko sproži sistemsko pridobljeno odpornost preko regulacije etilenskih signalnih elementov (Kwon in sod., 2009; Kim in sod., 2014).

Izražanje našega kandidatnega gena *HlGLIP* je bilo, podobno kot pri *HlCYP86A*, po okužbi z *V. nonalfafae* znižano pri obeh kultivarjih v vseh časovnih točkah (Slika 21). Najintenzivnejše znižanje izražanja *HlGLIP* je bilo v odpornem kultivarju pri 18 dpi (92,9-krat nižje kot v kontrolnih rastlinah), medtem ko je bilo v ostalih časovnih točkah zmernejše in primerljivo tistemu v neodpornem kultivarju, v katerem je bilo znižanje izražanja do 8,5-kratno v primerjavi s kontrolnimi rastlinami (Preglednica 9).

Za razliko od naših rezultatov se v drugih poskusih iz literature izražanje lipaz GDSL po okužbi s patogenim mikroorganizmom praviloma zviša, kar morda kaže na več različnih vlog lipaz GDSL pri rastlinskem obrambnem odzivu. Pri pšenici, okuženi s *Fusarium graminearum*, je na primer izražanje lipaz GDSL zvišano v odpornem kultivarju, medtem

ko v neodpornem ostane nespremenjeno (Gottwald in sod., 2012). V kitajskem zelju je po okužbi z bakterijo *P. syringae* prav tako prišlo do povišanega izražanja lipaze GDSL, avtorji pa poročajo tudi o povišanjem izražanju ob aplikaciji salicilne kisline, medtem ko aplikaciji metil-jasmonske kisline in etilena nista imeli vpliva (Lee K. A. in Cho 2003). Tudi v papriki je okužba z bakterijo *Xanthomonas campestris* povzročila hitro in močno povišanje izražanja lipaze GDSL (Hong in sod., 2008).



Slika 21: Vzorci izražanja kandidatnega gena *HIGLIP* v nadzemnih delih hmelja po okužbi z glivo *V. nonalfiae*, določeni z metodo kvantitativne verižne reakcije s polimerazo s predhodno obratno transkripcijo

Zelena: neodporni kultivar, oranžna: odporni kultivar. Črte predstavljajo povprečno logaritmirano razmerje sprememb med izražanjem v okuženih in kontrolnih rastlinah  $\log_2(\text{FC})$ . Prikazana je tudi standardna napaka (SE; n=3).

Figure 21: Expression patterns for candidate gene *HIGLIP* in hop shoots following infection with *V. nonalfiae*, determined with reverse transcription quantitative polymerase chain reaction. Green: susceptible cultivar, orange: resistant cultivar. Lines represent average logarithmized fold-change between expression in infected and control plants  $\log_2(\text{FC})$ . Bars represent standard error (SE; n=3).

#### 4.5.5 Odzivi drugih skupin genov

Poleg v predhodnih poglavijih opisanih skupin genov, so bile v mrežni analizi s programom ClueGO kot obogatene z DI geni določene tudi nekatere druge funkcijске skupine.

V nadzemnih delih neodpornega kultivarja so bili z DI geni obogateni pojmi GO, povezani s fotosintezo (Slika 13 in Preglednica 7). Izražanje genov, povezanih s fotosintezo, je bilo po podatkih RNA-Seq večinoma znižano (razvidno v Prilogi C), kar je v skladu s primeri iz literature, ki poročajo o globalnem utišanju fotosinteze zaradi delovanja efektorskih proteinov patogenih mikroorganizmov ali pa kot posledica signalizacije s sladkorji (Rojas in sod., 2014). Inhibicija fotosinteze tudi preusmeri metabolizem iz primarnega v produkcijo protimikrobnih učinkovin in izražanje obrambnih genov (Kangasjaervi in sod., 2012).

V koreninah neodpornega in v steblih odpornega kultivarja so bili z DI geni obogateni procesi, povezani z razvojem stranskih korenin (Slika 13 in Preglednica 7). Spremembe v regulaciji razvoja korenin so vsekakor zanimive, saj gliva *V. nonalfalfa*e v gostiteljsko rastlino vstopa ravno preko korenin. Tvorbo stranskih korenin nadzira kompleksna regulacijska pot; med drugim je represirana z osmotskim potencialom, ki pa ga lahko izniči npr. povečana prepustnost kutikule (MacGregor in sod., 2008). To bi lahko posredno predstavljalo še en način povezave metabolizma kutina z interakcijo med hmeljem in glivo *V. nonalfalfa*e.

V koreninah odpornega kultivarja so bili z DI geni obogateni tudi procesi, povezani z biosintezo terpenoidov (Slika 13 in Preglednica 7). Za koreninske terpenoide je znan protigiven in protibakterijski učinek (Baetz in Martinoia, 2014). O povečani tvorbi terpenoidov v koreninah, predvsem pri odpornih rastlinah, poročajo pri bombaževcu ob okužbi z *V. dahliae* (Daayf in sod., 1997) in pri paradižniku ob okužbi z *V. albo-atrum* (Hutson in Smith, 1983).

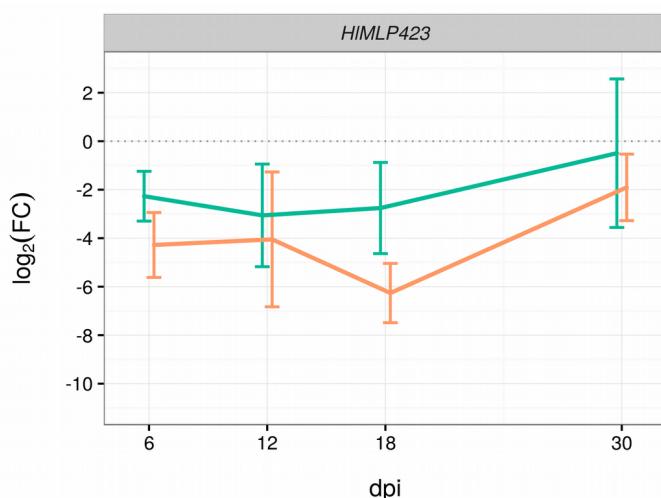
V naš izbor kandidatnih genov smo uvrstili tudi gen *HlMLP*, ki ne spada v nobeno od predhodno obravnavanih skupin, a je bil zanimiv zaradi vzorca diferenčnega izražanja ter zato, ker je bil homolog proteina MLP že povezan s specifičnim odzivom in odpornostjo na verticilijsko uvelost pri bombaževcu (Yang in sod., 2015).

#### 4.5.5.1 Gen za protein MLP *HlMLP423*

Proteini MLP (ang. major latex proteins) so specifični za rastline in so predvidoma povezani z regulacijo razvoja in obrambnimi odzivi na patogene organizme, vendar njihova natančna funkcija še ni znana (Lytle in sod., 2009). Proteini MLP so predvidoma vključeni tudi v signalne poti etilena in abscizinske kisline (Yang in sod., 2015; Wang Y. in sod., 2015).

V našem poskusu je bilo izražanje *HlMLP423* po okužbi z glivo *V. nonalfalfa*e znižano v primerjavi s kontrolnimi rastlinami pri obeh kultivarjih in v vseh časovnih točkah, pri čemer je bilo znižanje izražanja intenzivnejše v odpornem kultivarju (Slika 22). Znižanje izražanja je bilo do 76,8-kratno v odpornem kultivarju (pri 18 dpi) in do 8,3-kratno pri neodpornem kultivarju (pri 12 dpi; Preglednica 9).

Vzorci izražanja *HlMLP423* so v nasprotju z vzorci izražanja MLP opisanimi v literaturi, kjer se izražanje po okužbi praviloma zviša. Tako je do zvišanega izražanja MLP prišlo v bombaževcu po okužbi z glivo *V. dahliae*, MLP pa v tej interakciji prispeva k izboljšanju odpornosti bombaževca pred glivo (Yang in sod., 2015). Tudi v repnjakovcu poročajo o povišanem izražanju MLP ob dodatku toksina iz glive *V. dahliae* (Chen in Dai, 2010). Pri oljni ogrščici po okužbi z glivo *Sclerotinia sclerotiorum* poročajo o povišanju izražanja MLP v odpornem kultivarju in o znižanju v neodpornem kultivarju (Garg in sod., 2013).



Slika 22: Vzorci izražanja kandidatnega gena *HMLP423* v nadzemnih delih hmelja po okužbi z glivo *V. nonalfae*, določeni z metodo kvantitativne verižne reakcije s polimerazo s predhodno obratno transkripcijo  
Zelena: neodporni kultivar, oranžna: odporni kultivar. Črte predstavljajo povprečno logaritmizirano razmerje spremembe med izražanjem v okuženih in kontrolnih rastlinah  $\log_2(\text{FC})$ . Prikazana je tudi standardna napaka (SE; n=3).

Figure 22: Expression patterns for candidate gene *HMLP423* in hop shoots following infection with *V. nonalfae*, determined with reverse transcription quantitative polymerase chain reaction  
Green: susceptible cultivar, orange: resistant cultivar. Lines represent average logarithmized fold-change between expression in infected and control plants  $\log_2(\text{FC})$ . Bars represent standard error (SE; n=3).

## 5 SKLEPI

V okviru doktorskega dela je bila izvedena prva RNA-Seq analiza hmelja po okužbi z glivo *V. nonalfafae*, povzročiteljico verticilijske uvelosti hmelja. Študija je obsegala pripravo, sekvenciranje in analizo vzorcev iz 32 različnih eksperimentalnih pogojev, ki so vključevali odporen in neodporen kultivar hmelja ter ločeno vzorčenje korenin in nadzemnih delov v štirih časovnih točkah med 6 in 30 dnevi po okužbi ter ustrezne kontrolne vzorce za vsak okužen vzorec (Slika 5).

Pri sekvenciranju na platformi Illumina HiSeq2000 je bilo generiranih za 41 Gbp sekvenčnih podatkov oz. v povprečju 25,7 M enosmernih odčitkov dolžine 50 nt na posamezni pogoj. Sekvencirani odčitki so bili naloženi v podatkovno zbirkko European Nucleotide Archive pod identifikatorjem PRJEB14243, kjer so na voljo za javno uporabo.

Sekvencirani odčitki so bili poravnani na osnutek genoma hmelja (Natsume in sod., 2014), ki je bil anotiran s predvidenimi geni (HopBase ..., 2015). V povprečju se je na genomska zaporedja poravnalo 65 % odčitkov, vendar je uspešnost poravnave zelo nihala in je segala od 16 % do 91 % (Preglednica 5). Med vzorci s slabo poravnavo je iz neznanega razloga izstopala skupina okuženih vzorcev nadzemnih delov odpornega kultivarja v vseh štirih časovnih točkah (Slika 9). Od 46.735 anotiranih genov je bilo 51 % izraženih ( $CPM \geq 1$ ) v vsaj enem od vzorcev, 29 % pa v vseh 32 vzorcih.

Za oceno diferenčnega izražanja smo zaradi posebnosti študije, ki je vsebovala zelo veliko različnih pogojev, a brez bioloških ponovitev, preizkusili tri različne metode. Poleg pogosto uporabljane metode z razmerjem spremembe smo preizkusili lastno nadgrajeno obliko metode, MAQR, ki upošteva poleg razmerja spremembe tudi povprečno absolutno izražanje genov, ter metodo FunPat, ki so jo avtorji razvili specifično za RNA-Seq poskuse s časovnimi zaporedji (Sanavia in sod., 2015). Po primerjavi stotih najbolj DI genov z vsako od metod, se je izbor genov z metodo FunPat izkazal za najbolj različnega od treh (Slika 12), ob pregledu seznamov najbolj DI genov in njihovih predvidenih funkcij pa se je izbor z metodo FunPat izkazal tudi za najbolj biološko pomenljivega. Ker metoda FunPat učinkovito kompenzira tudi odsotnost bioloških ponovitev, smo jo ovrednotili kot najprimernejšo za analizo tovrstnih podatkov in jo uporabili v nadaljnjih korakih analize rezultatov.

Število DI genov ( $p < 0,05$  po metodi FunPat, skupno v vseh pogojih 5.497 genov) je bilo pri obeh kultivarjih v koreninah nižje kot v nadzemnih delih, pri čemer je najbolj izstopalo število DI genov v koreninah odpornega kultivarja ( $n=69$ ), ki je bilo kar za 58,3-krat nižje od števila DI v nadzemnih delih ( $n=4.020$ ) in za 11,7-krat nižje od števila DI v koreninah neodpornega kultivarja ( $n=804$ ; Preglednica 6). Intenzivnejši odziv v koreninah neodpornega kultivarja v primerjavi s koreninami odpornega je v skladu z rezultati predhodnega proteomskega poskusa na hmelju, okuženem z glivo *V. nonalfafae*, kjer je bil odziv neodpornega kultivarja ravno tako mnogo močnejši od odziva odpornega, kar kaže na močnejšo a neuspešno aktivacijo obrambnih mehanizmov pri neodpornem kultivarju.

Izvedli smo tudi funkcionalno anotacijo genov hmelja, pri kateri smo uspeli poiskati podobna zaporedja za 98 % genov ter pojme GO in GO Slim za 49,6 %. Genom smo določili TAIR identifikatorje najbolj podobnih proteinov iz repnjakovca, kar je bilo mogoče za 95,1 % genov. Funkcionalno obogatitev diferenčnega izražanja smo najprej poskušali določiti z analizo relativnih frekvenc DI genov pripisanih posameznim pojmom GO Slim, a so se rezultati izkazali za preveč splošne in iz njih ni bilo mogoče sklepati o mehanizmih odziva na okužbo.

Zato smo s programom ClueGO izvedli še mrežno analizo funkcijalne obogatitve po sto najbolj DI genov za vse štiri kombinacije kultivar-organ in dobili veliko bolj informativne rezultate. V neodpornem kultivarju so bili tako v nadzemnih delih kot v koreninah z DI geni najbolj obogateni procesi, povezani s splošnim, nespecifičnim obrambnim odzivom (odziv na poškodbo, odziv na jasmonsko kislino, hitinazna aktivnost itd.), medtem ko takšen odziv ni bil zaznan pri odpornem kultivarju, kar je v skladu z rezultati predhodnih študij transkriptomskega in proteomskega odziva hmelja na okužbo z glivo *V. nonalfalfa* (Cregeen in sod., 2015; Mandelc in sod., 2013). V odpornem kultivarju je mrežna analiza pokazala obogatitev z DI geni v procesih, povezanih z biosintezo terpenoidov v koreninah in s spremembami celične stene in biosintezo kutina v nadzemnih delih. Obogatitev biosinteze kutina z DI geni ni bila pričakovana, saj do zdaj kutin ni bil deležen večje pozornosti v povezavi z verticilijsko uvelostjo, glede na naše rezultate pa bi lahko predstavljal specifičen odziv hmelja na glivo in morda predstavlja zanimiv nov pristop k razumevanju interakcije med hmeljem in glivo *V. nonalfalfa*.

Na podlagi funkcijalne anotacije in vzorcev izražanja smo izbrali 8 kandidatnih hmeljnih genov, potencialno vključenih v odpornost na verticilijsko uvelost: *HlPR-1* (protein PR-1), *HlLTP* (prenašalec lipidov), *HlPR-6* (proteazni inihbititor *HlPx4* (peroksidaza), *HlPME2* (pektin metilesteraza), *HlCYP86A* (citokrom P450 86A), *HlGLIP* (lipaza GDSL) in *HlMLP423* (protein MLP). Njihove lastnosti in hmeljni identifikatorji HopBase ter TAIR identifikatorji najbolj podobnih proteinov v repnjakovcu so podani v Preglednici 8.

Izražanje kandidatnih genov smo preverili z RT-qPCR, pri čemer pa smo naleteli na težavo, saj za koreninske vzorce s to metodo nismo mogli dobiti zanesljivih rezultatov. Na podlagi razmerij absorbanc  $A_{260}/A_{280}$  in  $A_{260}/A_{230}$ , ki so bile za koreninske vzorce izven optimalnega območja in bistveno drugačne od razmerij absorbanc pri nadzemnih vzorcih (Slika 7), predvidevamo, da so bile razlog za slabe rezultate RT-qPCR v koreninah nečistoče pri izolaciji RNA. Predvidevamo, da so te nečistoče humične in fulvične kisline, ki pogosto predstavljajo problem pri izolaciji vzorcev RNA, ki izhajajo iz zemlje in se jim je zelo zahtevno izogniti ter lahko motijo reakcijo qPCR tako preko inhibicije pomnoževanja kot preko inhibicije detekcije s fluorescenčnimi barvili (Sidstedt in sod., 2015; Wang Y. in sod., 2012).

Rezultati RT-qPCR so bili po drugi strani v nadzemnih vzorcih v zelo dobri korelaciji z vrednostmi  $\log_2(FC)$ , določenimi z RNA-Seq – Pearsonov koeficient korelacije je znašal 0,79, s 95 % intervalom zaupanja med 0,67 in 0,87. Vzorce izražanja kandidatnih genov glede na RNA-Seq smo torej potrdili z metodo RT-qPCR, s čimer smo posredno potrdili

splošno veljavnost RNA-Seq za nadzemne vzorce. Vzorce izražanja kandidatnih genov smo zato obravnavali predvsem v nadzemnih delih, pri tem pa smo upoštevali rezultate po metodi RT-qPCR, pri kateri so bile za razliko od rezultatov RNA-Seq ločeno analizirane tudi po 3 biološke ponovitve na vzorec.

