

Šolski Center Postojna
Gimnazija
Cesta v Staro vas 2, 6230 Postojna

Vpliv okužb virusa Y krompirja na bolezenske znake ter test
kužnosti novega virusa iz rodu *Potyvirus* na rastlini *Nicotiana
benthamiana*

RAZISKOVALNA NALOGA

Tematsko področje: Biologija

Avtorici: Maja Dekleva in Vita Šavli

Mentorica: dr. Anja Pecman

Somentor: doc. dr. Denis Kutnjak

Somentorica: univ. dipl. biolog, Andreja Kerin, prof. biologije

Postojna 2023

Kazalo vsebine

Povzetek	5
Summary	5
Pojasnitev strokovnih izrazov in kratic.....	6
1. Uvod	7
2. Pregled objav.....	8
2.1. Rastlinski virusi	8
2.2. PVY.....	9
2.3. Nov virus iz rodu <i>Potyvirus</i>	9
2.4. <i>Nicotiana benthamiana</i>	10
3. Teorija uporabljenih raziskovalnih metod	11
3.1. Mehanska inokulacija	11
3.2. RT-qPCR in RT-PCR	11
4. Metode dela in postopek.....	11
4.1. Zasaditev in selekcija rastlin.....	12
4.2. Priprava inokuluma in okuževanje	12
4.3. Meritve in opazovanje bolezenskih znamenj	13
4.4. Vzorčenje listov in tehtanje mase korenin in nadzemeljskega dela.....	13
4.5. Testiranje rastlin na PVY s hitrimi testi	13
4.6. RNA izolacija in PCR testiranje	14
5. Rezultati.....	14
5.1. Primerjalne slike testnih rastlin	14
5.2. Primerjava višine in števila listov v posamezni skupini	17
5.3. Primerjava mase korenin in nadzemeljskega dela rastlin	24
5.4. Rezultati hitrih testov za zaznavo virusa PVY in rezultati RT-PCR ter RT-qPCR	25
6. Razprava	27
6.1. Interpretacija rezultatov	27
6.2. Vpliv na kmetijsko pomembne rastline	28
7. Zaključek	30
8. Literatura	31
9. Internetni viri	31

Kazalo slik:

Slika 1: okužena regačica primer 1, avtor: dr. Mark Paul Selda Rivarez	10
Slika 2: okužena regačica primer 2, avtor: dr. Mark Paul Selda Rivarez	10
Slika 3: rastlina A2 (MOCK).....	14
Slika 4: rastlina A1 (MOCK).....	14
Slika 5: rastlina A4 (MOCK).....	15
Slika 6: rastlina A3 (MOCK).....	15
Slika 7: rastlina B2 (PVY)	15
Slika 8: rastlina B1 (PVY)	15
Slika 9: rastlina B4 (PVY)	15
Slika 10: rastlina B3 (PVY)	15
Slika 12: rastlina C1 (nov virus iz rodu <i>Potyvirus</i>).....	15
Slika 11: rastlina C2 (nov virus iz rodu <i>Potyvirus</i>).....	15
Slika 14: rastlina C3 (nov virus iz rodu <i>Potyvirus</i>).....	16
Slika 13: rastlina C4 (nov virus iz rodu <i>Potyvirus</i>).....	16
Slika 15: rastlina D2 (PVY + nov virus iz rodu <i>Potyvirus</i>).....	16
Slika 16: rastlina D1 (PVY + nov virus iz rodu <i>Potyvirus</i>).....	16
Slika 17: rastlina D4(PVY + nov virus iz rodu <i>Potyvirus</i>).....	16
Slika 18: rastlina D3 (PVY + nov virus iz rodu <i>Potyvirus</i>).....	16
Slika 19: rastlina E2 (PVY + nov virus iz rodu <i>Potyvirus</i> po 7 dneh)	16
Slika 20: rastlina E1 (PVY + nov virus iz rodu <i>Potyvirus</i> po 7 dneh)	16
Slika 21: rastlina E4 (PVY + nov virus iz rodu <i>Potyvirus</i> po 7 dneh)	17
Slika 22: rastlina E3 (PVY + nov virus iz rodu <i>Potyvirus</i> po 7 dneh)	17
Slika 23: Rezultati RT-PCR skupine A (MOCK) levo, nanašanje v vdolbincah A1, A2, A3, A4 . Rezultati skupin B (PVY) in C (nov virus iz rodu <i>Potyvirus</i>) na sredini, nanašanje v vdolbincah B1, B2, B3, B4, C1, C2, C3, C4. Rezultati skupin D (PVY in nov virus iz rodu <i>Potyvirus</i>) in E (PVY in nov virus iz rodu <i>Potyvirus</i> po 7 dneh) desno, nanašanje v vdolbincah D1, D2, D3, D4, E1, E2, E3, E4.....	26

Kazalo grafov:

Graf 1: višina skupine A (MOCK).....	18
Graf 2: Št. listov skupine A (MOCK)	18
Graf 3: Višina skupine B (PVY).....	19
Graf 4: Št. listov skupine B (PVY).....	19
Graf 5: Višina skupine C (nov virus iz rodu <i>Potyvirus</i>)	20
Graf 6: Št. listov skupine C (nov virus iz rodu <i>Potyvirus</i>).....	21
Graf 7: Višina skupine D (PVY + nov virus iz rodu <i>Potyvirus</i>)	22
Graf 8: Št. listov skupine D (PVY + nov virus iz rodu <i>Potyvirus</i>).....	22
Graf 9: Višina skupine E (PVY + nov virus iz rodu <i>Potyvirus</i> po 7 dneh).....	23
Graf 10: Št. listov skupine E (PVY + nov virus iz rodu <i>Potyvirus</i> po 7 dneh)	23
Graf 11: Masa korenin skupin A (MOCK), B (PVY), C (nov virus iz rodu <i>Potyvirus</i>), D (PVY + nov virus iz rodu <i>Potyvirus</i>) in E (PVY + nov virus iz rodu <i>Potyvirus</i> po 7 dneh)	24
Graf 12: Masa nadzemeljskega dela vseh skupin A (MOCK), B (PVY), C (nov virus iz rodu <i>Potyvirus</i>), D (PVY + nov virus iz rodu <i>Potyvirus</i>) in E (PVY + nov virus iz rodu <i>Potyvirus</i> po 7 dneh).....	25

Kazalo tabel:

Tabela 1: Skupina A (MOCK) višina	17
Tabela 2: Skupina A (MOCK) število listov	17
Tabela 3: Skupina B (PVY) višina.....	18
Tabela 4: Skupina B (PVY) število listov.....	19
Tabela 5: Skupina C (nov virus iz rodu <i>Potyvirus</i>) višina	20
Tabela 6: Skupina C (nov virus iz rodu <i>Potyvirus</i>) število listov	20
Tabela 7: Skupina D (PVY + nov virus iz rodu <i>Potyvirus</i>) višina	21
Tabela 8: Skupina D (PVY + nov virus iz rodu <i>Potyvirus</i>) število listov	21
Tabela 9: Skupina E (PVY + nov virus iz rodu <i>Potyvirus</i> po 7 dneh) višina	22
Tabela 10: Skupina E (PVY + nov virus iz rodu <i>Potyvirus</i> po 7 dneh) število listov.....	23
Tabela 11: Rezultati RT-qPCR za virus PVY *UNDET – nezaznan signal	27

Povzetek

Rastlinski virusi spadajo med najpogostejše povzročitelje bolezni rastlin. Virus Y krompirja spada v rod *Potyvirus* in je v zadnjih letih postal velika grožnja gospodarstvu, saj okužuje rastline iz družine razhudnikovk (*Solanaceae*) v katero spadajo tudi prehransko pomembne rastline kot sta krompir in paradižnik (I. Mavrič Pleško ur., 2016, str. 20).

Julija 2021 so v bližini Nacionalnega inštituta za biologijo v Ljubljani na rastlini regačica (*Aegopodium podagraria*) opazili virusno okužbo. S tehnologijo visoko zmogljivega sekvenciranja, so potrdili, da gre za nov virus in ga uvrstili v rod *Potyvirus*, družina *Potyviridae*. Pri izdelavi raziskovalne naloge nas je zanimalo ali bo imel nov virus nekatere podobne lastnosti kot virus Y krompirja (PVY, *Potyvirus*, *Potyviridae*) in bi lahko okužil testno rastlino *Nicotiana benthamiana*, ki je zelo dovzetna za okužbe z virusi. *N. benthamiana* prav tako kot krompir, spada v družino razhudnikovk (*Solanaceae*).

Pri raziskovanju smo uporabili 20 osebkov testnih rastlin *N. benthamiana* in jih okužili z različnimi kombinacijami teh dveh virusov. Poslužili smo se mehanske inokulacije in opazovali razvoj bolezenskih znamenj ter spremljali parametre kot so višina rastlin, število listov in masa korenin. Okužene rastline z virusom se namreč tudi na videz ločijo od zdravih rastlin, saj razvijejo določene bolezenske znake, kot so: nižja rast rastlin, pegasti, rumeno obarvani listi, manjše število listov in slabše razvit koreninski sistem. 29 dni po inokulaciji smo rastline, ki so kazale bolezenske znake, testirali s hitrimi testi za zaznavo virusa PVY, nato pa smo na vseh rastlinah izvedli RT-PCR v realnem času za PVY oz. RT-PCR in gelsko elektroforezo za nov virus iz rodu *Potyvirus*. Nekaj rastlin se je okužilo z virusom PVY, nov virus pa ni okužil nobene rastline.

Naši rezultati kažejo na to, da novi virus iz rodu *Potyvirus* ne okužuje testne rastline *Nicotiana benthamiana*. Menimo, da bi bilo treba opraviti nadaljnje raziskave in pri tem uporabiti še druge testne rastline in načine okuževanja, da bi lahko trdili, da nov virus za rastline iz družine *Solanaceae* resnično ni nevaren.

Summary

Plant viruses are among the most common agents of plant diseases. Potato virus Y (*Potyvirus* genus) has become a major threat to the economy in recent years as it infects plants from the *Solanaceae* family, which includes nutritionally important plants such as potatoes and tomatoes (I. Mavrič Pleško ur., 2016, pp. 20).