Kandidatni geni *HlPR-1*, *HlLTP* in *HlPR-6* spadajo med gene za proteine PR in so predstavniki splošnega rastlinskega obrambnega odziva. Izražanje vseh treh genov je bilo povišano pri obeh kultivarjih, pri čemer je bilo le-to močnejše v neodpornem kultivarju (Slike 15, 16 in 17 ter Preglednica 9), kar je, kot že omenjeno, v skladu s predhodnimi raziskavami na hmelju (Cregeen in sod., 2015). Močnejša indukcija *HlLTP* in proteaznega inhibitorja *HlPR-6* v neodpornem kultivarju se sicer nekoliko razlikuje od poročil o poskusih na drugih patosistemih, kjer okužba z glivami običajno povzroči močnejše zvišanje teh genov v odpornih rastlinah; to morda kaže na vključenost drugačnih mehanizmov odpornosti v hmelju.

Kandidatna gena *HlPx4* in *HlPME2* sodita med gene, povezane z biogenezo in spreminjanjem celične stene, ki je med kolonizacijo z glivo *V. nonalfalfa*e izpostavljena razgradnji s številnimi glivnimi encimi. Izražanje *HlPx4*, gena za peroksidazo povezano s tvorbo lignina, je bilo po okužbi z glivo *V. nonalfalfa*e v odpornem kultivarju bolj povišano kot v neodpornem, v katerem je bilo v dveh časovnih točkah celo nižje kot v kontrolnih vzorcih (Slika 18). To je v skladu s poročili o povečani aktivnosti peroksidaz in formacije lignina v bombaževcu in paradižniku po okužbi s sorodno glivo *V. dahliae* (Xu in sod., 2011; Gayoso in sod., 2010). Izražanje gena za pektin metilesterazo *HlPME2* je bilo po okužbi povišano predvsem v neodpornem kultivarju, medtem ko v odpornem kultivarju ni prišlo do pomembnejšega diferenčnega izražanja (Slika 19). Ker lahko po poročilih iz literature delovanje PME omogoči patogenemu organizmu lažjo začetno kolonizacijo, patogeni mikroorganizmi pa lahko predvidoma celo sprožijo izražanje gena za PME v rastlini (Bethke in sod., 2014), je močnejše povišanje izražanja *HlPME2* ob okužbi z *V. nonalfalfa*e morda lahko v škodo neodpornemu kultivarju hmelja.

Kandidatna gena *HlCYP86A* in *HlGLIP* spadata med gene, neposredno povezane z biosintezo kutina, po mrežni analizi sodeč najbolj z DI geni obogatene funkcijске skupine v nadzemnih delih odpornega kultivarja (Preglednica 7 in Slika 13). Izražanje obeh genov je bilo po okužbi z glivo *V. nonalfalfa*e znižano pri obeh kultivarjih, pri čemer je bilo znižanje, še posebno pri *HlCYP86A*, bolj intenzivno v odpornem kultivarju (Sliki 20 in 21). V raziskavah na drugih patosistemih avtorji sicer poročajo tako o povišanju kot znižanju izražanja CYP86A genov po okužbi s patogenim organizmom in praviloma le o zvišanju genov za lipaze GDSL, a po drugi strani je bilo na primer pokazano, da se v repnjakovcu z umetnim izbitjem gena CYP86A8 bistveno izboljša odpornost na glivo *Botrytis cinerea* (Bessire in sod., 2007). Monomeri kutina lahko delujejo tudi kot molekularni vzorci DAMP in sprožijo specifičen odziv, ki vključuje povišano izražanje lipidnih prenašalcev, proteznih inhibitorjev in peroksidaz (Chassot in sod., 2007), katerih izražanje je bilo povečano tudi v našem eksperimentu. Na možno vključenost metabolizma kutina v odziv hmelja na verticilij kaže tudi identifikacija dveh drugih s kutinom povezanih genov v predhodni transkriptomski raziskavi (Cregeen in sod., 2015). Gre za gena za epoksid

hidrolazo in za acil-CoA vezavni protein, ki sta v omenjeni raziskavi pokazala različne vzorce izražanja v odpornem in neodpornem kultivarju.

Kandidatni gen *HIMLP423* se sicer neposredno ne uvršča v nobeno izmed skupin, določenih z mrežno analizo funkcijске obogativte, vendar smo njegovo izražanje vseeno preizkusili zaradi predhodne asociacije proteina MLP s sprecifičnim odzivom in odpornostjo bombaževca na sorodno glivo *V. dahliae* (Yang in sod., 2015). Za razliko od omenjenega primera je bilo izražanje *HIMLP423* v hmelju po okužbi z *V. nonalfalfa*e znižano v primerjavi s kontrolnimi rastlinami, in sicer intenzivneje v odpornem kultivarju (Slika 22), zaradi česar sklepamo, da igra MLP pri hmelju drugačno vlogo kot v odpornosti bombaževca na verticilij.

Rezultati predstavljeni v pričujoči disertacijski torek v veliki meri potrjujejo izsledke predhodnih raziskav odziva hmelja na glivo *V. nonalfalfa*e, v katerih je bilo pokazano, da se neodporni kultivar na okužbo odzove intenzivnejše in predvsem z uporabo splošnih rastlinskih obrambnih mehanizmov (Mandelc in sod., 2013; Cregeen in sod., 2015). Z rezultati pričujoče raziskave smo dobili tudi nov vpogled na interakcijo med hmeljem in glivo *V. nonalfalfa*e, ki kaže na možno vpletenost metabolizma kutina oz. suberina, katerega vlogo pri obrambi pred verticilijsko uvelostjo je sicer predpostavil že Talboys (1958a), vendar v kasnejših raziskavah na molekularni in celični ravni ni bila deležna večje pozornosti. To predstavlja zanimivo novo izhodišče za prihodnje raziskave odpornosti hmelja na glivo *V. nonalfalfa*e.

## 6 POVZETEK (SUMMARY)

### 6.1 POVZETEK

Hmelj je pomembna kulturna rastlina iz družine *Cannabaceae*, ki se tradicionalno uporablja za pivovarske ter v manjši meri za farmacevtske namene. Storžki, ki so pravzaprav podolgovata socvetja ženskih rastlin, predstavljajo agronomski produkt hmelja. Vsebujejo lupulinske žleze, v katerih nastajajo  $\alpha$ - in  $\beta$ -kisline, ki dajejo pivu značilno grenkobo in delujejo kot konzervans, ter eterična olja, ki so ključnega pomena za aroma piva. Letna svetovna proizvodnja hmelja je ocenjena na 100.568 ton, gojijo pa ga na 54.614 hektarih (IHGC ..., 2016). Slovenija se po pridelavi hmelja uvršča na 6. mesto s 1.484 hektari obdelovalnih površin in 2,5 % deležem svetovnega pridelka.

Ena najbolj uničujočih bolezni hmelja v Evropi je verticilijska uvelost, katere glavna povzročiteljica pri hmelju je gliva *Verticillium nonalfafae* (s starim poimenovanjem *Verticillium albo-atrum*). Gliva vstopi v rastlino skozi korenine in se naseli v prevodnem tkivu (ksilemu). Povzroča bolezenska znamenja, ki vključujejo rumenenje, nekroze in odpadanje listov ter venenje, sušenje in celo propad celotne rastline.

Najučinkovitejši način preprečevanja bolezni predstavljajo uporaba odpornih kultivarjev in strogi fitosanitarni ukrepi. Vir odpornosti na verticilijsko uvelost pri hmelju izhaja iz dednine ameriškega divjega hmelja, ki je bil uporabljen za žlahtnjenje odpornih kultivarjev, nedavno pa je bil kartiran tudi kvantitativni lokus za odpornost (Jakše in sod., 2013), vendar sam mehanizem odpornosti še ni pojasnjen. Primer znanega mehanizma odpornosti na verticilijsko uvelost je receptor Ve1 iz paradižnika, ki prepoznavata efektorski protein Ave1 iz glive *Verticillium dahliae* (Song in sod., 2016) in čeprav je bil homolog Ve1 najden tudi v hmelju, gliva *V. nonalfafae*, ki okužuje hmelj, ne vsebuje efektorja Ave1, zato mora biti mehanizem odpornosti tu drugačen.

Odziv odpornih in neodpornih kultivarjev hmelja na okužbo z glivo *V. nonalfafae* je bil predmet dveh predhodnih raziskav na proteomske (Mandelc in sod., 2013) in transkriptomski ravni (Cregeen in sod., 2015). V obeh se je pokazalo močnejše diferenčno izražanje v neodpornem kultivarju, predvsem proteinov oz. genov, povezanih s splošno rastlinsko obrambo, v transkriptomski študiji pa je bilo v odpornem kultivarju specifično povečano izražanje genov, vpleteneih v ubikvitinacijo in promet celičnih veziklov.

Za podrobnejše razumevanje razlik med odzivom odpornega in neodpornega kultivarja hmelja na okužbo z glivo *V. nonalfafae* smo izvedli obsežno RNA-Seq študijo, ki je opisana v pričajoči disertaciji. Rastline odpornega in neodpornega kultivarja so bile okužene z letalnim sevom glive *V. nonalfafae* in vzorčene 6, 12, 18 in 30 dni po okužbi, pri čemer so bili ločeno pridobljeni vzorci korenin in nadzemnih delov, za vsak okužen vzorec pa je bil pridobljen tudi ustrezni kontrolni vzorec iz neokuženih rastlin. Raziskovalni cilji so obsegali določitev vzorcev diferenčnega izražanja genov po okužbi in identifikacijo kandidatnih genov, vključenih v odziv hmelja na verticilijsko uvelost, ter njihovo vlogo v diferenčno reguliranih metabolnih in signalnih poteh.

Za namen raziskave je bilo na NGS platformi Illumina sekvenciranih 32 vzorcev iz zgoraj omenjenih eksperimentalnih pogojev, za vsak vzorec je bilo pridobljenih povprečno 25,7 M enosmernih odčitkov dolžine 50 nukleotidov. Poravnani so bili na pred kratkim objavljen osnutek genoma hmelja (Natsume in sod., 2014), anotiran s predvidenimi geni (HopBase ..., 2015), pri čemer se je na genom poravnalo med 16 in 91 % odčitkov. Od 46.735 anotiranih genov jih je bilo 51 % takšnih, ki so bili izraženi v najmanj enem od vzorcev in na teh smo izvedli analizo diferenčnega izražanja.

Za oceno diferenčnega izražanja smo primerjali tri metode – pogosto uporabljano metodo razmerja spremembe, lastno nadgrajeno metodo, MAQR, ki poleg razmerja spremembe upošteva tudi povprečno absolutno izražanje genov, ter metodo FunPat, ki so jo avtorji razvili specifično za RNA-Seq poskuse, ki vsebujejo časovna zaporedja (Sanavia in sod., 2015). Sodeč po smiselnosti rezultatov se je za najbolj biološko pomenljivo izkazala metoda FunPat, ki smo jo uporabili v nadalnjih analizah.

Skupno število diferenčno izraženih genov v vseh pogojih je bilo 5.479, najbolj pa je izstopal vzorec korenin odpornega kultivarja, v katerem je bilo veliko manj izraženih genov kot pri ostalih pogojih, kar je v skladu s predhodno proteomsko študijo, v kateri je bil odziv v koreninah odpornega kultivarja bistveno manj intenziven kot odziv v koreninah neodpornega (Mandelc in sod., 2013).

Za identifikacijo funkcijskih skupin, obogatenih z najbolj diferenčno izraženimi geni, smo izvedli mrežno analizo s programom ClueGO (Bindea in sod., 2009), ki se je izkazala za zelo informativno. V neodpornem kultivarju so bili obogateni predvsem procesi, povezani s splošnim obrambnim odzivom, kar je v skladu s predhodnimi raziskavami odziva hmelja na verticilij (Cregeen in sod., 2015; Mandelc in sod., 2013). V odpornem kultivarju so v nadzemnih delih med najbolj obogatene sodile funkcijске skupine, povezane z biosintezo kutina in spremenjanjem celične stene, v koreninah pa funkcijске skupine povezane z biosintezo terpenoidov in katalizmom polisaharidov.

Na podlagi vzorcev izražanja in funkcijskih anotacij smo izbrali 8 kandidatnih hmeljnih genov, potencialno vključenih v odpornost na verticilijsko uvelost. Njihove vzorce smo preverili tudi z RT-qPCR, vendar le v nadzemnih delih, saj v koreninah s to metodo nismo mogli dobiti zanesljivih rezultatov, predvidoma na račun nečistoč, ki so se ob izolaciji prenesle skupaj z RNA. V nadzemnih delih so rezultati dobro korelirali s tistimi iz metode RNA-Seq (Pearsonov koeficient korelacije 0,79), s čimer so bili potrjeni vzorci izražanja kandidatnih genov in posredno tudi splošna veljavnost RNA-Seq rezultatov za vzorce nadzemnih delov.

Kandidatni geni *HlPR-1* (protein PR-1), *HlLTP* (prenašalec lipidov) in *HlPR-6* (proteazni inhibitor) spadajo med proteine PR in so predstavniki splošnega rastlinskega odziva, zato je bilo njihovo izražanje po okužbi, v skladu s pričakovanji, povišano pri obeh kultivarjih in sicer bolj v neodpornem kultivarju, kot je bilo pokazano že v predhodnih študijah (Cregeen in sod., 2015; Mandelc in sod., 2013).

Kandidatna gena *HlPx4* (ligninska peroksidaza) in *HlPME2* (pektin metilesteraza) sodita med gene, povezane s spremenjanjem celične stene, ki je ob okužbi z glivo *V. nonalfalfa*

podvržena razgradnji s številnimi encimi. Izražanje *HlPx4* je bilo po okužbi bolj povišano pri odpornem kultivarju v primerjavi z neodpornim, medtem ko je bilo izražanje *HlPME2* povišano predvsem pri neodpornem kultivarju, pri odpornem pa pretežno nespremenjeno.

Kandidatna gena *HlCYP86A* (citokrom P450 86A) in *HlGLIP* (lipaza GDSL) spadata med gene, povezane z biosintezo kutina, ki je bila po mrežni analizi sodeč z diferenčno izraženimi geni najbolj obogatena funkcionalna skupina v nadzemnih delih odpornega kultivarja. Oba gena sta po okužbi z verticilijem pokazala znižano izražanje pri obeh kultivarjih, ki je bilo intenzivnejše pri odpornem kultivarju.

Kandidatni gen *HlMLP423* (protein MLP) smo izbrali zaradi predhodne povezave proteina MLP z odpornostjo bombaževca na sorodno glivo *V. dahliae* (Yang in sod., 2015). Za razliko od omenjene študije je bilo izražanje *HlMLP423* v hmelju po okužbi z glivo *V. nonalfafae* znižano pri obeh kultivarjih, kar kaže na drugačno vlogo proteina MLP pri odzivu hmelja na verticilij.

Rezultati pričajočega doktorskega dela torej pretežno potrjujejo izsledke predhodnih raziskav odziva hmelja na okužbo z glivo *V. nonalfafae* in kažejo na intenzivnejši odziv neodpornega kultivarja, povezan predvsem z aktivacijo splošnih obrambnih mehanizmov. Novost predstavlja identifikacija potencialne vloge kutinskega oz. suberinskega metabolizma pri odzivu hmelja na okužbo z verticilijem, ki ni bila predvidena in bi lahko predstavljala zanimivo novo izhodišče za prihodnje raziskave odpornosti hmelja na verticilijsko uvelost.

## 6.2 SUMMARY

Hop is a valuable crop plant from *Cannabaceae* family and has traditionally been used in brewery and to some extent also in pharmaceuticals. The cones of female plants are being harvested because they are rich in lupulin glands, which contain high concentrations of bitter acids and essential oils that contribute to the characteristic aroma of beer. Yearly world production of hop is estimated at 100,568 metric tons and it is being grown on 54,614 hectares (IHGC ..., 2016). Slovenia ranks 6th among hop producing countries with 1,484 hectares of hop fields and a 2.5 % share of world hop production.

One of the most devastating diseases in European hop production is *Verticillium* wilt, caused mainly by fungus *Verticillium nonalfafae* Inderb. It is the novel name of the fungus in the title of this dissertation (*Verticillium albo-atrum* Reinke & Berthold), but the scientific community suggests the use of the new naming – *V. nonalfafae* (EFSA Panel on Plant Health, 2014). The fungus enters the plant through the roots, colonizes its vascular tissue (xylem) and causes symptoms which include yellowing and necroses of leaves, defoliation, wilting and even plant death.

The most effective means of preventing the disease is the use of resistant hop cultivars accompanied by rigorous phytosanitary measures. The source of hop resistance to *Verticillium* wilt stems from the germplasm of American wild hop, which was used in breeding of resistant cultivars; furthermore, quantitative trait loci for resistance were recently identified (Jakše et al., 2013). However, the mechanism of resistance has not been

explained to date. An example of a known *Verticillium* wilt resistance mechanism is the Ve1 receptor from tomato, which recognizes Ave1 effector protein from *Verticillium dahliae* (Song et al., 2016). A functional Ve1 homologue was identified in hop, but the hop-infecting *V. nonalfalfa*e does not contain the Ave1 effector, which implicates involvement of a different mechanism in resistance of hop to that fungus.

The responses of resistant and susceptible hop to infection with *V. nonalfalfa*e have been investigated in two earlier studies at the proteomic (Mandlc et al., 2013) and the transcriptomic level (Cregeen et al., 2015). Both identified a more intense response in the susceptible cultivar, especially of proteins and genes associated with general plant defence. In the transcriptomic study, a strong differential expression of genes involved in ubiquitination and vesicle transport was detected in the resistant cultivar.

In order to gain a more detailed insight into differences between responses of resistant and susceptible hop cultivars to infection with *V. nonalfalfa*e, we conducted an elaborate RNA-Seq study, described in this dissertation. Both resistant and susceptible plants were infected with a lethal strain of *V. nonalfalfa*e and sampled at 6, 12, 18 and 30 days post inoculation. Roots and shoots were sampled individually and each sample had a corresponding control from uninfected plants. The research goals comprised identification of patterns of differential gene expression in response to infection and identification of candidate genes, included in hop response to *Verticillium* wilt, as well as identification of their roles in the differentially regulated metabolic and signalling pathways.

For the purpose of the study, 32 samples from the conditions mentioned in the previous paragraph were subjected to sequencing on the Illumina NGS platform. On average, 25.7 M single-end, 50 nt long reads were obtained per sample. The reads were mapped to the recently published hop draft genome (Natsume et al., 2014), which was annotated with predicted genes (HopBase ..., 2015). Between 16 % and 91 % of reads were successfully mapped to the genome. 51 % out of 46,735 annotated genes were expressed in at least one of the conditions and were used for differential expression analysis.

We compared three methods to estimate differential expression – the commonly used fold-change (FC) method, an original method, MAQR, which takes into consideration mean absolute expression of genes in addition to fold-change, and the FunPat method, which Sanavia et al. (2015) developed especially for use with RNA-Seq experiments with time-series data. Judging by the biologic meaningfulness of the results, the FunPat method was identified as the best of the three and was used in further analyses.

The total number of differentially expressed genes across all of the conditions was 5,479. The number of differentially expressed genes differed the most in the roots of the resistant cultivar, as there were considerably less differentially expressed genes in this compared to the other conditions. The very low response in the roots of the resistant cultivar is consistent with the results of the previous proteomic study (Mandlc et al., 2013).

To identify functional groups enriched with the most differentially expressed genes, we performed a network analysis with the ClueGO program (Bindea et al., 2009), which proved to be very meaningful. In the susceptible cultivar, processes associated with the

general defence response were the most enriched, which is consistent with previous studies of hop response to *V. nonalfalfa* (Cregeen et al., 2015; Mandelc et al., 2013). In the resistant cultivar, the most enriched functional groups were associated with cutin biosynthesis and cell wall modifications in the shoots and terpenoid biosynthesis and catabolism of polysaccharides in the roots.

On the basis of differential expression patterns and functional annotation we then selected eight candidate hop genes, potentially involved in resistance to *Verticillium* wilt. Their expression patterns were validated with RT-qPCR, but in the shoots only, as we were not able to obtain reliable results for root samples, presumably due to impurities that were transferred along at the RNA isolation step. The RT-qPCR results in shoots were in good correlation to the RNA-Seq results (Pearson's correlation coefficient 0.79), thus confirming the expression patterns of candidate genes and indirectly the general validity of RNA-Seq results for shoot samples.

The candidate genes *HlPR-1* (predicted PR-1 protein), *HlLTP* (predicted lipid-transfer protein) and *HlPR-6* (predicted protease inhibitor) are members of pathogenesis-related (PR) proteins and represent the general plant defence response. Their expression was, as expected, up-regulated in both cultivars, and the increase was stronger in the susceptible cultivar, in agreement with previous studies (Cregeen et al., 2015; Mandelc et al., 2013).

The candidate genes *HlPx4* (predicted lignin peroxidase) and *HlPME2* (predicted pectin methylesterase) are among the genes associated with cell wall modifications. The expression of *HlPx4* was more strongly up-regulated in the resistant compared to the the susceptible cultivar, while the expression of *HlPME2* was elevated mostly in the susceptible cultivar, while the expression did not change much in the resistant cultivar.

The candidate genes *HlCYP86A* (predicted cytochrome P450 86A) and *HlGLIP* (predicted GDSL lipase) are in the group of genes, connected with cutin biosynthesis, which was the most enriched functional group in shoots of the resistant plants according to the functional network analysis. Both genes were down-regulated in both cultivars following the infection with *V. nonalfalfa* and down-regulation was stronger in the resistant cultivar.

The candidate gene *HlMLP423* (predicted MLP protein) was chosen because a MLP protein was previously associated with resistance of cotton to the related fungus *V. dahliae* (Yang et al., 2015). However, in contrast to that study, the expression of *HlMLP423* was down-regulated in both hop cultivars following the infection with *V. nonalfalfa*, which indicates a different role of the MLP protein in hop response to *Verticillium*.

The results of this doctoral work are therefore mostly in agreement with the findings of previous studies concerned with hop response to infection with *V. nonalfalfa* and indicate a stronger response of the susceptible cultivar, associated mostly with activation of general defence mechanisms. A novelty is implication of the potential role of cutin metabolism in hop response to infection with *V. nonalfalfa*, which was not foreseen and could represent an intriguing new perspective for further studies of hop resistance to *Verticillium* wilt.

## 7 VIRI

- Alexander D., Goodman R. M., Gut-Rella M., Glascock C., Weymann K., Friedrich L., Maddox D., Ahl-Goy P., Luntz T., Ward E., Ryals J. 1993. Increased tolerance to two oomycete pathogens in transgenic tobacco expressing pathogenesis-related protein 1a. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90, 15: 7327-7331
- Almagro L., Gomez Ros L. V., Belchi-Navarro S., Bru R., Ros Barcelo A., Pedreno M. A. 2009. Class III peroxidases in plant defence reactions. *Journal of Experimental Botany*, 60, 2: 377-390
- Altschul S. F., Gish W., Miller W., Myers E. W., Lipman D. J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215, 3: 403-410
- Altschul S. F., Madden T. L., Schäffer A. A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25, 17: 3389-3402
- Ashburner M., Ball C. A., Blake J. A., Botstein D., Butler H., Cherry J.M., Davis A. P., Dolinski K., Dwight S. S., Eppig J. T., Harris M. A., Hill D. P., Issel-Tarver L., Kasarskis A., Lewis S., Matese J. C., Richardson J. E., Ringwald M., Rubin G. M., Sherlock G. 2000. Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nature Genetics*, 25: 25-29
- Baetz U., Martinoia E. 2014. Root exudates: the hidden part of plant defense. *Trends in Plant Science*, 19, 2: 90-98
- Bari R., Jones J. D. G. 2008. Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Molecular Biology*, 69, 4: 473-488
- Bellincampi D., Cervone F., Lionetti V. 2014. Plant cell wall dynamics and wall-related susceptibility in plant-pathogen interactions. *Frontiers in Plant Science*, 5: 228, doi: 10.3389/fpls.2014.00228: 8 str.
- Berne S., Javornik B. 2016. Signalling crosstalk of plant defence responses to xylem-invading pathogens. V: Abiotic and biotic stress in plants - recent advances and future perspectives. Shanker A. K., Shanker C. (ur.). Rijeka, InTech: 411-440
- Bessire M., Chassot C., Jacquat A. C., Humphry M., Borel S., MacDonald-Comber Petetot J., Metraux J. P., Nawrath C. 2007. A permeable cuticle in *Arabidopsis* leads to a strong resistance to *Botrytis cinerea*. *The EMBO Journal*, 26, 8: 2158-2168
- Bethke G., Grundman R. E., Sreekanta S., Truman W., Katagiri F., Glazebrook J. 2014. *Arabidopsis* pectin methylesterases contribute to immunity against *Pseudomonas syringae*. *Plant Physiology*, 164, 2: 1093-1107
- Binda G., Mlecnik B., Hackl H., Charoentong P., Tosolini M., Kirilovsky A., Fridman W. H., Pages F., Trajanoski Z., Galon J. 2009. ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped Gene Ontology and pathway annotation networks. *Bioinformatics*, 25, 8: 1091-1093

- Botanični terminološki slovar. 2013. Batič F., Košmrlj-Levačič B. (ur.). Ljubljana, ZRC SAZU.  
<http://isjfr.zrc-sazu.si/sl/terminologisce/slovarji/botanicni> (20. okt. 2016)
- Caarls L., Pieterse C. M. J., van Wees S. C. M. 2015. How salicylic acid takes transcriptional control over jasmonic acid signaling. *Frontiers in Plant Science*, 6: 170, doi: 10.3389/fpls.2015.00170: 11 str.
- Cade B. S., Noon B. R. 2003. A gentle introduction to quantile regression for ecologists. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 1, 8: 412-420
- Cantu D., Vicente A. R., Labavitch J. M., Bennett A. B., Powell A. L. T. 2008. Strangers in the matrix: plant cell walls and pathogen susceptibility. *Trends in Plant Science*, 13, 11: 610-617
- Carvalho A. O., Gomes V. M. 2007. Role of plant lipid transfer proteins in plant cell physiology – a concise review. *Peptides*, 28, 5: 1144-1153
- Celar F. 2016a. Hmeljna peronospora - *Pseudoperonospora Humuli* (Miyabe & Takah.) G.W. Wils. FITO-INFO: slovenski informacijski sistem za varstvo rastlin. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, UVHVVR.  
[http://www.fito-info.si/index1.asp?ID=OrgCirs\OpisiSkod\vsi\pse\\_humu.htm](http://www.fito-info.si/index1.asp?ID=OrgCirs\OpisiSkod\vsi\pse_humu.htm) (21. okt. 2016)
- Celar F. 2016b. Hmeljeva pepelovka - *Sphaerotheca Humuli* (DC.) Burrill. FITO-INFO: slovenski informacijski sistem za varstvo rastlin. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, UVHVVR.  
[http://www.fito-info.si/index1.asp?ID=OrgCirs\OpisiSkod\vsi\sph\\_humu.htm](http://www.fito-info.si/index1.asp?ID=OrgCirs\OpisiSkod\vsi\sph_humu.htm) (21. okt. 2016)
- Chassot C., Nawrath C., Pierre Metraux J. P. 2007. Cuticular defects lead to full immunity to a major plant pathogen. *The Plant Journal*, 49, 6: 972-980
- ChemSpider. 2016. London, Royal Society of Chemistry.  
<http://www.chemspider.com/> (28. sep. 2016)
- Chen J. Y., Dai X.F. 2010. Cloning and characterization of the *Gossypium hirsutum* major latex protein gene and functional analysis in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 231, 4: 861-873
- Chen J. Y., Huang J. Q., Li N. Y., Ma X. F., Wang J. L., Liu C., Liu Y. F., Liang Y., Bao Y. M., Dai X. F. 2015. Genome-wide analysis of the gene families of resistance gene analogues in cotton and their response to *Verticillium* wilt. *BMC Plant Biology*, 15: 148, doi: 10.1186/s12870-015-0508-3: 15 str.
- Clark S. M., Vaitheswaran V., Ambrose S. J., Purves R. W., Page J. E. 2013. Transcriptome analysis of bitter acid biosynthesis and precursor pathways in hop (*Humulus lupulus*). *BMC Plant Biology*, 13: 12, doi: 10.1186/1471-2229-13-12: 14 str.
- Clarkson J. M., Heale J. B. 1985. Pathogenicity and colonization studies on wild-type and auxotrophic isolates of *Verticillium albo-atrum* from hop. *Plant Pathology*, 34: 119-128

- CLC Genomics Server. Aarhus, QIAGEN Bioinformatics.  
<https://www.qiagenbioinformatics.com/products/clc-genomics-server/> (16. sep. 2016)
- Conesa A., Goetz S., Garcia-Gomez J. M., Terol J., Talon M., Robles M. 2005. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*, 21, 18: 3674-3676
- Cook D. E., Mesarich C. H., Thomma B. P. H. J. 2015. Understanding plant immunity as a surveillance system to detect invasion. *Annual Review of Phytopathology*, 53: 541-563
- Cregeen S., Radišek S., Mandelc S., Turk B., Štajner N., Jakše J., Javornik B. 2015. Different gene expressions of resistant and susceptible hop cultivars in response to infection with a highly aggressive strain of *Verticillium albo-atrum*. *Plant Molecular Biology Reporter*, 33, 3: 689-704
- Crowe F., Parks R. 2001. Central Oregon agricultural research center 2000 annual report: fungicide screening for control of *Verticillium* wilt of peppermint. Oregon, Central Oregon Agricultural Research Center, Oregon State University: 205 str.  
<http://library.state.or.us/repository/2010/201012161327154/2000.pdf> (20. okt. 2016)
- Cui H., Tsuda K., Parker J. E. 2015. Effector-triggered immunity: from pathogen perception to robust defense. *Annual Review of Plant Biology*, 66: 487-511
- Čerenak A., Košir I. J. 2012. Dišavne sorte hmelja - nov trend v pivovarstvu. *Hmeljar*, 74, 9: 66-67
- Daayf F., Nicole M., Boher B., Pando A., Geiger J. P. 1997. Early vascular defense reactions of cotton roots infected with a defoliating mutant strain of *Verticillium dahliae*. *European Journal of Plant Pathology*, 103, 2: 125-136
- Daayf F. 2015. *Verticillium* wilts in crop plants: pathogen invasion and host defence responses. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 37: 8-20
- Darby P. 2001. Single gene traits in hop breeding. V: Scientific commission of the international hop growers' convention IHGC. Canterbury, IHGC: 86-90
- de Coninck B., Timmermans P., Vos C., Cammue B. P. A., Kazan K. 2015. What lies beneath: belowground defense strategies in plants. *Trends in Plant Science*, 20: 91-101
- de Jonge R., van Esse H. P., Maruthachalam K., Bolton M. D., Santhanam P., Saber M. K., Zhang Z., Usami T., Lievens B., Subbarao K. V., Thomma B. P. H. J. 2012. Tomato immune receptor Ve1 recognizes effector of multiple fungal pathogens uncovered by genome and RNA sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109, 13: 5110-5115
- di Camillo B., Toffolo G., Nair S. K., Greenlund L. J., Cobelli C. 2007. Significance analysis of microarray transcript levels in time series experiments. *BMC Bioinformatics*, 8, 1: S10, doi: 10.1186/1471-2105-8-S1-S10: 13 str.
- Diwan N., Fluhr R., Eshed Y., Zamir D., Tanksley S. D. 1999. Mapping of Ve in tomato: a gene conferring resistance to the broad-spectrum pathogen, *Verticillium dahliae* race 1. *Theoretical and Applied Genetics*, 98: 315-319

- Dodds P. N., Rathjen J. P. 2010. Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics*, 11, 8: 539-548
- Doehlemann G., Requena N., Schaefer P., Brunner F., O'Connell R., Parker J. E. 2014. Reprogramming of plant cells by filamentous plant-colonizing microbes. *New Phytologist*, 204, 4: 803-814
- Duan H., Schuler M. A. 2005. Differential expression and evolution of the *Arabidopsis* CYP86A subfamily. *Plant Physiology*, 137, 3: 1067-1081
- EFSA Panel on Plant Health. 2014. Scientific opinion on the pest categorisation of *Verticillium albo-atrum* sensu stricto Reinke and Berthold, *V. alfalfae* Inderb., HW Platt, RM Bostock, RM Davis & KV Subbarao, sp. nov., and *V. nonalfalfa* Inderb., HW Platt, RM Bostock, RM Davis & KV Subbarao, sp. nov. EFSA Journal, 12: 3927, doi: 10.2903/j.efsa.20143927: 40 str.
- EPPO Standard PM 7/078(1): *Verticillium albo-atrum* and *V. dahliae* on hop. 2007. Pariz, European and Mediterranean Plant Protection Organization: 8 str.  
<https://gd.eppo.int/taxon/VERTAH/documents> (14. okt. 2016)
- Fich E. A., Segerson N. A., Rose J. K. C. 2016. The plant polyester cutin: biosynthesis, structure, and biological roles. *Annual Review of Plant Biology*, 67, 1: 207-233
- Final community herbal monograph on *Humulus lupulus* L., Flos. 2014. London, European Medicines Agency, Committee on herbal medicinal products (HMPC): 7 str.  
[http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Herbal\\_-\\_Community\\_herbal\\_monograph/2014/08/WC500170937.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Herbal_-_Community_herbal_monograph/2014/08/WC500170937.pdf) (21. okt. 2016)
- Fleige S., Pfaffl M. W. 2006. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Molecular Aspects of Medicine*, 27: 126-139
- Floerl S., Druebert C., Majcherczyk A., Karlovsky P., Kues U., Polle A. 2008. Defence reactions in the apoplastic proteome of oilseed rape (*Brassica napus* var. *napus*) attenuate *Verticillium longisporum* growth but not disease symptoms. *BMC Plant Biology*, 8, 1: 129, doi: 10.1186/1471-2229-8-129: 15 str.
- Floerl S., Majcherczyk A., Possienke M., Feussner K., Tappe H., Gatz C., Feussner I., Kuees U., Polle A. 2012. *Verticillium longisporum* infection affects the leaf apoplastic proteome, metabolome, and cell wall properties in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One*, 7, 2: e31435, doi: 10.1371/journal.pone.0031435: 14 str.
- Fradin E. F., Thomma B. P. H. J. 2006. Physiology and molecular aspects of *Verticillium* wilt diseases caused by *V. dahliae* and *V. albo-atrum*. *Molecular Plant Pathology*, 7, 2: 71-86
- Fradin E. F., Zhang Z., Juarez Ayala J. C., Castroverde C. D. M., Nazar R. N., Robb J., Liu C. M., Thomma B. P. H. J. 2009. Genetic dissection of *Verticillium* wilt resistance mediated by tomato Ve1. *Plant Physiology*, 150, 1: 320-332
- Fradin E. F., Abd-El-Haliem A., Masini L., van den Berg G. C. M., Joosten M. H. A. J., Thomma B. P. H. J. 2011. Interfamily transfer of tomato Ve1 mediates *Verticillium* resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 156: 2255-2265