In July 2021, a new virus was discovered on a weed from the *Apiaceae* family near the National Institute of Biology in Ljubljana. Using high-throughput sequencing technology, it was classified in the *Potyvirus* genus, *Potyviridae* family. We were interested in finding out whether the new virus would have any similar features to the potato virus Y (PVY, *Potyvirus*, *Potyviridae*) and if it would infect the test plant *Nicotiana benthamiana*, which is very susceptible to virus infections and, like potatoes, belongs to the family *Solanaceae*. In the research, we used 20 specimens of *N. benthamiana* test plants and infected them with different combinations of these two viruses. We used mechanical inoculation and observed the development of disease symptoms, as well as measurements such as height of the plants, the number of leaves and mass of the roots. After four weeks we tested the plants that showed signs of disease with rapid tests for PVY detection, and later real-time RT-PCR was performed on all plants for PVY and RT-PCR with gel electrophoresis for a new virus from the genus *Potyvirus*. A few plants were infected with potato virus Y, but the new virus did not infect any plants.

Our results indicate that the new virus from the genus *Potyvirus* does not infect the test plant *Nicotiana benthamiana*. We believe that further research should be carried out in order to be able to claim that the virus is not dangerous for plants from the *Solanaceae* family, using other test plants and infection methods.

Zahvala

Iskreno se zahvaljujemo najini glavni mentorici dr. Anji Pecman, ki naju je usmerjala skozi izvedbo praktičnega dela naloge in pisanja besedil. Kljub natrpanemu urniku, se ji je časovno uspelo prilagoditi najinim prihodom na inštitut z javnim prevozom in vedno je bila na voljo za najina vprašanja. Zahvaljujemo se ji za izvedbo izolacije RNA ter analiz RT-PCR in RT-qPCR. S svojo zagnanostjo nama je pokazala čar raziskovalnega dela, s katerim sva se v takšnem obsegu srečali prvič.

Zahvaljujemo se doc. dr. Denisu Kutnjaku, ki nama je omogočil delo v laboratorijih Nacionalnega inštituta za biologijo, uporabo rastlinskega materiala, potrebnih naprav ter pripomočkov. Veliko nama pomeni, da sva delo lahko opravljali poleti, čeprav je bil inštitut takrat ravno v fazah selitve v nove prostore. Zahvaljujemo se tudi dr. Marku Paulu Selda Rivarez (NIB, Ljubljana, Slovenija) za vzorec novega virusa iz rodu *Potyvirus* ter Zali Kogej (NIB, Ljubljana, Slovenija) in Fanny Leleux (mag. študentka, Liege, Belgija) za pomoč pri laboratorijskem delu.

Najini somentorici, profesorici biologije Andreji Kerin, bi se radi zahvalili za skrbne opomnike, spodbudo in nasvete pri procesu izdelave naloge.

Nenazadnje zahvalo namenjava tudi profesorici kemije Magdaleni Klasinc, ki naju podpira že od samega začetka in naju je tudi motivirala, da sva začeli z delom.

Pojasnitev strokovnih izrazov in kratic

PVY	virus Y krompirja (angl. potato virus Y)
RT-PCR	obratna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo (reverse transcriptase – polymerase chain reaction)
RT-qPCR	obratna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo v realnem času
RNK	ribonukleinska kislina
MOCK	Označba, ki se uporablja za rastline namenjene negativni kontroli (okužene le s čistim fosfatnim pufrom)/ kontrolni inokulum.
ddH ₂ O	dvakrat destilirana voda
MW	molekulska masa (angl. molecular weight)
PVP	polivinilpirolidon (angl. Polyvinylpyrrolidone)
miliQ voda	voda prečiščena z laboratorijskim vodnim sistemom Millipore Milli-Q
elektroforeza	Metoda za določanje prisotnosti in velikosti DNA molekul v nekem vzorcu po pomnoževanju z metodo RT-PCR. Temelji na gibanju negativno nabitih fragmentov DNA različnih velikosti v električnem polju proti pozitivni anodi.

1. Uvod

V naravi so okužbe rastlin z rastlinskimi virusi pogoste. Virusi so nalezljivi patogeni, ki vstopajo v celice svojih gostiteljev in jih uporabijo za lastno razmnoževanje. Prenos virusov na rastline poteka na več načinov: z vegetativnim razmnoževanjem, s cvetnim prahom, s semeni, mehansko (z rastlinskim sokom) in s pomočjo prenašalcev. Rastlinski virusi močno vplivajo na rast in razvoj rastlin ter kakovost pridelka, s čimer povzročajo gospodarsko škodo (I. Mavrič Pleško ur., 2016, str. 17).

Eden izmed najbolj razširjenih rastlinskih virusov je virus krompirja Y in spada v rod *Potyvirus*. Prenaša se mehansko, s pomočjo listnih uši ali preko vegetativnega razmnoževanja. Okužuje širok spekter rastlin iz družine razhudnikovk (*Solanaceae*), v katero med drugimi spadajo krompir, paradižnik, paprika in jajčevac (T. Pršin, 2018, str. 1). Krompir je ena najpomembnejših kmetijskih in prehrabnih rastlin. Okužbe z različicami virusa krompirja Y lahko povzročijo od 10 do 90% izgube pridelka krompirja in hkrati vplivajo na njegovo slabšo kakovost. Najbolj invazivna različica je virus PVY^{NTN}, ki je v preteklosti popolnoma uničil slovensko sorto krompirja Igor. Proti virusom PVY in podobnim rastlinskim virusom lahko ukrepamo preventivno, s pridelavo odpornih sort krompirja, uporabo zdravih semen, pravočasnim odstranjevanjem okuženih rastlin in zatiranjem listnih uši (I. Mavrič Pleško ur., 2016, str. 20–22).

V Ljubljani so leta 2021, v bližini Nacionalnega inštituta za biologijo, opazili regačico (*Aegopodium podagraria*) iz družine kobulnic (*Apiaceae*). Rastlina je imela nenavadno rumeno obarvane liste. Znanstveniki istega inštituta so s tehnologijo visoko zmogljivega sekvenciranja analizirali vzorec in odkrili nov virus ki so ga uvrstili v rod *Potyvirus*, družina *Potyviridae*. Za do sedaj znane predstavnike tega rodu je značilno, da imajo zelo različen obseg gostiteljskih rastlin, med katerimi so tudi rastline iz družine razhudnikovk (*Solanaceae*). Virus prenašajo različni prenašalci.

Nov virus v literaturi še bil ni zabeležen. Odločili smo se, da opravimo prve korake k odkrivanju njegovih lastnosti. Primarno nas je zanimalo ali nov virus iz rodu *Potyvirus* okužuje testno rastlino *Nicotiana benthamiana* iz družine razhudnikovk (*Solanaceae*). *N. benthamiana*, je slabo odporna na virusne bolezni in je zato primerna za okuževanje z različnimi rastlinskimi virusi. Odločili smo se, da bomo okuževanje z novim virusom primerjali z okuževanjem z virusom Y krompirja. Virus Y krompirja prav tako kot novi virus spada v isti rod in je že dobro raziskan. Rezultate morebitnih okužb bi tako tudi lažje interpretirali. Zanimala nas je tudi učinkovitost okuževanja mešane okužbe virusa PVY z novim virusom iz rodu *Potyvirus*.

V primeru, da novi virus okužuje rastlino *Nicotiana benthamiana*, bi lahko škodoval tudi pomembnim kmetijskim pridelkom na primer krompirja, česar pa v tej raziskovalni nalogi nismo preučevali.

Vse faze raziskovanja so potekale na Nacionalnem inštitutu za biologijo (NIB), kjer smo izvajali postopke zasejevanja, izvajanja meritev, vzorčenja in testiranja s hitrimi testi. V zaključku so sodelavci iz NIB izvedli izolacijo RNA vzorcev rastlin ter postopka RT-PCR in RT-qPCR.

Naše hipoteze so:

1. Virus krompirja PVY bo okužil testne rastline *Nicotiana benthamiana*, kar so bo kazalo s tipičnimi znaki na listih.
2. Tudi nov virus iz rodu *Potyvirus* bo okužil testne rastline *N. benthamiana*. Okužba se bo navzven kazala s podobnimi bolezenskimi znaki kot okužba na regačici (*Aegopodium podagraria*) - torej z rumeno obarvanostjo listov.

3. **Hkratna Mešana okužba virusa PVY in novega virusa iz rodu *Potyvirus* bo rastline prizadela še bolj kot okužba le z virusom PVY.**
4. **Rastline, ki bodo prvotno okužene z virusom PVY, bodo ob naknadni okužbi z novim virusom iz rodu *Potyvirus* postale še bolj prizadete.**

2. Pregled objav

2.1. Rastlinski virusi

Virusi so preprosti nalezljivi patogeni, ki jih pogosto najdemo znotraj celic svojih gostiteljev. Najenostavnejši virusi so sestavljeni iz majhnega dela nukleinske kisline, obdanega z beljakovinsko ovojnico. Nukleinska kislina vsebuje genetske informacije, ki običajno določajo tri ali več beljakovin. Njihova reprodukcija je odvisna od celičnega mehanizma gostiteljev, saj se ne morejo razmnoževati sami od sebe.

Virus mora za uspešno okužbo najprej vstopiti v gostiteljsko celico. Ker virusi ne morejo sami prodreti kutikule in celične stene, v rastlinsko celico vstopajo preko ran ali pa s pomočjo prenašalca. Del virusa (virion) tako preide v citoplazmo celice pasivno skozi rane, ki nastanejo zaradi mehanske poškodbe povrhnjice in celične stene. V celici se beljakovinski plašč loči od dednega materiala. Z uporabo celičnih organelov gostiteljske celice, se dedni material prevede v virusne beljakovine, ki sestavijo nov virus. Iz primarno okuženih celic virus prehaja v druge celice preko plazmodezem. Te delujejo kot kanali, ki povezujejo citoplazmo dveh rastlinskih celic. Ko dosežejo prevodno tkivo, virusi po floemskih celicah potujejo po rastlini (I. Mavrič Pleško ur., 2016, str. 16). Virusi lahko okužijo celice bakterij, gliv, alg, rastlin in živali ter povzročijo bolezen (R. C. Gergerich, V. V. Dolja, 2006, G. L. Schumann, C. J. D'Arcy. 2006, str. 85–89).