- Furnham N., Garavelli J. S., Apweiler R., Thornton J. M. 2009. Missing in action: enzyme functional annotations in biological databases. *Nature Chemical Biology*, 5, 8: 521-525
- Gallego Romero I., Pai A. A., Tung J., Gilad Y. 2014. RNA-Seq: impact of RNA degradation on transcript quantification. *BMC Biology*, 12: 42, doi: 10.1186/1741-7007-12-42: 13 str.
- Garcia-Olmedo F., Molina A., Segura A., Moreno M. 1995. The defensive role of nonspecific lipid-transfer proteins in plants. *Trends in Microbiology* 3, 2: 72-74
- Garg H., Li H., Sivasithamparam K., Barbetti M. J. 2013. Differentially expressed proteins and associated histological and disease progression changes in cotyledon tissue of a resistant and susceptible genotype of *Brassica napus* infected with *Sclerotinia sclerotiorum*. *PloS One*, 8, 6: e65205, doi: 10.1371/journal.pone.0065205: 14 str.
- Gayoso C., Pomar F., Novo-Uzal E., Merino F., Martínez de Ilárduya O. 2010. "The Ve-mediated resistance response of the tomato to *Verticillium dahliae* involves H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, peroxidase and lignins and drives pal gene expression. *BMC Plant Biology*, 10: 232, doi: 10.1186/1471-2229-10-232: 19 str.
- Gharbi Y., Alkher H., Triki M. A., Barkallah M., Emna B., Trabelsi R., Fendri I., Gdoura R., Daayf F. 2015. Comparative expression of genes controlling cell wall-degrading enzymes in *Verticillium dahliae* isolates from olive, potato and sunflower. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 91: 56-65
- Gongora-Castillo E., Buell C. R. 2013. Bioinformatics challenges in de novo transcriptome assembly using short read sequences in the absence of a reference genome sequence. *Natural Product Reports*, 30, 4: 490-500
- Goodwin S., McPherson J. D., McCombie W. R. 2016. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics*, 17, 6: 333-351
- Gottwald S., Samans B., Lueck S., Friedt W. 2012. Jasmonate and ethylene dependent defence gene expression and suppression of fungal virulence factors: two essential mechanisms of *Fusarium* head blight resistance in wheat? *BMC Genomics*, 13: 369, doi: 10.1186/1471-2164-13-369: 22 str.
- Grabherr M. G., Haas B. J., Yassour M., Levin J. Z., Thompson D. A., Amit I., Adiconis X., Fan L., Raychowdhury R., Zeng Q., Chen Z., Mauceli E., Hacohen N., Gnirke A., Rhind N., di Palma F., Birren B. W., Nusbaum C., Lindblad-Toh K., Friedman N., Regev A. 2011. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature Biotechnology*, 29, 7: 644-652
- Grabowska-Joachimiak A., Sliwińska E., Pigula M., Skomra U., Joachimiak A. J. 2011. Genome size in *Humulus lupulus* L. and *H. japonicus* Siebold and Zucc. (*Cannabaceae*). *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 75, 3: 207-214
- Harris R. V. 1927. A wilt disease of hops. Report of East Malling Research Station for 1925, Suppl: 92-93
- Hayes R. J., McHale L. K., Vallad G. E., Truco M. J., Michelmore R. W., Klosterman S. J., Maruthachalam K., Subbarao K. V. 2011. The inheritance of resistance to *Verticillium*

- wilt caused by race 1 isolates of *Verticillium dahliae* in the lettuce cultivar La Brillante. Theoretical and Applied Genetics, 123, 4: 509-517
- Hilaire E., Young S. A., Willard L. H., McGee J. D., Sweat T., Chittoor J. M., Guikema J. A., Leach J. E. 2001. Vascular defense responses in rice: peroxidase accumulation in xylem parenchyma cells and xylem wall thickening. Molecular Plant-Microbe Interactions, 14, 12: 1411-1419
- Hong J. K., Choi H. W., Hwang I. S., Kim D. S., Kim N. H., Choi D. S., Kim Y. J., Hwang B. K. 2008. Function of a novel GDSL-type pepper lipase gene, CaGLIP1, in disease susceptibility and abiotic stress tolerance. Planta, 227, 3: 539-558
- HopBase: a unified genomic database for hop (*Humulus*). 2015. Oregon, Oregon State University.  
<http://hopbase.org/> (10. sep. 2016)
- Hutson R. A., Smith I. M. 1983. The response of tomato seedling roots to infection by *Verticillium albo-atrum* or *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Annals of Applied Biology, 102, 1: 89-97
- IHGC Country Reports - IHGC Meeting in Germany. 2016. International Hop Growers' Convention, IHGC, Freising, Nemčija, 29. julij 2016.  
<http://www.hmelj-giz.si/ihgc/activ/jul16.htm>. (20. okt. 2016)
- Imbeaud S., Graudens E., Boulanger V., Barlet X., Zaborski P., Eveno E., Mueller O., Schroeder A., Auffray C. 2005. Towards standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces. Nucleic Acids Research, 33, 6: e56, doi: 10.1093/nar/gni054: 12 str.
- Inderbitzin P., Bostock R. M., Davis R. M., Usami T., Platt H. W., Subbarao K. V. 2011. Phylogenetics and taxonomy of the fungal vascular wilt pathogen *Verticillium*, with the descriptions of five new species. PloS One, 6, 12: e28341, doi: 10.1371/journal.pone.0028341: 22 str.
- Isaac I., Keyworth W. G. 1948. *Verticillium* wilt of the hop (*Humulus lupulus*). Annals of Applied Biology, 35, 2: 243-249
- ITIS – Integrated Taxonomic Information System. Reston, Virginia, ITIS.  
<https://www.itis.gov/> (20. okt. 2016)
- Iven T., Koenig S., Singh S., Braus-Stromeyer S. A., Bischoff M., Tietze L. F., Braus G. H., Lipka V., Feussner I., Droege-Laser W. 2012. Transcriptional activation and production of tryptophan-derived secondary metabolites in *Arabidopsis* roots contributes to the defense against the fungal vascular pathogen *Verticillium longisporum*. Molecular Plant, 5, 6: 1389-1402
- Jakše J., Čerenak A., Radišek S., Šatović Z., Luthar Z., Javornik B. 2013. Identification of quantitative trait loci for resistance to *Verticillium* wilt and yield parameters in hop (*Humulus lupulus* L.). Theoretical and Applied Genetics, 126, 6: 1431-1443
- Jashni M. K., Mehrabi R., Collemare J., Mesarich C. H., de Wit P. J. G. M. 2015. The battle in the apoplast: further insights into the roles of proteases and their inhibitors in

- plant-pathogen interactions. *Frontiers in Plant Science*, 6: 584, doi: 10.3389/fpls.2015.00584: 7 str.
- Jiang J., Fan L. W., Wu W. H. 2005. Evidences for involvement of endogenous cAMP in *Arabidopsis* defense responses to *Verticillium* toxins. *Cell Research*, 15, 8: 585-592
- Jiang F., Zhao J., Zhou L., Guo W. Z., Zhang T. Z. 2009. Molecular mapping of *Verticillium* wilt resistance QTL clustered on chromosomes D7 and D9 in upland cotton. *Science in China Series C: Life Sciences*, 52, 9: 872-884
- Johansson A., Staal J., Dixellius C. 2006. Early responses in the *Arabidopsis-Verticillium longisporum* pathosystem are dependent on NDR1, JA- and ET-associated signals via cytosolic NPR1 and RFO1. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19: 958-969
- Jones J. D. G., Dangl J. L. 2006. The plant immune system. *Nature*, 444: 323-329
- Jones W. J. 2010. High-throughput sequencing and metagenomics. *Estuaries and Coasts*, 33, 4: 944-952
- Jung H. W., Kim K. D., Hwang B. K. 2005. Identification of pathogen-responsive regions in the promoter of a pepper lipid transfer protein gene (*CALTPI*) and the enhanced resistance of the *CALTPI* transgenic *Arabidopsis* against pathogen and environmental stresses. *Planta*, 221, 3: 361-373
- Kangasjaervi S., Neukermans J., Li S., Aro E. M., Noctor G. 2012. Photosynthesis, photorespiration, and light signalling in defence responses. *Journal of Experimental Botany*, 63, 4: 1619-1636
- Katalog sort hmelja v Sloveniji. 2012. Žalec, Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije: 12 str.  
<http://www.ihps.si/katalogi-sort-hmelja> (29. dec. 2016)
- Kawchuk L. M., Hachey J., Lynch D. R., Kulcsar F., van Rooijen G., Waterer D. R., Robertson A., Kokko E., Byers R., Howard R. J., Fischer R., Pruefer D. 2001. Tomato Ve disease resistance genes encode cell surface-like receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98, 11: 6511-6515
- Keyworth W. G. 1953. *Verticillium* wilt of the hop. *Annals of Applied Biology*, 40, 2: 344-361
- Kim H. G., Kwon S. J., Jang Y. J., Chung J. H., Nam M. H., Park O. K. 2014. GDSL lipase 1 regulates ethylene signaling and ethylene-associated systemic immunity in *Arabidopsis*. *FEBS Letters*, 588, 9: 1652-1658
- Kirkwood J. S., Legette L. L., Miranda C. L., Jiang Y., Stevens J. F. 2013. A metabolomics-driven elucidation of the anti-obesity mechanisms of xanthohumol. *The Journal of Biological Chemistry*, 288, 26: 19000-19013
- Klimes A., Dobinson K. F., Thomma B. P. H. J., Klosterman S. J. 2015. Genomics spurs rapid advances in our understanding of the biology of vascular wilt pathogens in the genus *Verticillium*. *Annual Review of Phytopathology*, 53: 9.1-9.18

- Klosterman S. J., Anchieta A., Garcia-Pedrajas M. D., Maruthachalam K., Hayes R. J., Subbarao K. V. 2011. SSH reveals a linkage between a senescence-associated protease and *Verticillium* wilt symptom development in lettuce (*Lactuca sativa*). *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 76: 48-58
- Koenker R. 2016. Quantreg: quantile regression.  
<https://cran.r-project.org/web/packages/quantreg/> (10. sep. 2016)
- Komarova T. V., Sheshukova E. V., Dorokhov Y. L. 2015. Cell wall methanol as a signal in plant immunity. *Frontiers in Plant Science*, 5: 101, doi: 10.3389/fpls.2014.00101: 4 str.
- Koornneef A., Pieterse C. M. J. 2008. Cross talk in defense signaling. *Plant Physiology*, 146, 3: 839-844
- Koua D., Cerutti L., Falquet L., Sigrist C. J. A., Theiler G., Hulo N., Dunand C. 2009. PeroxiBase: A database with new tools for peroxidase family classification. *Nucleic Acids Research*, 37: D261–D266, doi: 10.1093/nar/gkn680: 6 str.
- Kuczynski J., Lauber C. L., Walters W. A., Parfrey L. W., Clemente J. C., Gevers D., Knight R. 2012. Experimental and analytical tools for studying the human microbiome. *Nature Reviews Genetics*, 13, 1: 47-58
- Kwon S. J., Jin H. C., Lee S., Nam M. H., Chung J. H., Kwon S. I., Ryu C. M., Park O. K. 2009. GDSL lipase-like 1 regulates systemic resistance associated with ethylene signaling in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 58, 2: 235-245
- Laluk K., Mengiste T. 2011. The *Arabidopsis* extracellular unusual serine protease inhibitor functions in resistance to necrotrophic fungi and insect herbivory. *The Plant Journal*, 68, 3: 480-494
- Lascombe M. B., Bakan B., Buhot N., Marion D., Blein J. P., Larue V., Lamb C., Prange T. 2008. The structure of ‘defective in induced resistance’ protein of *Arabidopsis thaliana*, DIR1, reveals a new type of lipid transfer protein. *Protein Science*, 17, 9: 1522-1530
- Law C. W., Chen Y., Shi W., Smyth G. K. 2014. Voom: precision weights unlock linear model analysis tools for RNA-seq read counts. *Genome Biology*, 15, 2: R29, doi: 10.1186/gb-2014-15-2-r29: 17 str.
- Lee D. S., Kim B. K., Kwon S. J., Jin H. C., Park O. K. 2009. *Arabidopsis* GDSL lipase 2 plays a role in pathogen defense via negative regulation of auxin signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 379, 4: 1038-1042
- Lee K. A., Cho T. J. 2003. Characterization of a salicylic acid-and pathogen-induced lipase-like gene in chinese cabbage. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 36, 5: 433-441
- Li A. L., Meng C. S., Zhou R. H., Ma Z. Y., Jia J. Z. 2006. Assessment of lipid transfer protein (LTP1) gene in wheat powdery mildew resistance. *Agricultural Sciences in China*, 5, 4: 241-249
- Li J., Zeng L., Xie J., Yue Z., Deng H., Ma X., Zheng C., Wu X., Luo J., Liu M. 2015. Inhibition of osteoclastogenesis and bone resorption *in vitro* and *in vivo* by a

- prenylflavonoid xanthohumol from hops. *Scientific Reports*, 5: 17605, doi: 10.1038/srep17605: 14 str.
- Liu F., Zhang X., Lu C., Zeng X., Li Y., Fu D., Wu G. 2015. Non-specific lipid transfer proteins in plants: presenting new advances and an integrated functional analysis. *Journal of Experimental Botany*, 66, 19: 5663-5681
- Livak K. J., Schmittgen T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. *Methods*, 25, 4: 402-408
- Luo X., Xie C., Dong J., Yang X., Sui A. 2014. Interactions between *Verticillium dahliae* and its host: vegetative growth, pathogenicity, plant immunity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98: 6921-6932
- Lytle B. L., Song J., de la Cruz N. B., Peterson F. C., Johnson K. A., Bingman C. A., Phillips G. N., Volkman B. F. 2009. Structures of two *Arabidopsis thaliana* major latex proteins represent novel helix-grip folds. *Proteins*, 76, 1: 237-243
- MacGregor D. R., Deak K. I., Ingram P. A., Malamy J. E. 2008. Root system architecture in *Arabidopsis* grown in culture is regulated by sucrose uptake in the aerial tissues. *The Plant Cell Online*, 20, 10: 2643-2660
- Maldonado A. M., Doerner P., Dixon R. A., Lamb C. J., Cameron R. K. 2002. A putative lipid transfer protein involved in systemic resistance signalling in *Arabidopsis*. *Nature*, 419: 399-403
- Mandelc S., Timperman I., Radišek S., Devreese B., Samyn B., Javornik B. 2013. Comparative proteomic profiling in compatible and incompatible interactions between hop roots and *Verticillium albo-atrum*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 68: 23-31
- Marton K., Radišek S. 2015. Taksonomoija rodu *Verticillium* in določanje fitopatogene gline *Verticillium albo-atrum*. Hmeljarski bilten, 22: 15-25
- McGettigan P. A. 2013. Transcriptomics in the RNA-Seq era. *Current Opinion in Chemical Biology*, 17, 1: 4-11
- Mitsuhara I., Iwai T., Seo S., Yanagawa Y., Kawahigasi H., Hirose S., Ohkawa Y., Ohashi Y. 2008. Characteristic expression of twelve rice PR1 family genes in response to pathogen infection, wounding, and defense-related signal compounds (121/180). *Molecular Genetics and Genomics*, 279, 4: 415-427
- Mitton F. M., Pinedo M. L., de la Canal L. 2009. Phloem sap of tomato plants contains a DIR1 putative ortholog. *Journal of Plant Physiology*, 166, 5: 543-547
- Molina A., Garcia-Olmedo F. 1997. Enhanced tolerance to bacterial pathogens caused by the transgenic expression of barley lipid transfer protein LTP2. *The Plant Journal*, 12, 3: 669-675
- Mortazavi A., Williams B. A., McCue K., Schaeffer L., Wold B. 2008. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nature Methods*, 5, 7: 621-628
- Mueller O., Lightfoot S., Schroeder A. 2004. RNA integrity number (RIN) – standardization of RNA quality control. Agilent Technologies, Application Note. Santa

- Clara, Kalifornija, Agilent Technologies: 8 str.  
<https://www.agilent.com/cs/library/applications/5989-1165EN.pdf> (18. sep. 2016)
- Mueller M., Munne-Bosch S. 2015. Ethylene response factors: a key regulatory hub in hormone and stress signaling. *Plant Physiology*, 169, 1: 32-41
- Mutz K. O., Heilkenbrinker A., Loenne M., Walter J. G., Stahl F. 2013. Transcriptome analysis using next-generation sequencing. *Current Opinion in Biotechnology*, 24, 1: 22-30.
- Natsume S., Takagi H., Shiraishi A., Murata J., Toyonaga H., Patzak J., Takagi M., Yaegashi H., Uemura A., Mitsuoka C., Yoshida K., Krofta K., Satake H., Terauchi R., Ono E. 2014. The draft genome of hop (*Humulus lupulus*), an essence for brewing. *Plant and Cell Physiology*, 56, 3: 428-441
- NCBI Protein Database. Bethesda, Maryland, National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein> (10. jun. 2015)
- Neve R.A. 1991. Hops. London, Chapman and Hall: 266 str.
- Niderman T., Genetet I., Bruyere T., Gees R., Stintzi A., Legrand M., Fritig B., Mosinger E. 1995. Pathogenesis-related PR-1 proteins are antifungal. Isolation and characterization of three 14-kilodalton proteins of tomato and of a basic PR-1 of tobacco with inhibitory activity against *Phytophthora infestans*. *Plant Physiology*, 108, 1: 17-27
- Odredba o ukrepih za preprečevanje širjenja in zatiranje hmeljeve uvelosti, ki jo povzročata glivi *Verticillium alboatrum* Reinke at Berthold in *Verticillium dahliae* Klebahn. 2001. Ur. l. RS, št. 65/01
- Oshlack A., Robinson M. D., Young M. D. 2010. From RNA-Seq reads to differential expression results. *Genome Biology*, 11, 12: 220, doi: 10.1186/gb-2010-11-12-220: 10 str.
- Ozsolak F., Milos P. M. 2011. RNA sequencing: advances, challenges and opportunities. *Nature Review Genetics*, 12, 2: 87-98
- Pantelides I. A., Tjamos S. E., Paplomatas E. J. 2010. Ethylene perception via ETR1 is required in *Arabidopsis* infection by *Verticillium dahliae*. *Molecular Plant Pathology*, 11, 2: 191-202
- Pautot V., Holzer F. M., Walling L. L. 1991. Differential expression of tomato proteinase inhibitor I and II genes during bacterial pathogen invasion and wounding. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 4: 284-292
- Pegg G. F., Brady B. L. 2002. *Verticillium wilts*. Oxon, CABI Publishing: 552 str.
- Pinot F., Beisson F. 2011. Cytochrome P450 metabolizing fatty acids in plants: characterization and physiological roles. *FEBS Journal*, 278, 2: 195-205

Pravilnik o prenehanju veljavnosti Pravilnika o ukrepih za preprečevanje širjenja in zatiranje hmeljeve uvelosti, ki jo povzročata glivi *Verticillium alboatrum* Reinke et Berthold in *Verticillium dahliae* Klebahn. 2014. Ur. l. RS, št. 35/14

Pravilnik o trženju razmnoževalnega materiala in sadik hmelja – Priloga 3: Škodljivi organizmi hmelja. 2013. Ur. l. RS, št. 45/13

Pritchard L., Birch P. R. J. 2014. The zigzag model of plant–microbe interactions: is it time to move on? *Molecular Plant Pathology*, 15, 9: 865-870

Radišek S., Jakše J., Simončič A., Javornik B. 2003. Characterization of *Verticillium albo-atrum* field isolates using pathogenicity data and AFLP analysis. *Plant Disease*, 87, 6: 633-638

Radišek S. 2004. Molekularna variabilnost pri glivah (*Verticillium albo-atrum* Reinke et Berthold in *Verticillium dahliae* Klebahn) in razvoj patotipsko specifičnih markerjev. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 107 str.

Radišek S. 2006. Hmeljeva uvelost v slovenskih hmeljiščih. Žalec, Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije: 22 str.

Radišek S., Jakše J., Javornik B. 2006. Genetic variability and virulence among *Verticillium albo-atrum* isolates from hop. *European Journal of Plant Pathology*, 116, 4: 301-314

Radišek S., Leskošek G., Rak-Cizej M. 2008. Hmeljarstvo in pojav novih bolezni. *Hmeljar*, 70, 1: 34-37

Raiola A., Lionetti V., Elmaghriby I., Immerzeel P., Mellerowicz E. J., Salvi G., Cervone F., Bellincampi D. 2011. Pectin methylesterase is induced in *Arabidopsis* upon infection and is necessary for a successful colonization by necrotrophic pathogens. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 24, 4: 432-440

Ralhan A., Schottle S., Thurow C., Iven T., Feussner I., Polle A., Gatz C. 2012. The vascular pathogen *Verticillium longisporum* requires a jasmonic acid-independent COI1 function in roots to elicit disease symptoms in *Arabidopsis* shoots. *Plant Physiology*, 159, 3: 1192-1203

Reuveni R., Ferreira J. F. 1985. The relationship between peroxidase activity and the resistance of tomatoes (*Lycopersicum esculentum*) to *Verticillium dahliae*. *Journal of Phytopathology*, 112, 3: 193-197

Robb J., Lee B., Nazar R. N. 2007. Gene suppression in a tolerant tomato-vascular pathogen interaction. *Planta*, 226, 2, 299-309

Robb J., Shittu H., Soman K. V., Kurosky A., Nazar. R. N. 2012. Arsenal of elevated defense proteins fails to protect tomato against *Verticillium dahliae*. *Planta*, 236, 2: 623-633

Robinson M. D., Oshlack A. 2010. A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-Seq data. *Genome Biology*, 11, 3: R25, doi: 10.1186/gb-2010-11-3-r25: 10 str.

- Robinson M. D., McCarthy D. J., Smyth G. K. 2010. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, 26, 1: 139-140
- Rojas C. M., Senthil-Kumar M., Tzin V., Mysore K. S. 2014. Regulation of primary plant metabolism during plant-pathogen interactions and its contribution to plant defense. *Frontiers of Plant Science*, 5: 17, doi: 10.3389/fpls.2014.00017: 12 str.
- Rygulla W., Snowdon R. J., Friedt W., Happstadius I., Cheung W. Y., Chen D. 2008. Identification of quantitative trait loci for resistance against *Verticillium longisporum* in oilseed rape (*Brassica napus*). *Phytopathology*, 98, 2: 215-221
- Sanavia T., Finotello F., di Camillo B. 2015. FunPat: function-based pattern analysis on RNA-Seq time series data. *BMC Genomics*, 16: S2, doi: 10.1186/1471-2164-16-S6-S2: 13 str.
- Sarowar S., Kim Y. J., Kim K. D., Hwang B. K., Ok S. H., Shin J. S. 2009. Overexpression Of lipid transfer protein (LTP) genes enhances resistance to plant pathogens and LTP functions in long-distance systemic signaling in tobacco. *Plant Cell Reports*, 28, 3: 419-427
- Schaible P., Cannon O. S., Waddoups V. 1951. Inheritance of resistance to *Verticillium* wilt in a tomato cross. *Phytopathology*, 41: 986-990
- Schroeder A., Mueller O., Stocker S., Salowsky R., Leiber M., Gassmann M., Lightfoot S., Menzel W., Granzow M., Ragg T. 2006. The RIN: an rna integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Molecular Biology*, 7: 3, doi: 10.1186/1471-2199-7-3: 14 str.
- Seefelder S., Seigner E., Niedermeier E., Radišek S., Javornik B. 2009. Genotyping of *Verticillium* pathotypes in the Hallertau: Basic findings to assess the risk of *Verticillium* infections. V: CICH – IHB - IHGC International Hop Growers' Convention. Seigner E. (ur.). Leon, Španija: 67-69
- Sels J., Mathys J., de Coninck B. M. A., Cammue B. P. A., de Bolle M. F. C. 2008. Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46, 11: 941-950
- Serrano M., Coluccia F., Torres M., L'Haridon F., Metraux J. P. 2014. The cuticle and plant defense to pathogens. *Frontiers in Plant Science*, 5, 274, doi: 10.3389/fpls.2014.00274: 8 str.
- Sewell G. W. F., Wilson J. F. 1964. Occurrence and dispersal of *Verticillium* conidia in xylem sap of the hop (*Humulus lupulus* L.). *Nature*, 204: 901
- Sewell G. W. F., Wilson J. F. 1966. *Verticillium* wilt of the hop: the survival of *V. albo-atrum* in soil. *Annals of Applied Biology* 58: 241-249
- Sewell G. W. F., Wilson J. F. 1984. The nature and distribution of *Verticillium albo-atrum* strains highly pathogenic to the hop. *Plant Pathology*, 33, 1: 39-51

- Shannon P., Markiel A., Ozier O., Baliga N. S., Wang J. T., Ramage D., Amin N., Schwikowski B., Ideker T. 2003. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Research*, 13, 11: 2498-2504
- Shinshuwase (60042). 2007. USDA Hop Cultivar Descriptions. Corvallis, Oregon, USDA ARS.  
<https://www.ars.usda.gov/ARSUserFiles/2450/hopcultivars/60042.html>. (25. okt. 2016)
- Sidstedt M., Jansson L., Nilsson E., Noppa L., Forsman M., Radstroem P., Hedman J. 2015. Humic substances cause fluorescence inhibition in real-time polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry*, 487: 30-37
- Smyth G. 2005. Limma: linear models for microarray data. V: *Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor*. Gentleman R., Carey V., Dudoit S., Irizarry R., Huber W. New York, Springer: 397-420
- Song Y., Zhang Z., Seidl M. F., Majer A., Jakse J., Javornik B., Thomma B. P. H. J. 2016. Broad taxonomic characterization of *Verticillium* wilt resistance genes reveals an ancient origin of the tomato Ve1 immune receptor. *Molecular Plant Pathology*, doi: 10.1111/mpp.12390: 15 str.
- Spectrophotometry. Handbook. 2012. Chicago, Illinois, GE Healthcare Life Sciences: 32 str.  
[http://www.gelifesciences.com/file\\_source/GELS/Service%20and%20Support/Documents%20and%20Downloads/Handbooks/pdfs/Spectrophotometry.pdf](http://www.gelifesciences.com/file_source/GELS/Service%20and%20Support/Documents%20and%20Downloads/Handbooks/pdfs/Spectrophotometry.pdf) (15. okt. 2016)
- Spoel S. H., Dong X. 2012. How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nature Reviews Immunology*, 12: 89-100
- Stergiopoulos I., de Wit P. J. G. M. 2009. Fungal effector proteins. *Annual Review of Phytopathology*, 47: 233-263
- Sun Q., Jiang H., Zhu X., Wang W., He X., Shi Y., Yuan Y., Du X., Cai Y. 2013. Analysis of sea-island cotton and upland cotton in response to *Verticillium dahliae* infection by RNA sequencing. *BMC Genomics*, 14, 1: 852, doi: 10.1186/1471-2164-14-852: 13 str.
- Štajner, N., Šatović Z., Čerenak A., Javornik B. 2008. Genetic structure and differentiation in hop (*Humulus lupulus* L.) as inferred from microsatellites. *Euphytica*, 161: 301-311
- Štajner N, Cregeen S., Javornik B. 2013. Evaluation of reference genes for RT-qPCR expression studies in hop (*Humulus lupulus* l.) during infection with vascular pathogen *Verticillium albo-atrum*. *PLoS One*, 8, 7: e68228, doi: 10.1371/journal.pone.0068228: 13 str.
- Šuštar-Vozlič J., Javornik B. 1999. Genetic relationships in cultivars of hop, *Humulus Lupulus* L., determined by RAPD analysis. *Plant Breeding*, 118, 2: 175-181
- Šuštar-Vozlič J., Čerenak A., Ferant N. 2002. Žlahtnjenje hmelja in hmeljni kultivarji. V: *Priročnik za hmeljarje*. Majer D. (ur.). Žalec, Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije: 31-50

- Tai H. H., Goyer C., Platt H. W. B., de Koeyer D., Murphy A., Uribe P., Halterman D. 2013. Decreased defense gene expression in tolerance versus resistance to *Verticillium dahliae* in potato. *Functional and Integrative Genomics*, 13: 367-378
- TAIR – The *Arabidopsis* Information Resource. Redwood City, Kalifornija, Phoenix Bioinformatics.  
<https://www.arabidopsis.org/> (16. sep. 2016)
- Talboys P. W. 1958a. Some mechanisms contributing to *Verticillium*-resistance in the hop root. *Transactions of the British Mycological Society*, 41, 2: 227-241
- Talboys P. W. 1958b. Association of tylosis and hyperplasia of the xylem with vascular invasion of the hop by *Verticillium albo-atrum*. *Transactions of the British Mycological Society*, 41, 2: 249-260
- Talboys P. W. 1972. Resistance to vascular wilt fungi. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, 181: 319-332
- Thatcher L. F., Manners J. M., Kazan K. 2009. *Fusarium oxysporum* hijacks COI1-mediated jasmonate signaling to promote disease development in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 58, 6: 927-939
- The R Project for Statistical Computing. Dunaj, The R Foundation.  
<https://www.r-project.org/> (4. nov. 2016)
- Thomma, B. P. H. J., Nurnberger T., Joosten M. H. A. J. 2011. Of PAMPs and effectors: the blurred PTI-ETI dichotomy. *The Plant Cell*, 23: 4-15
- Tischner R., Koltermann M., Hesse H., Plath M. 2010. Early responses of *Arabidopsis thaliana* to infection by *Verticillium longisporum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 74: 419-427
- Toer M., Lotze M. T., Holton N. 2009. Receptor-mediated signalling in plants: molecular patterns and programmes. *Journal of Experimental Botany*, 60, 13: 3645-3654
- Trapnell C., Hendrickson D. G., Sauvageau M., Goff L., Rinn J. L., Pachter L. 2012. Differential analysis of gene regulation at transcript resolution with RNA-Seq. *Nature Biotechnology*, 31, 1: 46-53
- Untergasser A., Cutcutache I., Koressaar T., Ye J., Faircloth B. C., Remm M., Rozen S. G. 2012. Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, 40, 15: e115, doi: 10.1093/nar/gks596: 12 str.
- van Cleemput M., Cattoor K., de Bosscher K., Haegeman G., de Keukeleire D., Heyerick A. 2009. Hop (*Humulus lupulus*)-derived bitter acids as multipotent bioactive compounds. *Journal of Natural Products*, 72, 6: 1220-1230
- van Dijk E. L., Auger H., Jaszczyzyn Y., Thermes C. 2014. Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends in Genetics*, 30, 9: 418-426
- van Esse H. P., Fradin E. F., de Groot P. J., de Wit P. J. G. M., Thomma B. P. H. J. 2009. Tomato transcriptional responses to a foliar and a vascular fungal pathogen are distinct. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22, 3: 245-258

- van Loon L. C. van Strien E. A. 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 55, 2: 85-97
- van Loon L. C., Rep M., Pieterse C. M. J. 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology*, 44: 135-162
- Vogel C., Marcotte E. M. 2012. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nature Reviews Genetics*, 13: 227-232
- Volokita M., Rosilio-Brami T., Rivkin N., Zik M. 2011. Combining comparative sequence and genomic data to ascertain phylogenetic relationships and explore the evolution of the large GDSL-lipase family in land plants. *Molecular Biology and Evolution*, 28, 1: 551-565
- von Schubert G. H. 1887. *Naturgeschichte des Pflanzenreichs nach dem Linneschen System*. Osnabrück, Nemčija, Kraemer und Hansen: 77 str.
- Wang H. M., Lin Z. X., Zhang X. L., Chen W., Guo X. P., Nie Y. C., Li Y. H. 2008. Mapping and quantitative trait loci analysis of *Verticillium* wilt resistance genes in cotton. *Journal of Integrative Plant Biology*, 50, 2: 174-182
- Wang Y., Yang L., Chen X., Ye T., Zhong B., Liu R., Wu Y., Chan Z. 2015. Major latex protein-like protein 43 (MLP43) functions as a positive regulator during abscisic acid responses and confers drought tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 67, 1: 421-434
- Wang Y., Hayatsu M., Fujii T. 2012. Extraction of bacterial RNA From soil: challenges and solutions. *Microbes and Environments*, 27, 2: 111-121
- Wang Z., Gerstein M., Snyder M. 2009. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetic*, 10, 1: 57-63
- Westermann A. J., Gorski S. A. Vogel J. 2012. Dual RNA-seq of pathogen and host. *Nature Reviews Microbiology*, 10, 9: 618-630
- Wu S., Shan L., He P. 2014. Microbial signature-triggered plant defense responses and early signaling mechanisms. *Plant Science*, 228: 118-126
- Xiao F., Goodwin S. M., Xiao Y., Sun Z., Baker D., Tang X., Jenks M. A., Zhou J. M. 2004. *Arabidopsis* CYP86A2 represses *Pseudomonas syringae* type III genes and is required for cuticle development. *The EMBO Journal*, 23, 14: 2903-2913
- Xu L., Zhu L., Tu L., Liu L., Yuan D., Jin L., Long L., Zhang X. 2011. Lignin metabolism has a central role in the resistance of cotton to the wilt fungus *Verticillium dahliae* as revealed by RNA-Seq-dependent transcriptional analysis and histochemistry. *Journal of Experimental Botany*, 62, 15: 5607-5621
- Yadeta K. A., Thomma B. P. H. J. 2013. The xylem as battleground for plant hosts and vascular wilt pathogens. *Frontiers in Plant Science*, 4: 97, doi: 10.3389/fpls.2013.00097: 12 str.