Lizni in lizogeni cikli sta dve različni fazi v življenjskem ciklu nekaterih vrst virusov.

Lizni cikel vodi do uničenja gostiteljske celice. V tem ciklu virus prodre v celico, se razmnožuje in sintetizira nove virione, ki naposled povzročijo razpokanje (lizo) celice in sproščanje novih virusov. Ta proces se ponavlja z vsako okuženo celico, kar povzroči hitro širjenje virusa po gostiteljskem organizmu. Lizogeni cikel pa vodi do vgradnje virusne DNA v genom gostiteljske celice. V tem ciklu virus ne uniči celice takoj, ampak se njegova DNA integrira v DNA gostiteljske celice. Virusna DNA se lahko v tem stanju replicira skupaj z DNA gostiteljske celice, dokler se ne sproži litični cikel, ki povzroči sproščanje novih virusov (*The Viral Life Cycle*, s. a. – internetni vir 2).

O nastanku virusov obstajata dve hipotezi. Virusi bi lahko bili potomci genov, ki so iz gostiteljskih celic prešli na prosto. Nekateri virologi pa verjamejo, da so se razvili kot neodvisne oblike življenja, verjetno še pred drugimi oblikami (G. L. Schumann, C. J. D'Arcy, 2006, str. 85).

Poznamo skoraj 1000 vrst rastlinskih virusov. Bolezenska znamenja, ki jih povzročajo so lahko precej izrazita in značilna za določen virus, v nekaterih primerih pa se bolezenska znamenja sploh ne izrazijo. Praviloma so bolezenska znamenja sistemska in prizadanejo večji del rastline. Med najpogostejšimi znamenji okužb je pritlikavost rastlin, nerazvitost in rumeno obarvanje listov (kloroza), pegavost listov ter slabše razvit koreninski sistem (G. L. Schumann, C. J. D'Arcy. 2006, str. 89–90).

Rastlinski virusi povzročajo znatne gospodarske izgube kmetijskih pridelkov in so grožnja trajnostnemu kmetijstvu. Pojavnost novih virusnih bolezni je predvsem posledica mednarodne

trgovine, podnebnih sprememb in sposobnost virusov za hitro spreminjanje virusnega genoma. (L. Rubio, L. Galipienso, I. Ferriol, 2020).

2.2. PVY

Virus Y krompirja (PVY) je rastlinski virus, ki spada v rod *Potyvirus* družine *Potyviridae*. (I. Mavrič Pleško ur., 2016, str. 44). Znan je predvsem po tem, da okužuje rastline krompirja (*Solanum tuberosum*), vendar lahko okuži tudi številne druge rastline iz družine *Solanaceae*, med katere sodijo jajčevci (*S. melongena*), paradižnik (*S. lycopersicum*), paprika (*Capsicum annuum*) tobak (*Nicotiana tabacum*) ter vrsto *Nicotiana benthamiana* (M. Hollings, A. A. Brunt, 1981; B. V. Elsevier, 2023 - internetni vir 5). Vsebuje enoverižno linearno RNA (vir: C. Kerlan, 2006).

Virus PVY se z ene rastline na drugo prenaša z listnimi ušmi, ki se hranijo z rastlinskim sokom. Ko se listna uš hrani z okuženo rastlino, se virus prilepi na bodalo/sesalo ter prenese na naslednjo rastlino, s katero se uš hrani. Ko virus PVY vstopi v rastlino, okuži celice rastline in se začne razmnoževati. Virus se v rastlini s pomočjo pomožnih proteinov (HC) širi od celice do celice in se premika od mesta okužbe do žilnega tkiva rastline (I. Mavrič Pleško, S. Širca ur., 2016, str. 15). Pomožni proteini poškodujejo celično membrano, da lahko virus vstopi v celico. Možna je tudi inokulacija preko poškodovanih plazmodezem (C. Kerlan, 2006). Virus se prek gomoljev prenaša tudi z materinske na hčerinsko rastlino (I. Mavrič Pleško, S. Širca ur., 2016, str. 14).

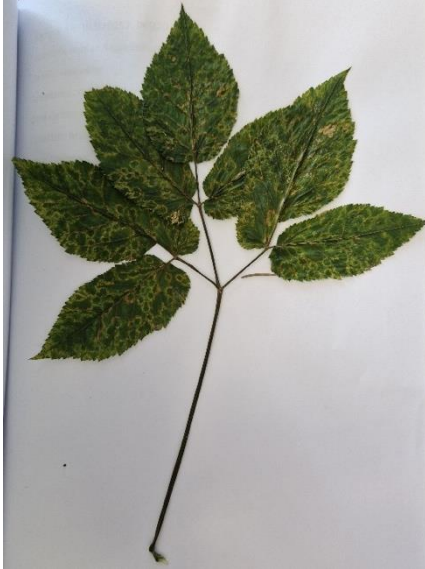
Bolezenska znamenja okužbe na krompirju z virusom PVY so odvisna od sorte krompirja in različice virusa PVY. Tipična bolezenska znamenja vključujejo pegavost in izkrivljenost listov, zaostajanje v rasti, slabše razvit koreninski sistem, nižjo rast rastlin in zmanjšan donos pridelkov. V hujših primerih lahko virus PVY povzroči odmiranje rastlin krompirja. Virus PVY lahko povzroči tudi kozmetične napake krompirja, kot so izbokline ali obročki na površini gomoljev, kar zniža njihovo tržnost. Virus PVY je eden najbolj razširjenih in gospodarsko pomembnih rastlinskih virusov in je glavni vzrok izgube pridelka krompirja po vsem svetu. Rastlinskih okužb z virusom PVY ne moremo zdraviti. Preventiva je tako najučinkovitejši način za nadzor širjenja virusa. To je mogoče doseči z uporabo odpornih sort krompirja in drugih rastlin družine razhudnikovk (*Solanaceae*) ter z nadzorom populacije listnih uši. V Sloveniji je v preteklosti zaradi okužb z virusom PVY popolnoma izginila sorta krompirja Igor. Nadomestile so jo nove sorte krompirja, ki so na ta virus odporne, čeprav naše okolje za semensko pridelavo krompirja ni najprimernejše. Pojavlja se veliko vrst listnih uši, ki zgodaj med rastjo prenašajo viruse in širijo okužbo (I. Mavrič Pleško ur., 2016, str. 20–22).

Poznamo več različic virusa Y krompirja. V preteklosti je največje zmanjšanje pridelka povzročala različica PVY^O, ki je bila razširjena po celem svetu. Virus PVY^N je bil prisoten v Evropi, Severni ter Južni Ameriki in v delih Afrike, vendar ni imel takšnega vpliva na pridelek, saj je na rastlinah povzročal le blažja znamenja. V Evropi so leta 1984 odkrili zelo agresivno različico virusa PVY^{NTN}, ki je še danes odgovorna za velike izgube pridelka. Okužba povzroča pojavljanje nekrotičnih znakov na različnih delih rastline. Zaradi okužbe gomoljev pa krompir ni primeren za trženje (I. Mavrič Pleško ur., 2016, str. 20).

2.3. Nov virus iz rodu *Potyvirus*

Julija 2021 je takratni doktorski študent, Dr. Mark Paul Selda Rivarez, v bližini Nacionalnega inštituta za biologijo v Ljubljani, opazil okuženo rastlino, regačico (*Aegopodium podagraria*) iz družine kobulnic (*Apiaceae*) (Slika 1 in 2). Na listih je bilo prisotno rumeno krožno obarvanje, kar je nakazovalo na okužbo z rastlinskim virusom. Znanstveniki NIB so sekvencirali celoten

genom najdenega virusa in ga primerjali na NCBI databazi z BLASTX (primerjava podobnosti proti proteinom) in BLASTN (primerjava podobnosti proti nukleotidom). Rezultati so kazali, da gre za nov virus iz rodu *Potyvirus*. Glede na kriterije ICTV (Mednarodni odbor za taksonomijo virusov) so nov virus iz rodu *Potyvirus* uvrstili v družino *Potyviridae*. (A. Kazuko Inoue-Nagata, 2022)



Slika 1: okužena regačica primer 1, avtor: dr. Mark Paul Selda Rivarez



Slika 2: okužena regačica primer 2, avtor: dr. Mark Paul Selda Rivarez

2.4. *Nicotiana benthamiana*

Nicotiana benthamiana je avtohtona avstralska vrsta iz agronomsko pomembne družine razhudnikovk (*Solanaceae*), ki vsebuje več kot 3000 vrst. Razhudnikovke imajo velik gospodarski pomen, saj se uporabljajo kot okrasne rastline (petunija), sestavine zdravil (tobak, mandragora, belladonna, jimsonweed) in predstavljajo pomembne pridelke v prehrani kot so krompir, paradižnik, paprika. Nekatere vrste lahko vsebujejo strupene alkaloidne. Znana prehranska rastlina krompir (*Solanum tuberosum*) prav tako vsebuje glikoalkaloide, ki pa se pri visokih temperaturah delno uničijo (B. V. Elsevier, 2023 – internetni vir 5).

Nicotiana benthamiana ima robustno in pokončno rast, z dolgimi, tankimi stebli in velikimi jajčastimi listi. Listi so običajno temno zelene barve in sijočega videza. Cvetovi so majhni, s petimi venčnimi listi in cevaste oblike ter so običajno bele ali blede rumene barve. Je enoletna rastlina, ki zraste do višine približno 50 cm.

Nicotiana benthamiana se pogosto uporablja v znanstvenih raziskavah, ker je hitro rastoča rastlina, ki jo je enostavno gensko manipulirati. Dovzetna je za okužbo s številnimi različnimi virusi in drugimi patogeni. Predstavlja modelni organizem za preučevanje interakcij med rastlino in patogenom, predvsem pri preučevanju mehanizmov na molekularni ravni. Poleg tega se *N. benthamiana* uporablja tudi pri proizvodnji farmacevtskih beljakovin in drugih bioproizvodov, ki so sestavni del nekaterih cepiv in zdravil proti virusnim boleznim. *N. benthamiana* ima velik, lahko dostopen in raziskan genom. Zaradi kratkega življenjskega cikla, je dobra izbira za študije preučevanja izražanja genov. Rastlina je tudi široko dostopna in relativno enostavna za gojenje in vzdrževanje v laboratoriju (*Nicotiana* (*Nicotiana benthamiana*), s. a. – internetni vir 8).

3. Teorija uporabljenih raziskovalnih metod

3.1. Mehanska inokulacija

Za okuževanje testih rastlin smo uporabili metodo mehanske inokulacije, saj je ena izmed metod okuževanja s katero simuliramo pike žuželk. Virusi iz rodu *Potyvirus* se med drugim prenašajo prek listnih uši (M. Hollings, A. A. Brunt, 1981). Listne uši se hitro razmnožujejo in učinkovito prenašajo viruse od rastline do rastline (I. Mavrič Pleško ur., 2016, str. 22).

Pri postopku mehanske inokulacije izbran list najprej posujemo z abrazivom, nato dodamo inokulum in podrgnemo po celotni površini, vendar pazimo, da tkiva ne poškodujemo preveč. S tem povzročimo poškodbe površinskih celic, virusu v inokulumu pa je omogočen dostop do rastlinskih celic. (R. Hull, 2009) Za pripravo inokuluma uporabimo okuženi rastlinski material, na primer mlade liste z očitnimi bolezenskimi znamenji. Rastlinski material zmešamo s fosfatnim pufrom (pH 7,0) v razmerju med 1:5 in 1:10 (J. Dijkstra, C. P. De Jager, 1998, str. 5).

3.2. RT-qPCR in RT-PCR

Metodo obratnega prepisovanja in PCR v realnem času (RT-qPCR) smo uporabili za natančno določanje količine virusne RNA v vzorcih rastlin, okuženih z virusom PVY. Metoda je zelo občutljiva in temelji na pomnoževanju specifičnega odseka nukleotidnega zaporedja virusnega genoma, pri čemer pride v vsakem ciklu do podvojevanja produkta (T. Pršin, 2018, str. 23). Za razliko od klasičnega PCR, pri katerem rezultate pridobimo šele na koncu postopka, lahko pri tem postopku natančno vrednost pomnožene RNA odčitamo že med eksponentno fazo (fazo pomnoževanja). Po več ciklih lahko fluorescenca pomnoževanega tarčnega odseka RNA preseže prag zaznave, pri čemer velja, da manjše število ciklov pomeni večjo količino virusne RNA (M. Filion. Ur., 2012, str. 3–11).

Za detekcijo novega virusa iz rodu *Potyvirus* smo uporabili metodo RT-PCR, pri kateri tarčno molekulo RNA pomnožimo do te mere, da jo je mogoče uporabiti pri gelski elektroforezi. Ta postopek omogoča razlikovanje fragmentov cDNA na podlagi dolžine molekul. Ko vzorce naneseemo na gel in skozi gel spustimo električni tok, negativno nabita cDNA migrira proti pozitivni strani gela. Krajši deli molekul potujejo z večjo hitrostjo, zato se fragmenti razporedijo po velikosti. Skozi gel spustimo tudi pozitivno kontrolo virusa. Če opazimo ujemanje v velikosti fragmenta na gelu med vzorci in pozitivno kontrolo, pomeni, da vzorec vsebuje tarčno virusno RNA (*What is gel electrophoresis?* 2021 – internetni vir 10).

4. Metode dela in postopek

Metode:

- Okuževanje – inokulacija
- Merjenje višine
- Štetje listov
- Tehtanje mase korenin in nadzemeljskega dela rastlin
- Testiranje rastlin na virus PVY s hitrimi testi
- RNA izolacija
- Metoda RT-qPCR za zaznavanje virusa PVY

- RT-PCR in gelska elektroforeza za zaznavanje novega virusa iz rodu *Potyvirus*

4.1. Zasaditev in selekcija rastlin

Iz zbirke Nacionalnega inštituta za biologijo smo zasadili poganjke rastlin *N. benthamiana*. 24 sadik, ki so si bile na videz čim bolj podobne, smo presadili v posamezne lončke. Sadike smo zalili in premestili v rastno komoro s pogoji $21 \pm 2^\circ\text{C}$ in 70 % relativni zračni vlagi. Rastline smo redno zalivali z vodovodno vodo. Po 13 dnevih rasti smo izločili štiri najbolj odstopajoče osebkke, pri čemer smo upoštevali višino in število listov. Rastline smo razdelili v pet skupin po štiri na ločene pladnje in skupine označili s črkami od A do E.

4.2. Priprava inokuluma in okuževanje

13 dni od začetka poskusa smo rastline okuževali z metodo mehanske inokulacije. Pripravili smo dve vrsti inokuluma, enega za okužbo z virusom PVY in enega za okužbo z novim virusom iz rodu *Potyvirus*.

Inokulume za okuževanje smo pripravili z 0,02 M fosfatnim pufrom z 2 % PVP.

Fosfatni pufer (10x)	20 ml
Polyvinilpyrrolidone (PVP; MW 10.000)	2,0 g
ddH ₂ O	80 ml

Odmerili smo 2 x 10 ml fosfatnega pufera v merilnem valju, ga nalili v čašo, dodali 2 g PVP in vse skupaj zmešali z magnetnim mešalom. Zmes smo prelili v bučko in dodali 80 ml miliQ vode. Rastlinski material smo uporabili v razmerju 1:10 s fosfatnim pufrom. Liste vzorca z bolezenskimi znamenji smo natehtali, strli v terilnici in jim dodali pufer.

Inokulum PVY: 0,15 g rastlinskega materiala (različica PVY^{NTN}), 1,5 mL pufera.

Inokulum novega virusa iz rodu Potyvirus: 0,1g rastlinskega materiala, 1,0 mL pufera.

Inokulum PVY smo razdelili v dve epruveti (0,075 g rastlinskega materiala in 0,75 mL pufera), celotno količino inokuluma novega virusa pa v eno epruveto. Homogenizacijo inokulumov smo izvedli v napravi FastPrep (20 sekund, 4 m/s) in nato izvedli še centrifugiranje ter tako pripravljene inokulume začasno shranili na led.

Vsako izmed skupin testnih rastlin smo okužili z drugačno kombinacijo pripravljenih inokulumov. Skupino A smo uporabili kot negativno kontrolo (MOCK), ostale pa smo okuževali z virusom PVY oziroma z novim virusom iz rodu *Potyvirus*.

A – kontrola (2 kapljici pufera na en označen list) – MOCK

B – (PVY)

C – (novi virus iz rodu *Potyvirus*)

D – (PVY in novi virus iz rodu *Potyvirus* v razmerju 1:1)

E – (PVY in dodatno okuževanje z novim virusom iz rodu *Potyvirus* čez 7 dni – priprava inokuluma po enakem postopku)

Prva dva prava lista (ko rastlina vzklije ima najprej klične liste, kasneje pa prave) na posamezni rastlini smo prebodli in ju s tem označili. Vsak označen list smo posuli s karborundum in nanj kanili dve kapljici inokuluma. Inokulum smo razmazali po listih ter nekajkrat s prstom podrgnili po površini lista. Zaradi karborunda smo povzročili nastanek drobnih ran, skozi katere so virusi

lahko prodri v celice. Tako smo inokulirali vse s karborundom naprašene liste. Po sedmih minutah smo inokulum sprali z listov pod tankim curkom vode z uporabo puhalke.

Z negativnimi kontrolami smo ravnali enako kot je zgoraj opisano, le da smo za inokulum uporabili samo pufer namesto vzorca.

Po 7 dneh smo skupino E dodatno okuževali z novim virusom iz rodu *Potyvirus*, pri čemer smo inokulum pripravili po enakem postopku. Rastline smo pospravili v rastno komoro, pri čemer smo pazili, da je bila negativna kontrola fizično ločena od ostalih skupin, medtem ko so bile ostale skupine osebkov na isti polici. Zavedali smo se potencialne navzkrižne kontaminacije med rastlinami okuženimi z virusom PVY, vendar le ta ni bila bistvena za našo hipotezo.

4.3. Meritve in opazovanje bolezenskih znamenj

Meritve rastlin smo izvajali 1-krat tedensko, prvo na dan inokulacije (20.6.2022). Izvedli smo pet meritev. Zbirali smo podatke o višini rastlin in številu listov, poleg tega pa smo skupine tudi fotografirali. Pozorni smo bili na bolezenske znake na listih (sprememba barve, pojav pegavosti, zvijanje listov) ter preostala možna bolezenska znamenja kot je odstopanje v rasti posamezne rastline.

4.4. Vzorčenje listov in tehtanje mase korenin in nadzemeljskega dela

29 dni po mehanski inokulaciji smo pričeli z vzorčenjem listov. Začeli smo z negativno kontrolo (MOCK), da bi preprečili navzkrižno kontaminacijo. Vsako rastlino posebej smo vzorčili dvakrat. Uporabljali smo mikrocentrifugirke (1,5 mL Eppendorf tube), s katerimi smo liste vzorčili v obliki diskov. Z mikrocentrifugirko smo zaobjeli list z obeh strani in jo zaprli. Tako smo izrezali del lista v obliki diska, ki je ostal v tubi. Postopek smo na isti rastlini ponovili še petkrat, pri čemer smo vzorčili različne liste. Ko je bilo v eni tubi 6 diskov materiala, smo postopek ponovili še z drugo tubo.

Po končanem vzorčenju smo epruvete temeljito očistili dvakrat z etanolom, enkrat z razkuževalnimi robčki za odstranjevanje RNA in na koncu z vodo. Tako smo pridobili 40 vzorcev, ki smo jih dali na led in pospravili v hladilnik na -80°C.