Yang C. L., Liang S., Wang H. Y., Han L. B., Wang F. X., Cheng H. Q., Wu X. M., Qu Z. L., Wu J. H., Xia G. X. 2015. Cotton major latex protein 28 functions as a positive regulator of the ethylene responsive factor 6 in defense against *Verticillium dahliae*." Molecular Plant, 8, 3: 399-411

## ZAHVALA

Delo je bilo financirano s strani Javne agencije za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije (štipendija za mladega raziskovalca 1000-13-0510 in raziskovalni program P4-0077).

V prvi vrsti se zahvaljujem mentorici prof. dr. Branki Javornik, ki mi je omogočila pripravo in izvedbo doktorskega dela. Hvala za vodstvo, vso pomoč in podporo ter zaupanje.

Zelo lepo se zahvaljujem tudi doc. dr. Sabini Berne, za izdatno pomoč pri analizi in interpretaciji eksperimentalnih rezultatov in pomemben prispevek h končni obliki doktorskega dela.

Zelo sem hvaležen vsem sodelavcem s Katedre za genetiko, tako za pomoč pri delu kot za izvrstno delovno vzdušje. Pri tem se posebej zahvaljujem prof. dr. Jerneju Jakšetu za pomoč in ideje pri bioinformatski analizi in doc. dr. Nataši Štajner za pomoč in ideje pri RT-qPCR.

Zahvaljujem se tudi dr. Sebastjanu Radišku z Inštituta za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije za izvedbo okuževanja rastlin in vse nasvete.

Posebna zahvala gre moji družini, ki mi je ves čas stala ob strani in me podpirala.

## PRILOGA A

### PARAMETRI FILTRIRANJA IN PORAVNAVE ODČITKOV V PROGRAMU CLC GENOMICS

Preglednica: Parametri, uporabljeni za filtriranje odčitkov v CLC Genomics

Ambiguous trim	Yes
Ambiguous limit	2
Quality trim	Yes
Quality limit	0.05
Use colorspace	No
Also search on reversed sequence	Yes
Save discarded sequences	Yes
Remove 5' terminal nucleotides	No
Minimum number of nucleotides in reads	20
Discard short reads	Yes
Remove 3' terminal nucleotides	No
Trim adapter list	TruSeq-adapters
Discard long reads	No

Preglednica: Parametri, uporabljeni za poravnavo odčitkov na sekvene hmeljnega genoma v CLC Genomics

Reference type	Genome annotated with genes and transcripts
Reference sequence	natsume.shinsuwase.v1.0.20141126
Gene track	natsume.shinsuwase.v1.0.20141126 (Gene)
mRNA track	natsume.shinsuwase.v1.0.20141126 (mRNA)
Mapping type	Also map to inter-genic regions
Mismatch cost	2
Insertion cost	3
Deletion cost	3
Length fraction	0.9
Similarity fraction	0.9
Global alignment	No
Strand specific	Both
Maximum number of hits for a read	10
Count paired reads as two	No

## PRILOGA B

### R FUNKCIJA ZA IZRAČUN RANGOV Z METODO MAQR

```
library(quantreg)
ma_rq_ranks <- function(lcpms) {
  lcpms$A <- 0.5 * (lcpms$control + lcpms$infected)
  lcpms$M <- lcpms$infected - lcpms$control
  lcpms$expressed_control <- lcpms$control != min(lcpms$control)
  lcpms$expressed_infected <- lcpms$infected != min(lcpms$infected)

  expressed <- lcpms[lcpms$expressed_control &
    lcpms$expressed_infected, c("A", "M")]
  expressed.rq <- rq(M~A, expressed, tau=-1)
  gc()
  expressed$ranks <- ranks(expressed.rq)[["ranks"]]
  rm(expressed.rq)
  gc()

  lcpms$ranks <- expressed[rownames(lcpms), "ranks"]
  ## non-expressed
  lcpms$ranks[ !lcpms$expressed_infected & !lcpms$expressed_control ] <- NaN
  ## unique- infected
  lcpms$ranks[ lcpms$expressed_infected & !lcpms$expressed_control ] <- Inf
  ## unique-control
  lcpms$ranks[ !lcpms$expressed_infected & lcpms$expressed_control ] <- -Inf

  return(lcpms$ranks)
}
```

## PRILOGA C

### STO NAJBOLJ DI GENOV PO METODI FUNPAT ZA VSAKO SKUPINO KULTIVAR-ORGAN

Preglednica: Sto najbolj DI genov po metodi FunPat za **odporni kultivar – nadzemni deli**

rang	HopBase ID	TAIR ID	TAIR opis
1	HL.SW.v1.0.G018389	AT3G15353	metallothionein 3
2	HL.SW.v1.0.G007127	AT5G33370	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein
3	HL.SW.v1.0.G018902	AT1G67090	ribulose bisphosphate carboxylase small chain 1A
4	HL.SW.v1.0.G013551	AT3G63170	Chalcone-flavanone isomerase family protein
5	HL.SW.v1.0.G004336	AT2G42690	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
6	HL.SW.v1.0.G025162	AT5G06860	polygalacturonase inhibiting protein 1
7	HL.SW.v1.0.G017076	AT1G24020	MLP-like protein 423
8	HL.SW.v1.0.G030386	AT5G45670	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein
9	HL.SW.v1.0.G009568	AT2G45970	cytochrome P450, family 86, subfamily A, polypeptide 8
10	HL.SW.v1.0.G036920	AT1G24020	MLP-like protein 423
11	HL.SW.v1.0.G015902	AT5G45950	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein
12	HL.SW.v1.0.G013555	AT5G13930	Chalcone and stilbene synthase family protein
13	HL.SW.v1.0.G006074	AT2G10940	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein
14	HL.SW.v1.0.G027204	AT1G29670	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein
15	HL.SW.v1.0.G008723	AT1G12090	extensin-like protein
16	HL.SW.v1.0.G006740	AT1G24020	MLP-like protein 423
17	HL.SW.v1.0.G026004	AT4G35160	O-methyltransferase family protein
18	HL.SW.v1.0.G021375	AT1G75040	pathogenesis-related gene 5
19	HL.SW.v1.0.G007128	AT5G33370	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein
20	HL.SW.v1.0.G018344	/	/
21	HL.SW.v1.0.G028917	AT5G41070	dsRNA-binding protein 5
22	HL.SW.v1.0.G009955	AT5G50400	purple acid phosphatase 27
23	HL.SW.v1.0.G032269	AT5G53390	O-acyltransferase (WSD1-like) family protein
24	HL.SW.v1.0.G020154	AT5G06860	polygalacturonase inhibiting protein 1
25	HL.SW.v1.0.G000278	AT5G43580	Serine protease inhibitor, potato inhibitor I-type family protein
26	HL.SW.v1.0.G005352	AT3G57270	beta-1,3-glucanase 1
27	HL.SW.v1.0.G034757	AT5G02540	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein
28	HL.SW.v1.0.G022760	AT3G04720	pathogenesis-related 4
29	HL.SW.v1.0.G046084	AT2G42840	protodermal factor 1
30	HL.SW.v1.0.G010555	AT2G27385	Pollen Ole e 1 allergen and extensin family protein
31	HL.SW.v1.0.G029786	AT1G33811	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein
32	HL.SW.v1.0.G004658	AT2G13810	AGD2-like defense response protein 1
33	HL.SW.v1.0.G024381	AT5G23940	HXXXD-type acyl-transferase family protein
34	HL.SW.v1.0.G007154	AT4G36250	aldehyde dehydrogenase 3F1
35	HL.SW.v1.0.G023951	AT5G43580	Serine protease inhibitor, potato inhibitor I-type family protein
36	HL.SW.v1.0.G021701	AT5G43580	Serine protease inhibitor, potato inhibitor I-type family protein
37	HL.SW.v1.0.G014330	AT2G04570	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein
38	HL.SW.v1.0.G015232	AT3G50980	dehydrin xero 1
39	HL.SW.v1.0.G046156	AT1G62500	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein
40	HL.SW.v1.0.G009717	AT1G11600	cytochrome P450, family 77, subfamily B, polypeptide 1
41	HL.SW.v1.0.G028737	AT5G25460	Protein of unknown function, DUF642
42	HL.SW.v1.0.G034459	AT4G14746	CONTAINS InterPro DOMAIN/s: EGF-like (InterPro:IPR006210)
43	HL.SW.v1.0.G030451	AT5G24080	Protein kinase superfamily protein
44	HL.SW.v1.0.G001647	AT5G24090	chitinase A
45	HL.SW.v1.0.G001624	AT5G20630	germin 3
46	HL.SW.v1.0.G044025	AT4G37050	PATATIN-like protein 4
47	HL.SW.v1.0.G024382	AT5G23940	HXXXD-type acyl-transferase family protein
48	HL.SW.v1.0.G004744	AT4G12420	Cupredoxin superfamily protein
49	HL.SW.v1.0.G001659	AT4G01470	tonoplast intrinsic protein 1;3
50	HL.SW.v1.0.G006060	/	/
51	HL.SW.v1.0.G042512	AT4G33720	CAP (Cysteine-rich secretory proteins, Antigen 5, and Pathogenesis-related 1 protein) superfamily protein
52	HL.SW.v1.0.G023476	AT5G23960	terpene synthase 21
53	HL.SW.v1.0.G018461	AT1G56600	galactinol synthase 2
54	HL.SW.v1.0.G043317	AT3G44250	cytochrome P450, family 71, subfamily B, polypeptide 38
55	HL.SW.v1.0.G018734	AT1G49430	long-chain acyl-CoA synthetase 2

(se nadaljuje)

(nadaljevanje preglednice)

rang	HopBase ID	TAIR ID	TAIR opis
56	HL.SW.v1.0.G036575	AT2G38540	lipid transfer protein 1
57	HL.SW.v1.0.G035683	AT4G33720	CAP (Cysteine-rich secretory proteins, Antigen 5, and Pathogenesis-related 1 protein) superfamily protein
58	HL.SW.v1.0.G029047	AT5G20230	blue-copper-binding protein
59	HL.SW.v1.0.G018725	AT1G14520	myo-inositol oxygenase 1
60	HL.SW.v1.0.G009761	AT5G45950	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein
61	HL.SW.v1.0.G038240	AT3G48460	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein
62	HL.SW.v1.0.G010381	AT4G18780	cellulose synthase family protein
63	HL.SW.v1.0.G041395	AT1G74670	Gibberellin-regulated family protein
64	HL.SW.v1.0.G020002	AT1G72610	germin-like protein 1
65	HL.SW.v1.0.G035819	AT3G09220	laccase 7
66	HL.SW.v1.0.G004743	AT2G45190	Plant-specific transcription factor YABBY family protein
67	HL.SW.v1.0.G042022	/	/
68	HL.SW.v1.0.G015614	AT4G24150	growth-regulating factor 8
69	HL.SW.v1.0.G014163	AT4G03210	xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 9
70	HL.SW.v1.0.G021683	AT4G21990	APS reductase 3
71	HL.SW.v1.0.G005480	AT5G04660	cytochrome P450, family 77, subfamily A, polypeptide 4
72	HL.SW.v1.0.G044322	AT5G03760	Nucleotide-diphospho-sugar transferases superfamily protein
73	HL.SW.v1.0.G039240	AT1G37130	nitrate reductase 2
74	HL.SW.v1.0.G007515	AT3G16920	chitinase-like protein 2
75	HL.SW.v1.0.G010340	AT1G47980	unknown protein
76	HL.SW.v1.0.G040008	AT5G03170	FASCICLIN-like arabinogalactan-protein 11
77	HL.SW.v1.0.G028802	AT3G27960	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein
78	HL.SW.v1.0.G042589	AT5G48930	hydroxycinnamoyl-CoA shikimate/quinate hydroxycinnamoyl transferase
79	HL.SW.v1.0.G006031	AT2G28630	3-ketoacyl-CoA synthase 12
80	HL.SW.v1.0.G036928	AT2G25150	HXXXD-type acyl-transferase family protein
81	HL.SW.v1.0.G018733	AT1G49430	long-chain acyl-CoA synthetase 2
82	HL.SW.v1.0.G030454	AT4G16260	Glycosyl hydrolase superfamily protein
83	HL.SW.v1.0.G011680	AT5G46690	beta HLH protein 1
84	HL.SW.v1.0.G019638	AT3G02040	senescence-related gene 3
85	HL.SW.v1.0.G033149	AT3G16370	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein
86	HL.SW.v1.0.G006649	AT5G60490	FASCICLIN-like arabinogalactan-protein 12
87	HL.SW.v1.0.G036147	AT3G16370	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein
88	HL.SW.v1.0.G020089	AT1G75500	Walls Are Thin 1
89	HL.SW.v1.0.G004596	AT5G03170	FASCICLIN-like arabinogalactan-protein 11
90	HL.SW.v1.0.G041038	AT4G31950	cytochrome P450, family 82, subfamily C, polypeptide 3
91	HL.SW.v1.0.G017864	AT1G55020	lipoxygenase 1
92	HL.SW.v1.0.G037384	AT5G62180	carboxyesterase 20
93	HL.SW.v1.0.G018724	AT3G16370	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein
94	HL.SW.v1.0.G006585	AT2G35660	FAD/NAD(P)-binding oxidoreductase family protein
95	HL.SW.v1.0.G028606	AT4G31890	ARM repeat superfamily protein
96	HL.SW.v1.0.G005179	AT1G20160	Subtilisin-like serine endopeptidase family protein
97	HL.SW.v1.0.G026307	AT1G67040	unknown protein
98	HL.SW.v1.0.G042865	AT5G60490	FASCICLIN-like arabinogalactan-protein 12
99	HL.SW.v1.0.G022360	AT4G25960	P-glycoprotein 2
100	HL.SW.v1.0.G010522	AT5G59220	highly ABA-induced PP2C gene 1

Preglednica: Sto najbolj DI genov po metodi FunPat za **odporni kultivar – korenine**

rang	HopBase ID	TAIR ID	TAIR opis
1	HL.SW.v1.0.G000947	AT1G15910	XH/XS domain-containing protein
2	HL.SW.v1.0.G006455	AT3G12120	fatty acid desaturase 2
3	HL.SW.v1.0.G045414	ATCG01130	Ycf1 protein
4	HL.SW.v1.0.G012446	AT4G23160	cysteine-rich RLK (RECEPTOR-like protein kinase) 8
5	HL.SW.v1.0.G019635	AT1G72030	Acyl-CoA N-acyltransferases (NAT) superfamily protein
6	HL.SW.v1.0.G039468	ATMG01250	RNA-directed DNA polymerase (reverse transcriptase)
7	HL.SW.v1.0.G033309	AT5G20110	Dynein light chain type 1 family protein
8	HL.SW.v1.0.G018499	AT5G50335	unknown protein
9	HL.SW.v1.0.G016321	AT3G16250	NDH-dependent cyclic electron flow 1
10	HL.SW.v1.0.G046611	/	/
11	HL.SW.v1.0.G040477	AT4G23160	cysteine-rich RLK (RECEPTOR-like protein kinase) 8
12	HL.SW.v1.0.G046357	AT2G35700	ERF family protein 38
13	HL.SW.v1.0.G039519	AT4G50530	Copper transport protein family
14	HL.SW.v1.0.G020341	AT4G23160	cysteine-rich RLK (RECEPTOR-like protein kinase) 8

(se nadaljuje)