Po meritvah višine in števila listov smo rastline previdno vzeli iz zemlje in pri tem pazili, da se korenine ne pretrgajo. Koreninski del smo očistili z vodo, da smo odstranili vso zemljo in ga posušili z robčki. Nato smo rastlino prerezali na stiku koreninskega in nadzemeljskega dela ter vsakega posebej stehtali.

4.5. Testiranje rastlin na PVY s hitrimi testi

S hitrimi testi smo testirali vse rastline iz skupin D (PVY + nov virus) in E (PVY + nov virus po 7 dneh).

Hitri test smo izvajali s Pocket Diagnostic® Potato virus Y (internetni vir 11). Za rastlinski material smo uporabili 25 mm² dele listov. V epruvete iz Pocket Diagnostic paketa smo dodali rastlinski material in epruveto stresali 30 sekund, da je rastlinski material razpadel na manjše delce. Počakali smo 5 minut, nato pa na hitri test kanili dve do tri kapljice vzorca. Po 10 minutah smo preverili rezultate.

4.6. RNA izolacija in PCR testiranje

Sodelavci iz Nacionalnega inštituta za biologijo so izvedli RNA izolacijo vzorčenega rastlinskega materiala. Diske smo prenesli v za to namenjene tube in dodali lizni pufer. Zaradi možnosti izbrisa oznak smo tube označili dvakrat. Rastlinski material smo homogenizirali v napravi FastPrep, ga prestavili v inkubator in na koncu centrifugirali. Protokol izolacije je bil narejen po navodilih proizvajalca Qiagen: Rneasy Plant Mini Kit (internetni vir 12).

Izolirano RNA smo uporabili pri postopku RT-PCR in RT-qPCR. Pri vsaki izolaciji smo po istem postopku izvedli tudi negativno kontrolo izolacije (NKI), le da ta ni vsebovala rastlinskega materiala. Z negativno kontrolo izolacije lahko ugotovimo morebitne kontaminacije med postopkom izolacije, vključno s kontaminacijo kemikalij in opreme.

RT-PCR je bil narejen po navodilih proizvajalca QIAGEN: OneStep RT-PCR Kit (internetni vir 13).

RT-QPCR pa po navodilih proizvajalca Applied Biosystems™: AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Reagents (internetni vir 14).

5. Rezultati

5.1. Primerjalne slike testnih rastlin

Slike 3 – 21 so posnete 42 dan od zasaditve rastlin. Vsaka slika je sestavljena iz dveh posnetkov: posnetek na levi strani je slika vsake rastline iz strani, posnetek na desni strani, pa je slika vsake rastline od zgoraj.



Slika 4: rastlina A1 (MOCK)



Slika 3: rastlina A2 (MOCK)



Slika 6: rastlina A3 (MOCK)



Slika 5: rastlina A4 (MOCK)



Slika 8: rastlina B1 (PVY)



Slika 7: rastlina B2 (PVY)



Slika 10: rastlina B3 (PVY)



Slika 9: rastlina B4 (PVY)



Slika 11: rastlina C1 (nov virus iz rodu Potyvirus)



Slika 12: rastlina C2 (nov virus iz rodu Potyvirus)



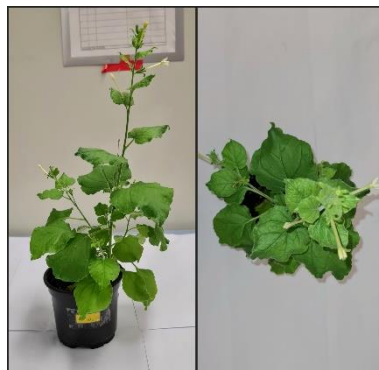
Slika 13: rastlina C3 (nov virus iz rodu Potyvirus)



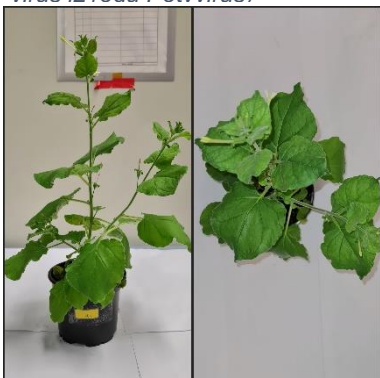
Slika 14: rastlina C4 (nov virus iz rodu Potyvirus)



Slika 15: rastlina D1 (PVY + nov virus iz rodu Potyvirus)



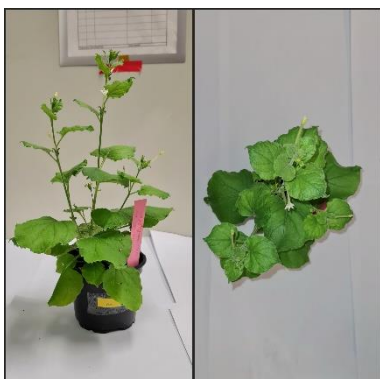
Slika 16: rastlina D2 (PVY + nov virus iz rodu Potyvirus)



Slika 18: rastlina D3 (PVY + nov virus iz rodu Potyvirus)



Slika 17: rastlina D4 (PVY + nov virus iz rodu Potyvirus)



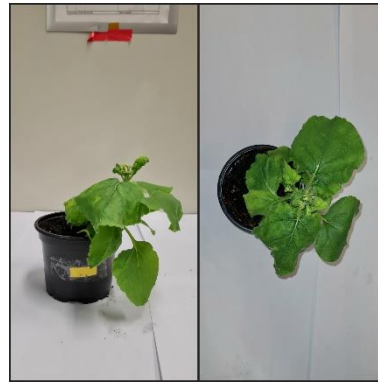
Slika 20: rastlina E1 (PVY + nov virus iz rodu Potyvirus po 7 dneih)



Slika 19: rastlina E2 (PVY + nov virus iz rodu Potyvirus po 7 dneih)



Slika 22: rastlina E3 (PVY + nov virus iz rodu Potyvirus po 7 dneh)



Slika 21: rastlina E4 (PVY + nov virus iz rodu Potyvirus po 7 dneh)

5.2. Primerjava višine in števila listov v posamezni skupini

Skupina A (MOCK)

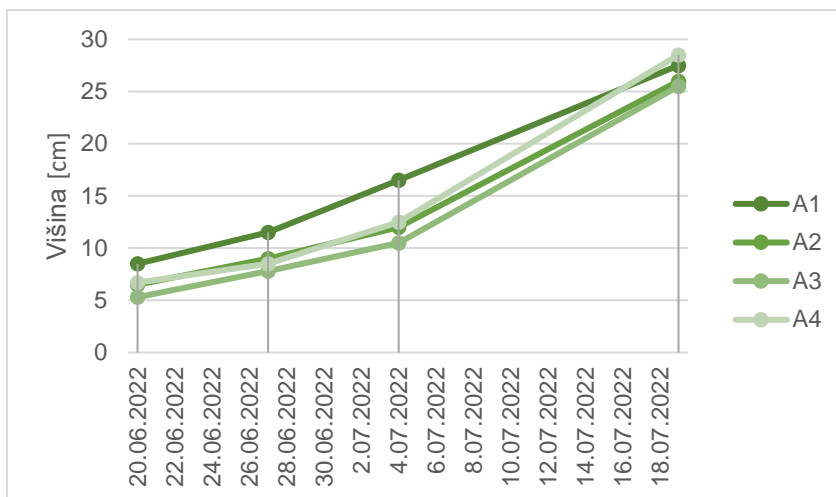
Negativna kontrola (MOCK) je pri merjenju višine pokazala pričakovane rezultate, saj med posameznimi rastlinami ni bilo nobenih odstopanj – osebki so tekom meritev rasli s podobno dinamiko. (Tabela 1, Graf 1). Prav tako se je ustrezno povečevalo število listov (Tabela 2, Graf 2). Na zelenih delih rastlin nismo opazili nobenih sprememb, ki bi nakazovale na okužbo s katerim od rastlinskih virusov.

A (MOCK) višina [cm]				
Datum	A1	A2	A3	A4
20.06.2022	8,5	6,5	5,3	6,7
27.06.2022	11,5	9	7,8	8,5
4.07.2022	16,5	12	10,5	12,5
19.07.2022	27,5	26	25,5	28,5

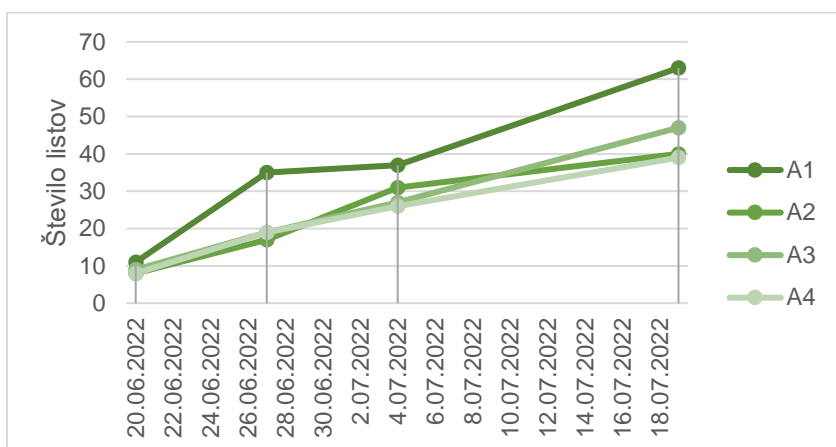
Tabela 1: Skupina A (MOCK) višina

A (MOCK) število listov				
Datum	A1	A2	A3	A4
20.06.2022	11	8	9	8
27.06.2022	35	17	19	19
4.07.2022	37	31	27	26
19.07.2022	63	40	47	39

Tabela 2: Skupina A (MOCK) število listov



Graf 1: višina skupine A (MOCK)



Graf 2: Št. listov skupine A (MOCK)

Skupina B (PVY)

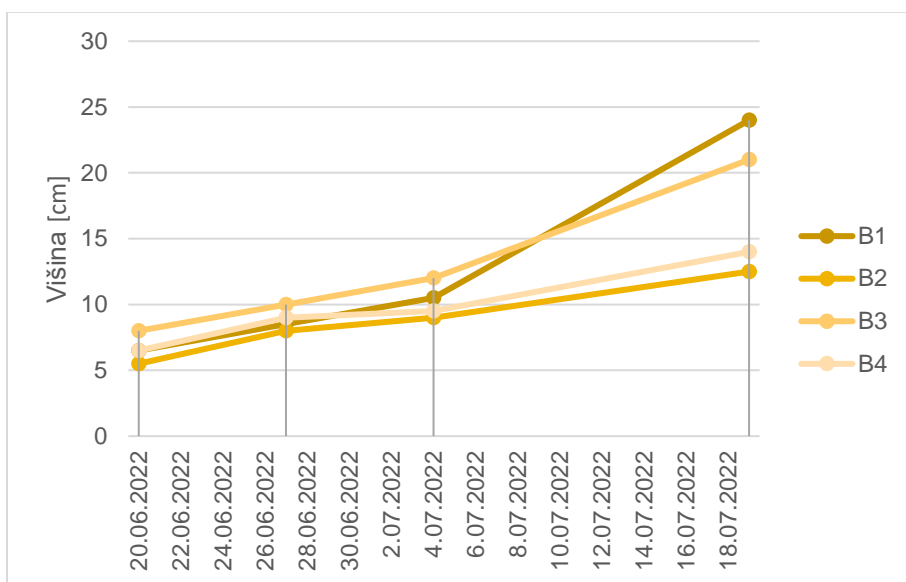
Skupino B smo okuževali z virusom PVY. 29 po inokulaciji smo opazili velika odstopanja v višini osebkov B2 in B4 (Tabela 3) ter manjše število listov osebka B4 (Tabela 4) v primerjavi z ostalimi rastlinami v tej skupini. Pri rastlinah B2 in B4 je bilo mogoče opaziti pritlikavost ter rumeno obarvanje na listih, kar nakazuje na okužbo s PVY. Osebek B1 je bil ob končnih meritvah najvišji in je imel največ listov (Grafa 3 in 4). Število listov pri osebku B3 je bilo najbolj primerljivo z rastlino B2 (Tabela 4). Rastlina B3 je imela liste večinoma razvite samo v spodnjem delu, v čemer se je razlikovala od ostalih rastlin brez bolezenskih znamenj, ki so imele zdrave liste razporejene po celotnem stebelu.

B (PVY) višina [cm]				
Datum	B1	B2	B3	B4
20.06.2022	6,5	5,5	8	6,5
27.06.2022	8,5	8	10	9
4.07.2022	10,5	9	12	9,5
19.07.2022	24	12,5	21	14

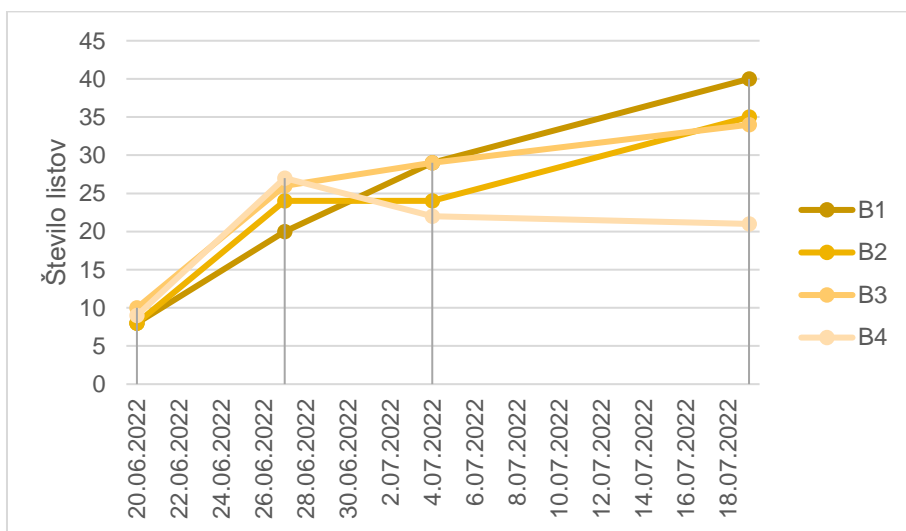
Tabela 3: Skupina B (PVY) višina

B (PVY) število listov				
Datum	B1	B2	B3	B4
20.06.2022	8	8	10	9
27.06.2022	20	24	26	27
4.07.2022	29	24	29	22
19.07.2022	40	35	34	21

Tabela 4: Skupina B (PVY) število listov



Graf 3: Višina skupine B (PVY)



Graf 4: Št. listov skupine B (PVY)

Skupina C (nov virus iz rodu *Potyvirus*)

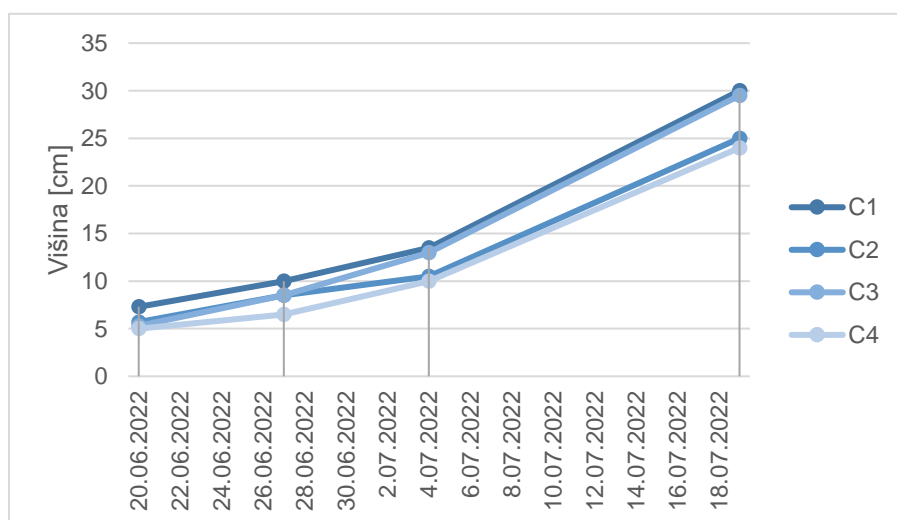
Skupino C smo okuževali z novim virusom iz rodu *Potyvirus*. Višina rastlin in število listov na posameznih rastlinah ni odstopalo. (Tabeli 5 in 6; Grafa 5 in 6). Zeleni deli rastline pa niso kazali nobenih bolezenskih znamenj.

C (nov virus iz rodu <i>Potyvirus</i>) višina [cm]				
Datum	C1	C2	C3	C4
20.06.2022	7,3	5,7	5,3	5
27.06.2022	10	8,5	8,5	6,5
4.07.2022	13,5	10,5	13	10
19.07.2022	30	25	29,5	24

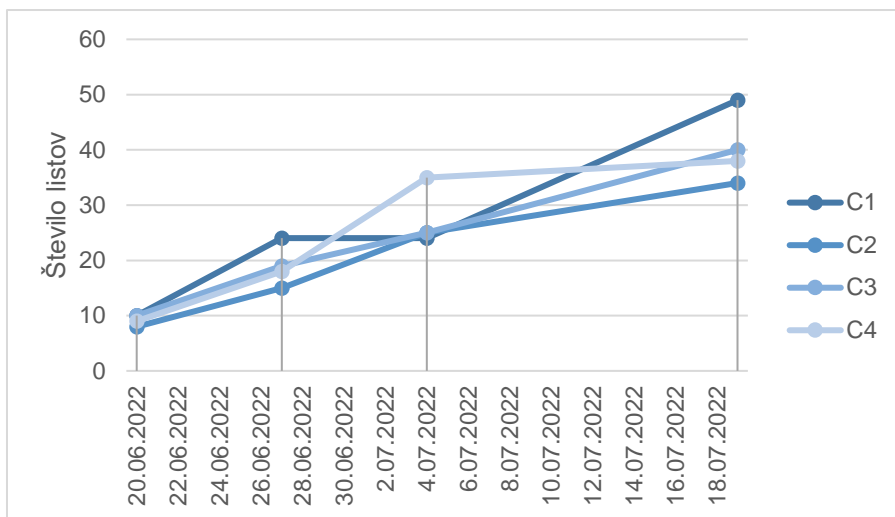
Tabela 5: Skupina C (nov virus iz rodu *Potyvirus*) višina

C (nov virus iz rodu <i>Potyvirus</i>) število listov				
Datum	C1	C2	C3	C4
20.06.2022	10	8	10	9
27.06.2022	24	15	19	18
4.07.2022	24	25	25	35
19.07.2022	49	34	40	38

Tabela 6: Skupina C (nov virus iz rodu *Potyvirus*) število listov



Graf 5: Višina skupine C (nov virus iz rodu *Potyvirus*)



Graf 6: Št. listov skupine C (nov virus iz rodu *Potyvirus*)

Skupina D (PVY in nov virus iz rodu *Potyvirus*)

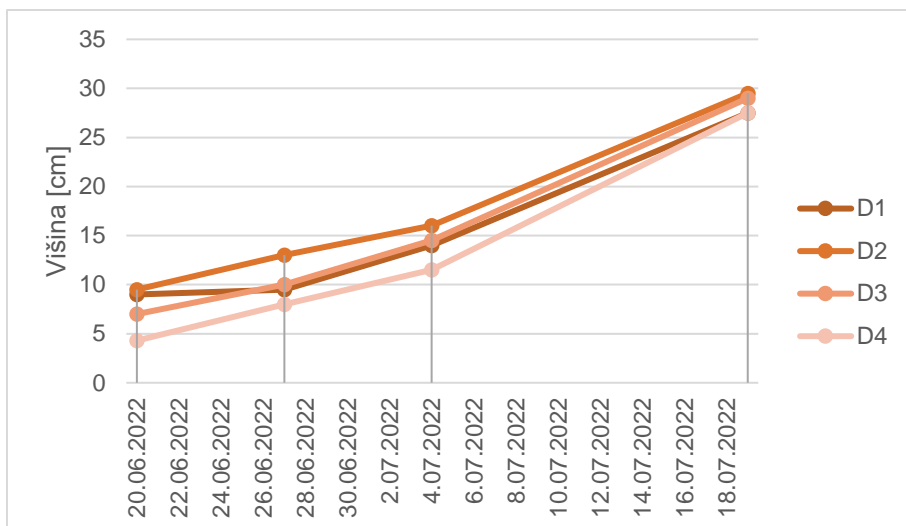
Skupino D smo hkrati okuževali z virusom PVY in novim virusom iz rodu *Potyvirus*. Vse štiri rastline te skupine so rastle enakomerno, prav tako se je pri vseh lepo povečevalo število listov (Tabeli 7 in 8; Grafa 7 in 8). Na nobeni ni bilo opaziti bolezenskih znamenj okužbe, s katerim od uporabljenih virusov.