(nadaljevanje preglednice)

rang	HopBase ID	TAIR ID	TAIR opis
15	HL.SW.v1.0.G001477	AT3G19430	late embryogenesis abundant protein-related / LEA protein-related
16	HL.SW.v1.0.G045265	AT5G28237	Pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzyme family protein
17	HL.SW.v1.0.G030219	AT5G55470	Na+/H <sup>+</sup> (sodium hydrogen) exchanger 3
18	HL.SW.v1.0.G027853	AT4G34950	Major facilitator superfamily protein
19	HL.SW.v1.0.G045399	AT4G23160	cysteine-rich RLK (RECEPTOR-like protein kinase) 8
20	HL.SW.v1.0.G026318	AT4G23160	cysteine-rich RLK (RECEPTOR-like protein kinase) 8
21	HL.SW.v1.0.G024769	AT2G13770	/
22	HL.SW.v1.0.G025073	AT5G16530	Auxin efflux carrier family protein
23	HL.SW.v1.0.G003705	AT1G21230	wall associated kinase 5
24	HL.SW.v1.0.G000772	AT1G04920	sucrose phosphate synthase 3F
25	HL.SW.v1.0.G013634	AT4G11650	osmotin 34
26	HL.SW.v1.0.G003978	AT3G59010	pectin methylesterase 61
27	HL.SW.v1.0.G040733	AT5G63020	Disease resistance protein (CC-NBS-LRR class) family
28	HL.SW.v1.0.G025425	AT5G53550	YELLOW STRIPE like 3
29	HL.SW.v1.0.G004782	AT1G30260	BEST Arabidopsis thaliana protein match is: Galactosyltransferase family protein (TAIR:AT4G21060.1)
30	HL.SW.v1.0.G023636	AT2G45180	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein
31	HL.SW.v1.0.G025796	AT3G51550	Malectin/receptor-like protein kinase family protein
32	HL.SW.v1.0.G023055	AT3G05650	receptor like protein 32
33	HL.SW.v1.0.G000147	AT3G46850	Subtilase family protein
34	HL.SW.v1.0.G024827	AT5G60020	laccase 17
35	HL.SW.v1.0.G011026	AT1G70840	MLP-like protein 31
36	HL.SW.v1.0.G015243	ATMG00300	Gag-Pol-related retrotransposon family protein
37	HL.SW.v1.0.G034672	ATMG00860	DNA/RNA polymerases superfamily protein
38	HL.SW.v1.0.G029534	AT1G51810	Leucine-rich repeat protein kinase family protein
39	HL.SW.v1.0.G034960	AT5G01710	methyltransferases
40	HL.SW.v1.0.G034027	/	/
41	HL.SW.v1.0.G037359	AT4G23160	cysteine-rich RLK (RECEPTOR-like protein kinase) 8
42	HL.SW.v1.0.G013709	ATCG01050	NADH-Ubiquinone/plastoquinone (complex I) protein
43	HL.SW.v1.0.G005383	AT3G03480	acetyl CoA:(Z)-3-hexen-1-ol acetyltransferase
44	HL.SW.v1.0.G012162	AT4G23160	cysteine-rich RLK (RECEPTOR-like protein kinase) 8
45	HL.SW.v1.0.G005158	AT3G18200	nodulin MtN21 /EamA-like transporter family protein
46	HL.SW.v1.0.G026044	AT5G55050	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein
47	HL.SW.v1.0.G027592	AT5G16010	3-oxo-5-alpha-steroid 4-dehydrogenase family protein
48	HL.SW.v1.0.G033917	AT5G20860	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily
49	HL.SW.v1.0.G027343	AT3G49250	defective in meristem silencing 3
50	HL.SW.v1.0.G033358	AT5G18050	SAUR-like auxin-responsive protein family
51	HL.SW.v1.0.G044773	AT2G32660	receptor like protein 22
52	HL.SW.v1.0.G021839	AT5G64480	unknown protein
53	HL.SW.v1.0.G019600	AT1G70250	receptor serine/threonine kinase, putative
54	HL.SW.v1.0.G030306	AT3G12500	basic chitinase
55	HL.SW.v1.0.G043734	AT1G61680	terpene synthase 14
56	HL.SW.v1.0.G005787	AT1G73360	homeodomain GLABROUS 11
57	HL.SW.v1.0.G014034	AT4G12970	stomagen
58	HL.SW.v1.0.G039403	AT5G23850	Arabidopsis thaliana protein of unknown function (DUF821)
59	HL.SW.v1.0.G038518	AT2G01200	indole-3-acetic acid inducible 32
60	HL.SW.v1.0.G010370	AT3G54140	peptide transporter 1
61	HL.SW.v1.0.G014145	AT1G24480	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein
62	HL.SW.v1.0.G012159	AT5G23960	terpene synthase 21
63	HL.SW.v1.0.G021051	AT1G09720	Kinase interacting (KIP1-like) family protein
64	HL.SW.v1.0.G039353	AT1G68040	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein
65	HL.SW.v1.0.G043185	AT3G54420	homolog of carrot EP3-3 chitinase
66	HL.SW.v1.0.G000667	AT4G15550	indole-3-acetate beta-D-glucosyltransferase
67	HL.SW.v1.0.G024438	AT4G23160	cysteine-rich RLK (RECEPTOR-like protein kinase) 8
68	HL.SW.v1.0.G013324	AT1G28270	ralf-like 4
69	HL.SW.v1.0.G034700	AT5G13910	Integrase-type DNA-binding superfamily protein
70	HL.SW.v1.0.G035557	AT5G25610	BURP domain-containing protein
71	HL.SW.v1.0.G029544	AT1G13520	Protein of unknown function (DUF1262)
72	HL.SW.v1.0.G010183	AT5G43580	Serine protease inhibitor, potato inhibitor I-type family protein
73	HL.SW.v1.0.G010388	AT5G17780	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
74	HL.SW.v1.0.G040756	AT3G59010	pectin methylesterase 61
75	HL.SW.v1.0.G041391	AT4G23420	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein
76	HL.SW.v1.0.G029819	AT3G23800	selenium-binding protein 3
77	HL.SW.v1.0.G016095	ATCG00360	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein
78	HL.SW.v1.0.G028488	AT4G11650	osmotin 34
79	HL.SW.v1.0.G020686	AT4G16740	terpene synthase 03

(se nadaljuje)

(nadaljevanje preglednice)

rang	HopBase ID	TAIR ID	TAIR opis
81	HL.SW.v1.0.G043885	AT1G44160	HSP40/DnaJ peptide-binding protein
82	HL.SW.v1.0.G026824	AT5G24620	Pathogenesis-related thaumatin superfamily protein
83	HL.SW.v1.0.G000343	AT2G04032	zinc transporter 7 precursor
84	HL.SW.v1.0.G015516	AT4G13150	unknown protein
85	HL.SW.v1.0.G012515	AT3G54940	Papain family cysteine protease
86	HL.SW.v1.0.G007500	AT2G28500	LOB domain-containing protein 11
87	HL.SW.v1.0.G013297	AT4G17030	expansin-like B1
88	HL.SW.v1.0.G026445	AT4G05200	cysteine-rich RLK (RECEPTOR-like protein kinase) 25
89	HL.SW.v1.0.G010327	AT4G08300	nodulin MtN21 /EamA-like transporter family protein
90	HL.SW.v1.0.G020036	AT1G11410	S-locus lectin protein kinase family protein
91	HL.SW.v1.0.G014033	AT1G55020	lipoxygenase 1
92	HL.SW.v1.0.G034708	AT1G25440	B-box type zinc finger protein with CCT domain
93	HL.SW.v1.0.G004327	AT5G19440	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein
94	HL.SW.v1.0.G031899	AT2G33030	receptor like protein 25
95	HL.SW.v1.0.G014929	AT4G08850	Leucine-rich repeat receptor-like protein kinase family protein
96	HL.SW.v1.0.G007083	/	/
97	HL.SW.v1.0.G012160	AT1G30510	root FNR 2
98	HL.SW.v1.0.G032236	AT5G10280	myb domain protein 92
99	HL.SW.v1.0.G021375	AT1G75040	pathogenesis-related gene 5
100	HL.SW.v1.0.G021998	ATMG01250	RNA-directed DNA polymerase (reverse transcriptase)

Preglednica: Sto najbolj DI genov po metodi FunPat za **neodporni kultivar – nadzemni deli**

rang	HopBase ID	TAIR ID	TAIR opis
1	HL.SW.v1.0.G018902	AT1G67090	ribulose bisphosphate carboxylase small chain 1A
2	HL.SW.v1.0.G021375	AT1G75040	pathogenesis-related gene 5
3	HL.SW.v1.0.G036759	AT1G29930	chlorophyll A/B binding protein 1
4	HL.SW.v1.0.G035683	AT4G33720	CAP (Cysteine-rich secretory proteins, Antigen 5, and Pathogenesis-related 1 protein) superfamily protein
5	HL.SW.v1.0.G018389	AT3G15353	metallothionein 3
6	HL.SW.v1.0.G022760	AT3G04720	pathogenesis-related 4
7	HL.SW.v1.0.G023015	AT5G66570	PS II oxygen-evolving complex 1
8	HL.SW.v1.0.G042512	AT4G33720	CAP (Cysteine-rich secretory proteins, Antigen 5, and Pathogenesis-related 1 protein) superfamily protein
9	HL.SW.v1.0.G034459	AT4G14746	/
10	HL.SW.v1.0.G036575	AT2G38540	lipid transfer protein 1
11	HL.SW.v1.0.G043185	AT3G54420	homolog of carrot EP3-3 chitinase
12	HL.SW.v1.0.G026616	AT4G33720	CAP (Cysteine-rich secretory proteins, Antigen 5, and Pathogenesis-related 1 protein) superfamily protein
13	HL.SW.v1.0.G008035	AT4G16260	Glycosyl hydrolase superfamily protein
14	HL.SW.v1.0.G017213	AT2G14580	basic pathogenesis-related protein 1
15	HL.SW.v1.0.G004658	AT2G13810	AGD2-like defense response protein 1
16	HL.SW.v1.0.G030454	AT4G16260	Glycosyl hydrolase superfamily protein
17	HL.SW.v1.0.G025479	AT5G20230	blue-copper-binding protein
18	HL.SW.v1.0.G036928	AT2G25150	HXXXD-type acyl-transferase family protein
19	HL.SW.v1.0.G000278	AT5G43580	Serine protease inhibitor, potato inhibitor I-type family protein
20	HL.SW.v1.0.G001647	AT5G24090	chitinase A
21	HL.SW.v1.0.G035128	AT3G57270	beta-1,3-glucanase 1
22	HL.SW.v1.0.G036463	AT4G16260	Glycosyl hydrolase superfamily protein
23	HL.SW.v1.0.G018461	AT1G56600	galactinol synthase 2
24	HL.SW.v1.0.G029230	AT2G05100	photosystem II light harvesting complex gene 2.1
25	HL.SW.v1.0.G035819	AT3G09220	laccase 7
26	HL.SW.v1.0.G026173	AT1G30700	FAD-binding Berberine family protein
27	HL.SW.v1.0.G013634	AT4G11650	osmotin 34
28	HL.SW.v1.0.G000366	AT3G12500	basic chitinase
29	HL.SW.v1.0.G042589	AT5G48930	hydroxycinnamoyl-CoA shikimate/quinate hydroxycinnamoyl transferase
30	HL.SW.v1.0.G031877	AT4G16260	Glycosyl hydrolase superfamily protein
31	HL.SW.v1.0.G046084	AT2G42840	protodermal factor 1
32	HL.SW.v1.0.G034625	AT3G45140	lipoxygenase 2
33	HL.SW.v1.0.G037384	AT5G62180	carboxyesterase 20
34	HL.SW.v1.0.G002760	AT3G12500	basic chitinase
35	HL.SW.v1.0.G002323	AT4G35160	O-methyltransferase family protein

(se nadaljuje)

(nadaljevanje preglednice)

rang	HopBase ID	TAIR ID	TAIR opis
36	HL.SW.v1.0.G009955	AT5G50400	purple acid phosphatase 27
37	HL.SW.v1.0.G041438	AT4G37070	Acyl transferase/acyl hydrolase/lysophospholipase superfamily protein
38	HL.SW.v1.0.G007626	AT5G39150	RmlC-like cupins superfamily protein
39	HL.SW.v1.0.G022380	AT4G35160	O-methyltransferase family protein
40	HL.SW.v1.0.G029047	AT5G20230	blue-copper-binding protein
41	HL.SW.v1.0.G016762	AT3G01500	carbonic anhydrase 1
42	HL.SW.v1.0.G006074	AT2G10940	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein
43	HL.SW.v1.0.G013555	AT5G13930	Chalcone and stilbene synthase family protein
44	HL.SW.v1.0.G008177	AT2G45550	cytochrome P450, family 76, subfamily C, polypeptide 4
45	HL.SW.v1.0.G018027	AT2G37900	Major facilitator superfamily protein
46	HL.SW.v1.0.G005352	AT3G57270	beta-1,3-glucanase 1
47	HL.SW.v1.0.G013551	AT3G63170	Chalcone-flavanone isomerase family protein
48	HL.SW.v1.0.G018725	AT1G14520	myo-inositol oxygenase 1
49	HL.SW.v1.0.G000297	AT5G17820	Peroxidase superfamily protein
50	HL.SW.v1.0.G006415	AT1G59960	NAD(P)-linked oxidoreductase superfamily protein
51	HL.SW.v1.0.G007127	AT5G33370	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein
52	HL.SW.v1.0.G015810	AT2G44480	beta glucosidase 17
53	HL.SW.v1.0.G006069	AT2G41690	heat shock transcription factor B3
54	HL.SW.v1.0.G023502	AT4G10500	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein
55	HL.SW.v1.0.G021206	AT3G47340	glutamine-dependent asparagine synthase 1
56	HL.SW.v1.0.G005740	AT3G12500	basic chitinase
57	HL.SW.v1.0.G010964	AT4G11650	osmotin 34
58	HL.SW.v1.0.G013680	AT3G54420	homolog of carrot EP3-3 chitinase
59	HL.SW.v1.0.G000309	AT3G45140	lipoxygenase 2
60	HL.SW.v1.0.G009501	AT4G33720	CAP (Cysteine-rich secretory proteins, Antigen 5, and Pathogenesis-related 1 protein) superfamily protein
61	HL.SW.v1.0.G043654	AT4G39830	Cupredoxin superfamily protein
62	HL.SW.v1.0.G018522	AT4G25650	ACD1-like
63	HL.SW.v1.0.G035444	AT3G57520	seed imbibition 2
64	HL.SW.v1.0.G034332	AT3G12500	basic chitinase
65	HL.SW.v1.0.G043981	AT1G21270	wall-associated kinase 2
66	HL.SW.v1.0.G004083	AT5G14740	carbonic anhydrase 2
67	HL.SW.v1.0.G039240	AT1G37130	nitrate reductase 2
68	HL.SW.v1.0.G020686	AT4G16740	terpene synthase 03
69	HL.SW.v1.0.G018740	AT5G44310	Late embryogenesis abundant protein (LEA) family protein
70	HL.SW.v1.0.G020002	AT1G72610	germin-like protein 1
71	HL.SW.v1.0.G038363	AT5G13930	Chalcone and stilbene synthase family protein
72	HL.SW.v1.0.G022236	AT2G29350	senescence-associated gene 13
73	HL.SW.v1.0.G030396	AT4G36670	Major facilitator superfamily protein
74	HL.SW.v1.0.G026004	AT4G35160	O-methyltransferase family protein
75	HL.SW.v1.0.G019645	AT3G12500	basic chitinase
76	HL.SW.v1.0.G015153	AT4G11650	osmotin 34
77	HL.SW.v1.0.G023951	AT5G43580	Serine protease inhibitor, potato inhibitor I-type family protein
78	HL.SW.v1.0.G043317	AT3G44250	cytochrome P450, family 71, subfamily B, polypeptide 38
79	HL.SW.v1.0.G041439	AT2G26560	phospholipase A 2A
80	HL.SW.v1.0.G011647	AT5G05340	Peroxidase superfamily protein
81	HL.SW.v1.0.G033684	AT1G06620	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein
82	HL.SW.v1.0.G011059	AT1G24020	MLP-like protein 423
83	HL.SW.v1.0.G021701	AT5G43580	Serine protease inhibitor, potato inhibitor I-type family protein
84	HL.SW.v1.0.G001716	AT4G37070	Acyl transferase/acyl hydrolase/lysophospholipase superfamily protein
85	HL.SW.v1.0.G032727	AT1G21240	wall associated kinase 3
86	HL.SW.v1.0.G024897	AT5G36110	cytochrome P450, family 716, subfamily A, polypeptide 1
87	HL.SW.v1.0.G036920	AT1G24020	MLP-like protein 423
88	HL.SW.v1.0.G009412	AT5G42650	allene oxide synthase
89	HL.SW.v1.0.G007512	AT3G06390	Uncharacterised protein family (UPF0497)
90	HL.SW.v1.0.G007256	AT5G52450	MATE efflux family protein
91	HL.SW.v1.0.G023488	AT5G13330	related to AP2 61
92	HL.SW.v1.0.G023483	AT5G05340	Peroxidase superfamily protein
93	HL.SW.v1.0.G020154	AT5G06860	polygalacturonase inhibiting protein 1
94	HL.SW.v1.0.G018710	AT3G45140	lipoxygenase 2
95	HL.SW.v1.0.G014567	AT3G04720	pathogenesis-related 4
96	HL.SW.v1.0.G041864	AT4G31950	cytochrome P450, family 82, subfamily C, polypeptide 3
97	HL.SW.v1.0.G034572	AT5G23810	amino acid permease 7
98	HL.SW.v1.0.G004109	AT5G36110	cytochrome P450, family 716, subfamily A, polypeptide 1
99	HL.SW.v1.0.G017864	AT1G55020	lipoxygenase 1
100	HL.SW.v1.0.G015030	AT1G51780	IAA-leucine resistant (ILR)-like gene 5