D (PVY + nov virus iz rodu <i>Potyvirus</i>) višina [cm]				
Datum	D1	D2	D3	D4
20.06.2022	9	9,5	7	4,3
27.06.2022	9,5	13	10	8
4.07.2022	14	16	14,5	11,5
19.07.2022	27,5	29,5	29	27,5

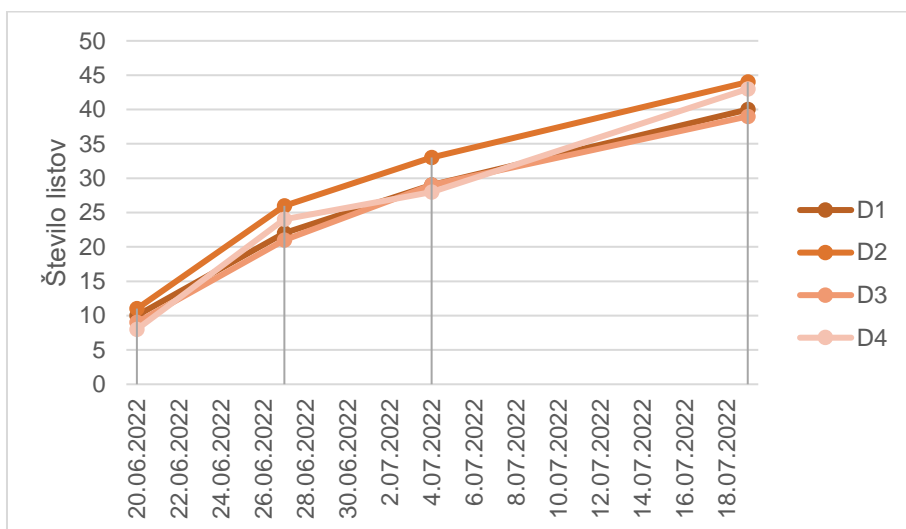
Tabela 7: Skupina D (PVY + nov virus iz rodu *Potyvirus*) višina

D (PVY + nov virus iz rodu <i>Potyvirus</i>) število listov				
Datum	D1	D2	D3	D4
20.06.2022	10	11	9	8
27.06.2022	22	26	21	24
4.07.2022	29	33	29	28
19.07.2022	40	44	39	43

Tabela 8: Skupina D (PVY + nov virus iz rodu *Potyvirus*) število listov



Graf 7: Višina skupine D (PVY + nov virus iz rodu Potyvirus)



Graf 8: Št. listov skupine D (PVY + nov virus iz rodu Potyvirus)

Skupina E (PVY + nov virus iz rodu Potyvirus po 7 dneh)

Skupino E smo najprej okuževali z virusom PVY, po enem tednu pa še z novim virusom iz rodu *Potyvirus*. Po štirih tednih sta bolezenska znamenja kazali rastlini E2 in E4. Od ostalih dveh rastlin sta bili precej nižji in imeli manj listov (Grafa 9 in 10). Ob zadnjem merjenju je bila višina osebkov E1 in E3 25 oziroma 30 cm, osebkov E2 in E4 pa le 11,5 oz. 10 cm (Tabela 9), torej sta bila za več kot polovico nižja. Če primerjamo število listov na pogled zdravih rastlin z okuženima, ugotovimo da sta imeli slednji zadnji teden meritev v povprečju 28 listov manj (Tabela 10). Listi pri osebkih E2 in E4 so bili tudi rumeni in zviti.

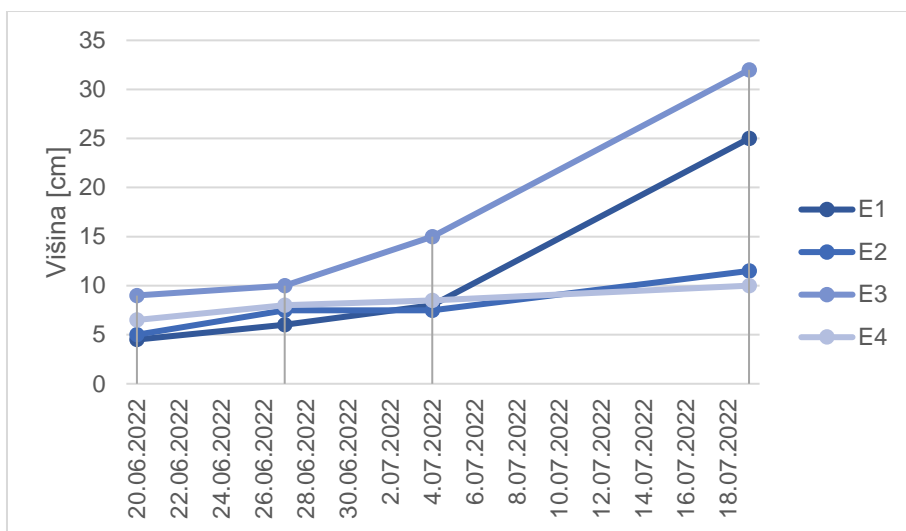
E (PVY + nov virus iz rodu <i>Potyvirus</i> po 7 dneh) višina [cm]				
Datum	E1	E2	E3	E4
20.06.2022	4,5	5	9	6,5
27.06.2022	6	7,5	10	8
4.07.2022	8	7,5	15	8,5
19.07.2022	25	11,5	32	10

Tabela 9: Skupina E (PVY + nov virus iz rodu Potyvirus po 7 dneh) višina

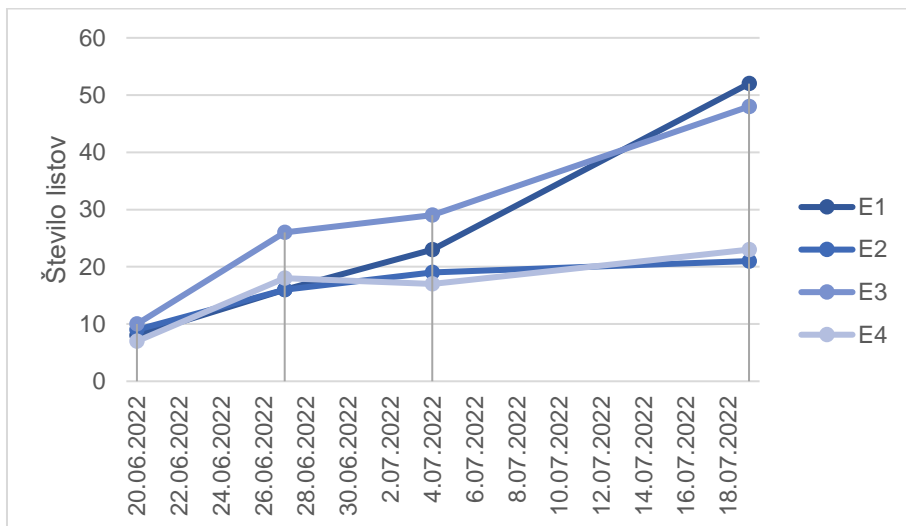
E (PVY + nov virus iz rodu Potyvirus po 7 dneh) število listov

Datum	E1	E2	E3	E4
20.06.2022	8	9	10	7
27.06.2022	16	16	26	18
4.07.2022	23	19	29	17
19.07.2022	52	21	48	23

Tabela 10: Skupina E (PVY + nov virus iz rodu Potyvirus po 7 dneh) število listov



Graf 9: Višina skupine E (PVY + nov virus iz rodu Potyvirus po 7 dneh)

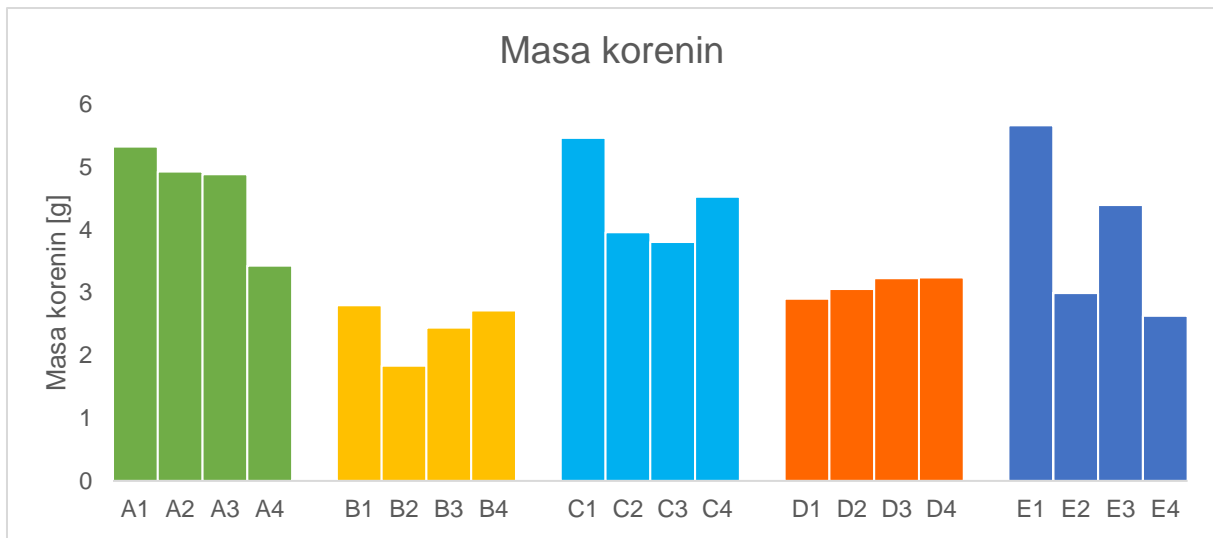


Graf 10: Št. listov skupine E (PVY + nov virus iz rodu Potyvirus po 7 dneh)