Preglednica: Sto najbolj DI genov po metodi FunPat za **neodporni kultivar – korenine**

rang	HopBase ID	TAIR ID	TAIR opis
1	HL.SW.v1.0.G021375	AT1G75040	pathogenesis-related gene 5
2	HL.SW.v1.0.G043185	AT3G54420	homolog of carrot EP3-3 chitinase
3	HL.SW.v1.0.G010516	AT4G11650	osmotin 34
4	HL.SW.v1.0.G006597	AT4G11650	osmotin 34
5	HL.SW.v1.0.G022760	AT3G04720	pathogenesis-related 4
6	HL.SW.v1.0.G035750	AT2G39980	HXXXD-type acyl-transferase family protein
7	HL.SW.v1.0.G034017	AT3G04720	pathogenesis-related 4
8	HL.SW.v1.0.G037295	AT3G04720	pathogenesis-related 4
9	HL.SW.v1.0.G030454	AT4G16260	Glycosyl hydrolase superfamily protein
10	HL.SW.v1.0.G036463	AT4G16260	Glycosyl hydrolase superfamily protein
11	HL.SW.v1.0.G026173	AT1G30700	FAD-binding Berberine family protein
12	HL.SW.v1.0.G022380	AT4G35160	O-methyltransferase family protein
13	HL.SW.v1.0.G013634	AT4G11650	osmotin 34
14	HL.SW.v1.0.G011727	AT2G30150	UDP-Glycosyltransferase superfamily protein
15	HL.SW.v1.0.G005740	AT3G12500	basic chitinase
16	HL.SW.v1.0.G036959	AT4G28940	Phosphorylase superfamily protein
17	HL.SW.v1.0.G042512	AT4G33720	CAP (Cysteine-rich secretory proteins, Antigen 5, and Pathogenesis-related 1 protein) superfamily protein
18	HL.SW.v1.0.G002760	AT3G12500	basic chitinase
19	HL.SW.v1.0.G000366	AT3G12500	basic chitinase
20	HL.SW.v1.0.G035683	AT4G33720	CAP (Cysteine-rich secretory proteins, Antigen 5, and Pathogenesis-related 1 protein) superfamily protein
21	HL.SW.v1.0.G018710	AT3G45140	lipoxygenase 2
22	HL.SW.v1.0.G002323	AT4G35160	O-methyltransferase family protein
23	HL.SW.v1.0.G009501	AT4G33720	CAP (Cysteine-rich secretory proteins, Antigen 5, and Pathogenesis-related 1 protein) superfamily protein
24	HL.SW.v1.0.G042139	AT3G45140	lipoxygenase 2
25	HL.SW.v1.0.G000278	AT5G43580	Serine protease inhibitor, potato inhibitor I-type family protein
26	HL.SW.v1.0.G013680	AT3G54420	homolog of carrot EP3-3 chitinase
27	HL.SW.v1.0.G023840	AT1G52800	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein
28	HL.SW.v1.0.G043441	AT4G25000	alpha-amylase-like
29	HL.SW.v1.0.G022701	AT4G22880	leucoanthocyanidin dioxygenase
30	HL.SW.v1.0.G015192	AT3G09270	glutathione S-transferase TAU 8
31	HL.SW.v1.0.G026450	AT3G18000	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein
32	HL.SW.v1.0.G001924	AT1G14550	Peroxidase superfamily protein
33	HL.SW.v1.0.G003282	AT1G26820	ribonuclease 3
34	HL.SW.v1.0.G019676	/	/
35	HL.SW.v1.0.G023483	AT5G05340	Peroxidase superfamily protein
36	HL.SW.v1.0.G000166	AT5G25610	BURP domain-containing protein
37	HL.SW.v1.0.G024047	AT1G14550	Peroxidase superfamily protein
38	HL.SW.v1.0.G026616	AT4G33720	CAP (Cysteine-rich secretory proteins, Antigen 5, and Pathogenesis-related 1 protein) superfamily protein
39	HL.SW.v1.0.G011967	AT5G25610	BURP domain-containing protein
40	HL.SW.v1.0.G000359	AT5G43580	Serine protease inhibitor, potato inhibitor I-type family protein
41	HL.SW.v1.0.G036575	AT2G38540	lipid transfer protein 1
42	HL.SW.v1.0.G011647	AT5G05340	Peroxidase superfamily protein
43	HL.SW.v1.0.G015153	AT4G11650	osmotin 34
44	HL.SW.v1.0.G019573	AT4G37070	Acyl transferase/acyl hydrolase/lysophospholipase superfamily protein
45	HL.SW.v1.0.G033424	AT4G37050	PATATIN-like protein 4
46	HL.SW.v1.0.G023643	AT3G22960	Pyruvate kinase family protein
47	HL.SW.v1.0.G021701	AT5G43580	Serine protease inhibitor, potato inhibitor I-type family protein
48	HL.SW.v1.0.G004837	AT4G16740	terpene synthase 03
49	HL.SW.v1.0.G006074	AT2G10940	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein
50	HL.SW.v1.0.G001793	AT2G44480	beta glucosidase 17
51	HL.SW.v1.0.G031877	AT4G16260	Glycosyl hydrolase superfamily protein
52	HL.SW.v1.0.G021801	AT3G22960	Pyruvate kinase family protein
53	HL.SW.v1.0.G001647	AT5G24090	chitinase A
54	HL.SW.v1.0.G030918	AT3G52840	beta-galactosidase 2
55	HL.SW.v1.0.G026150	AT1G78860	D-mannose binding lectin protein with Apple-like carbohydrate-binding domain
56	HL.SW.v1.0.G026286	/	/
57	HL.SW.v1.0.G017864	AT1G55020	lipoxygenase 1
58	HL.SW.v1.0.G008035	AT4G16260	Glycosyl hydrolase superfamily protein
59	HL.SW.v1.0.G001794	AT2G44480	beta glucosidase 17
60	HL.SW.v1.0.G014040	AT1G52790	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein
61	HL.SW.v1.0.G040057	AT4G25000	alpha-amylase-like
62	HL.SW.v1.0.G001866	AT5G39150	RmlC-like cupins superfamily protein

(se nadaljuje)

(nadaljevanje preglednice)

rang	HopBase ID	TAIR ID	TAIR opis
63	HL.SW.v1.0.G045777	AT5G23660	homolog of <i>Medicago truncatula</i> MTN3
64	HL.SW.v1.0.G021501	AT4G25000	alpha-amylase-like
65	HL.SW.v1.0.G008913	AT4G35770	Rhodanese/Cell cycle control phosphatase superfamily protein
66	HL.SW.v1.0.G008536	AT1G60710	NAD(P)-linked oxidoreductase superfamily protein
67	HL.SW.v1.0.G010964	AT4G11650	osmotin 34
68	HL.SW.v1.0.G031205	AT2G45220	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily
69	HL.SW.v1.0.G014567	AT3G04720	pathogenesis-related 4
70	HL.SW.v1.0.G017213	AT2G14580	basic pathogenesis-related protein 1
71	HL.SW.v1.0.G011026	AT1G70840	MLP-like protein 31
72	HL.SW.v1.0.G031079	AT3G47340	glutamine-dependent asparagine synthase 1
73	HL.SW.v1.0.G022116	AT1G30760	FAD-binding Berberine family protein
74	HL.SW.v1.0.G013345	AT4G05390	root FNR 1
75	HL.SW.v1.0.G038787	AT3G45140	lipoxygenase 2
76	HL.SW.v1.0.G018947	AT5G13930	Chalcone and stilbene synthase family protein
77	HL.SW.v1.0.G022911	AT3G17790	purple acid phosphatase 17
78	HL.SW.v1.0.G038337	AT1G65680	expansin B2
79	HL.SW.v1.0.G036920	AT1G24020	MLP-like protein 423
80	HL.SW.v1.0.G035320	AT1G03220	Eukaryotic aspartyl protease family protein
81	HL.SW.v1.0.G041806	AT3G01680	/
82	HL.SW.v1.0.G009412	AT5G42650	allene oxide synthase
83	HL.SW.v1.0.G019111	AT4G31940	cytochrome P450, family 82, subfamily C, polypeptide 4
84	HL.SW.v1.0.G035352	/	/
85	HL.SW.v1.0.G001716	AT4G37070	Acyl transferase/acyl hydrolase/lysophospholipase superfamily protein
86	HL.SW.v1.0.G009569	AT2G13360	alanine:glyoxylate aminotransferase
87	HL.SW.v1.0.G042045	AT1G13110	cytochrome P450, family 71 subfamily B, polypeptide 7
88	HL.SW.v1.0.G043411	AT4G25150	HAD superfamily, subfamily IIIB acid phosphatase
89	HL.SW.v1.0.G040773	AT1G75290	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein
90	HL.SW.v1.0.G015030	AT1G51780	IAA-leucine resistant (ILR)-like gene 5
91	HL.SW.v1.0.G035128	AT3G57270	beta-1,3-glucanase 1
92	HL.SW.v1.0.G000353	AT3G18830	polyol/monosaccharide transporter 5
93	HL.SW.v1.0.G004754	AT3G09270	glutathione S-transferase TAU 8
94	HL.SW.v1.0.G033913	AT1G43800	Plant stearoyl-acyl-carrier-protein desaturase family protein
95	HL.SW.v1.0.G005555	AT5G64120	Peroxidase superfamily protein
96	HL.SW.v1.0.G044208	AT3G12500	basic chitinase
97	HL.SW.v1.0.G007626	AT5G39150	RmlC-like cupins superfamily protein
98	HL.SW.v1.0.G024495	AT5G13740	zinc induced facilitator 1
99	HL.SW.v1.0.G037808	AT5G13740	zinc induced facilitator 1
100	HL.SW.v1.0.G042022	/	/

## PRILOGA D

### ODSTOTEK DI GENOV PO POSAMEZNIH POJMIH GO SLIM

Preglednica: Odstotek DI genov s pripisanim pojmom GO Slim – biološki proces (BP, ang. Biological Process)

GO ID	pojem GO	% DI genov			
		neodporni k. korenine	neodporni k. nadz.i deli	odporni k. korenine	odporni k. nadz. deli
GO:0009987	cellular process	23,3	16,2	18,8	14,1
GO:0009058	biosynthetic process	11,6	14,7	11,6	12,2
GO:0006464	cellular protein modification process	5,0	9,0	5,8	9,1
GO:0006139	nucleobase-containing compound metabolic process	3,4	7,7	10,1	6,6
GO:0005975	carbohydrate metabolic process	13,1	8,1	5,8	6,4
GO:0016043	cellular component organization	5,6	6,4	2,9	6,0
GO:0006950	response to stress	8,1	6,1	1,4	5,1
GO:0009056	catabolic process	8,7	6,2	7,2	4,7
GO:0006629	lipid metabolic process	6,0	6,5	5,8	4,5
GO:0006810	transport	3,5	3,7	5,8	3,9
GO:0019538	protein metabolic process	4,1	4,1	1,4	3,6
GO:0008152	metabolic process	2,5	2,8	5,8	3,0
GO:0006091	generation of precursor metabolites and energy	1,7	4,0	2,9	1,3
GO:0015979	photosynthesis	0,7	3,9	1,4	0,7
GO:0006259	DNA metabolic process	0,7	0,8	1,4	2,0
GO:0009628	response to abiotic stimulus	2,0	2,7	0,0	2,0
GO:0009791	post-embryonic development	1,0	1,7	1,4	1,6
GO:0009607	response to biotic stimulus	3,1	2,4	1,4	1,6
GO:0009653	anatomical structure morphogenesis	1,1	1,8	1,4	1,5
GO:0009719	response to endogenous stimulus	0,9	2,0	2,9	1,5
GO:0007165	signal transduction	1,0	1,2	1,4	1,4
GO:0007275	multicellular organism development	1,1	0,9	1,4	1,4
GO:0009605	response to external stimulus	2,7	1,9	1,4	1,4
GO:0007049	cell cycle	0,6	0,3	0,0	1,3
GO:0006412	translation	0,0	1,7	0,0	1,0
GO:0009908	flower development	0,5	1,1	0,0	0,9
GO:0030154	cell differentiation	0,2	0,9	1,4	0,8
GO:0009790	embryo development	0,2	0,8	0,0	0,8
GO:0019748	secondary metabolic process	1,9	1,3	2,9	0,8
GO:0000003	reproduction	0,5	0,3	0,0	0,7
GO:0008150	biological_process	1,2	0,7	1,4	0,6
GO:0019725	cellular homeostasis	0,2	1,0	1,4	0,5
GO:0016049	cell growth	0,5	0,3	1,4	0,5
GO:00040029	regulation of gene expression, epigenetic	0,2	0,2	0,0	0,4
GO:0009875	pollen-pistil interaction	0,2	0,4	0,0	0,3
GO:0040007	growth	0,2	0,2	0,0	0,3
GO:0008219	cell death	0,1	0,3	0,0	0,2
GO:0009856	pollination	0,2	0,0	1,4	0,2
GO:0009606	tropism	0,1	0,2	0,0	0,1
GO:0007154	cell communication	0,4	0,2	0,0	0,1
GO:0009991	response to extracellular stimulus	0,4	0,2	0,0	0,1
GO:0007267	cell-cell signaling	0,0	0,1	1,4	0,1
GO:0009838	abscission	0,0	0,1	0,0	0,0
GO:0009835	fruit ripening	0,2	0,1	0,0	0,0

Preglednica: Odstotek DI genov s pripisanim pojmom GO Slim – molekularna funkcija (MF, ang. Molecular Function)

GO ID	pojem GO	% DI genov			
		neodporni k. korenine	neodporni k. nadz.i deli	odporni k. korenine	odporni k. nadz. deli
GO:0003824	catalytic activity	24,1	20,8	10,1	13,9
GO:0016787	hydrolase activity	16,9	14,0	8,7	12,9
GO:0000166	nucleotide binding	6,2	11,0	2,9	12,7
GO:0005488	binding	19,8	16,0	8,7	12,0
GO:0016740	transferase activity	9,0	9,0	7,2	8,4
GO:0016301	kinase activity	3,1	6,3	8,7	7,1
GO:0003677	DNA binding	5,8	4,8	4,3	4,7
GO:0005215	transporter activity	6,3	5,2	5,8	4,2
GO:0005515	protein binding	5,6	3,6	0,0	3,9
GO:0030246	carbohydrate binding	1,9	1,6	0,0	1,1
GO:0003700	transcription factor activity, seq.-specific DNA binding	0,7	1,1	2,9	1,0
GO:0003676	nucleic acid binding	0,1	0,8	2,9	1,0
GO:0003723	RNA binding	0,0	1,2	0,0	0,9
GO:0005198	structural molecule activity	0,4	1,3	0,0	0,7
GO:0003774	motor activity	0,4	0,4	0,0	0,7
GO:0008289	lipid binding	0,2	1,0	1,4	0,7
GO:0030234	enzyme regulator activity	1,7	0,7	1,4	0,6
GO:0004871	signal transducer activity	0,1	0,2	1,4	0,5
GO:0004518	nuclease activity	0,0	0,4	0,0	0,4
GO:0004872	receptor activity	0,0	0,2	0,0	0,3
GO:0008135	translation factor activity, RNA binding	0,0	0,4	0,0	0,3
GO:0003674	molecular_function	0,5	0,2	0,0	0,2
GO:0005102	receptor binding	0,0	0,0	1,4	0,1
GO:0003682	chromatin binding	0,0	0,0	0,0	0,1
GO:0019825	oxygen binding	0,1	0,1	0,0	0,0

Preglednica: Odstotek DI genov s pripisanim pojmom GO Slim – celični predelek (CC, ang. Cellular Compartment)

GO ID	pojem GO	% DI genov			
		neodporni k. korenine	neodporni k. nadz.i deli	odporni k. korenine	odporni k. nadz. deli
GO:0016020	membrane	10,6	14,7	11,6	10,6
GO:0009536	plastid	6,8	13,6	4,3	4,6
GO:0005634	nucleus	4,9	3,5	5,8	4,3
GO:0009579	thylakoid	2,5	6,6	2,9	1,3
GO:0005886	plasma membrane	4,1	2,6	0,0	3,6
GO:0005576	extracellular region	8,2	4,5	4,3	2,8
GO:0005737	cytoplasm	2,0	1,6	1,4	2,3
GO:0005829	cytosol	2,9	2,3	0,0	2,1
GO:0005622	intracellular	0,7	1,5	1,4	2,1
GO:0005739	mitochondrion	1,0	2,0	0,0	1,8
GO:0005618	cell wall	4,6	1,9	1,4	1,8
GO:0005856	cytoskeleton	1,0	0,6	1,4	1,4
GO:0005773	vacuole	2,1	1,6	0,0	1,3
GO:0005794	Golgi apparatus	0,4	0,8	1,4	1,2
GO:0005783	endoplasmic reticulum	0,1	0,6	1,4	1,2
GO:0005840	ribosome	0,2	1,8	0,0	0,9
GO:0005730	nucleolus	1,6	0,7	0,0	0,8
GO:0005623	cell	0,2	0,9	1,4	0,6
GO:0005575	cellular_component	0,4	0,1	0,0	0,3
GO:0005777	peroxisome	0,1	0,4	0,0	0,2
GO:0005768	endosome	0,0	0,2	0,0	0,2
GO:0005654	nucleoplasm	0,1	0,0	0,0	0,2
GO:0005635	nuclear envelope	0,0	0,0	0,0	0,2
GO:0005615	extracellular space	0,2	0,0	0,0	0,0
GO:0030312	external encapsulating structure	0,0	0,0	0,0	0,0