5.3. Primerjava mase korenin in nadzemeljskega dela rastlin

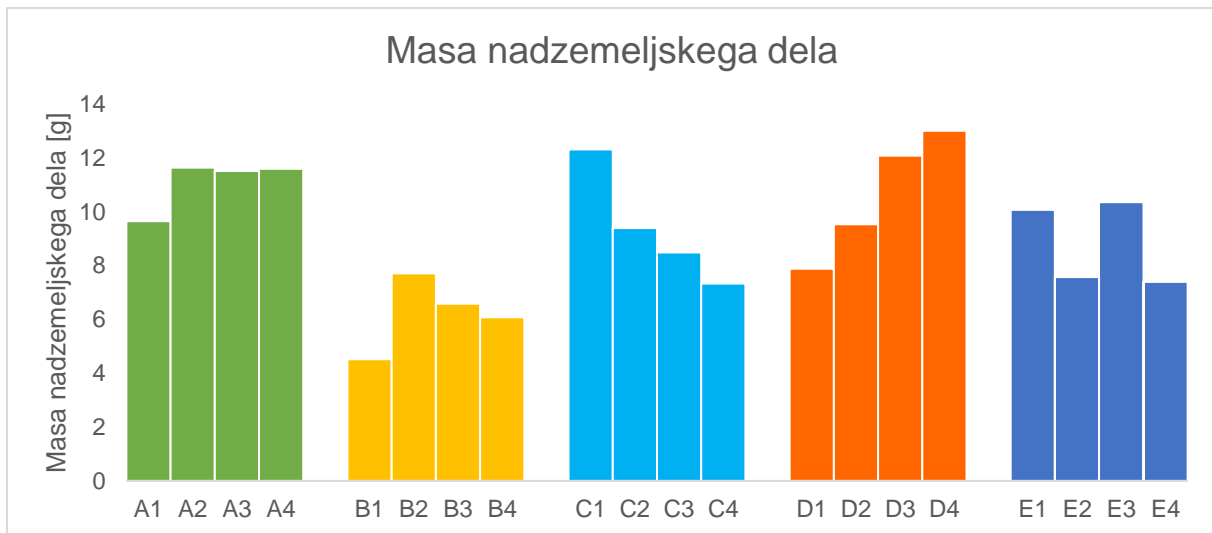
29 dni po okuževanju smo posameznim rastlinam izmerili maso korenin in nadzemeljskega dela

Rastline, ki niso kazale znakov okužbe, so imele praviloma večjo maso korenin. Največja odstopanja smo zaznali pri osebkih B2, E2 in E4, ki so kazali tudi številne druga bolezenska znamenja (Graf 11). Majhno maso tako korenin kot nadzemeljskega dela smo zabeležili pri osebkih B1 in B3, čeprav pri meritvah višine in števila listov nista kazala večjih odstopanj (Grafa 3 in 4). Manjšo maso korenin smo izmerili tudi pri D osebkih (Graf 11).



Graf 11: Masa korenin skupin A (MOCK), B (PVY), C (nov virus iz rodu Potyvirus), D (PVY + nov virus iz rodu Potyvirus) in E (PVY + nov virus iz rodu Potyvirus po 7 dneh)

Pri zdravih rastlinah z večjim številom listov se pričakuje večja masa nadzemeljskega dela rastline in večja masa koreninskega sistema. To se kaže pri skupinah A, C ter osebkih E1 in E3 (Grafa 11 in 12). V skupini E lahko trdimo, da sta osebka E1 in E3 zdrava, E2 in E4 pa okužena, saj je na grafih 11 in 12 moč opaziti občutno razliko v masi korenin med zdravima in okuženima rastlinama. Celotna skupina B je imela podpovprečno maso nadzemeljskega dela (Graf 12), kar se ujema z bolezenskimi znamenji (pritlikavost, rumeno obarvnje na listih) za osebke B2, B3 in B4. Ne sklada pa se s podatki za višino in število listov dobro razvite rastline B1 (Tabeli 3 in 4) pri zadnjih meritvah.



Graf 12: Masa nadzemeljskega dela vseh skupin A (MOCK), B (PVY), C (nov virus iz rodu Potyvirus), D (PVY + nov virus iz rodu Potyvirus) in E (PVY + nov virus iz rodu Potyvirus po 7 dneh)

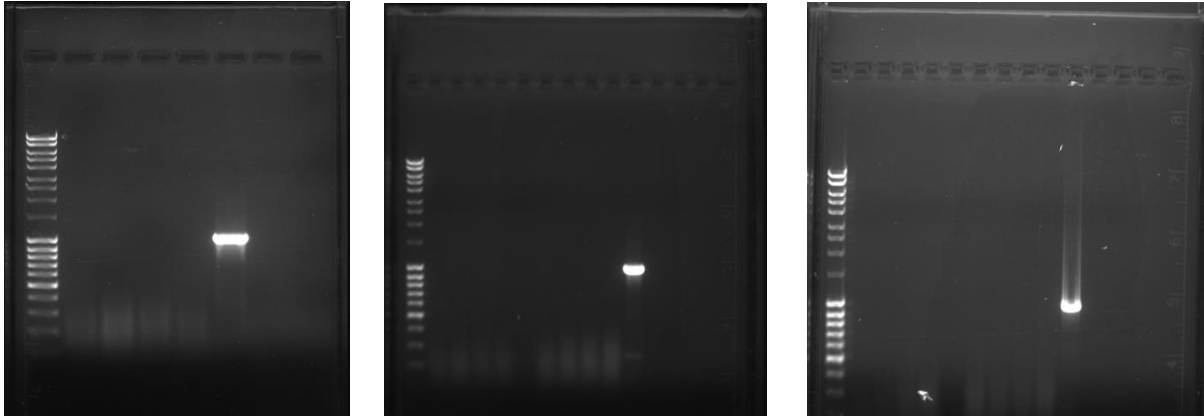
5.4. Rezultati hitrih testov za zaznavo virusa PVY in rezultati RT-PCR ter RT-qPCR

Hitri testi za zaznavo virusa PVY

Pozitivni rezultat smo dobili za vzorec rastline E2. E1 in E3 sta bila negativna, pri E4 pa je bil test neveljaven. V skupini D so bili rezultati za vse štiri rastline negativni.

RT-PCR in gelska elektroforeza

Prisotnost virusne RNA novega virusa iz rodu *Potyvirus* smo preverjali z uporabo metod RT-PCR in gelske elektroforeze. Testirali smo vzorce rastlin iz vseh skupin, tudi tiste, ki jih z novim virusom iz rodu *Potyvirus* nismo okuževali (MOCK, skupina B). Za pozitivno kontrolo (PK) smo uporabili že izoliran genetski material novega virusa. Po končanem RT-PCR smo vzorce nanесли na 1% agarozni gel z dodanim Etidijevim Bromidom. V prvo vdolbinico gela smo naložili DNA marker, ki nam je predstavljal standard velikosti. Po končani gelski elektroforezi smo gel postavili pod UV svetlobo, da so postali pomnoženi fragmenti jasno vidni. Etidijev Bromid je fluorescenčno barvilo, ki se integrira v nukleinske kisline in na UV svetlobi oddaja svetlobo. Rezultati niso pokazali nobenega ujemanja s pozitivno kontrolo, kar pomeni, da se noben osebek *Nicotiana benthamiana* ni okužil z novim virus iz rodu *Potyvirus* (Slika 23) (*What is gel electrophoresis?* 2021 – internetni vir 10).



Slika 23: Rezultati RT-PCR skupine A (MOCK) levo, nanašanje v vdolbincah A1, A2, A3, A4, PK. Rezultati skupin B (PVY) in C (nov virus iz rodu Potyvirus) na sredini, nanašanje v vdolbincah B1, B2, B3, B4, C1, C2, C3, C4, PK. Rezultati skupin D (PVY in nov virus iz rodu Potyvirus) in E (PVY in nov virus iz rodu Potyvirus po 7 dneh) desno, nanašanje v vdolbincah D1, D2, D3, D4, E1, E2, E3, E4, PK.

RT-qPCR

Z metodo RT-qPCR smo določali količino virusne RNA PVY v vzorcih rastlin. Odčitali smo cikel pomnoževanja, v katerem je fluorescenca presegla določen prag. Če je bila začetna koncentracija RNA v vzorcu večja, se je to zgodilo hitreje in manj ciklov je bilo potrebnih za pomnožitev nad nastavljenim pragom (S. E. Denman, C. S. Mcsweene, 2005, str. 105 – 115). Zaradi lažje interpretacije rezultatov vse signale nad 33 ciklov obravnavamo kot rezultat navzkrižne kontaminacije med rastlinami (med rastjo, meritvami in vzorčenjem).

Rezultati analize z RT-qPCR so pokazali, da je bilo najnižje število pretečenih ciklov pri vzorcih rastlin B2, B3, B4, E2, E4 ter tudi B1 (Tabela 11). Glede na podatke, lahko zagotovo trdimo, da so bile te rastline okužene s PVY. Pri vzorcih E1 in E3 višje število ciklov (Tabela 11) v kombinaciji z rezultati meritev višine, mase korenin in mase nadzemeljskega dela nakazuje, da v teh primerih do okužbe med okuževanjem najverjetneje ni prišlo in je signal posledica bodisi kontaminacije med rastlinami (med rastjo, meritvami in vzorčenjem), oziroma je do okužbe prišlo v manjši meri in se je virus namnoževal počasneje. Pri vzorcih rastlin A1, A2, C1, C3, C4 in vseh osebkih skupine D se je število ciklov gibalo nad 33, kar predstavlja le šibek signal za PVY (Tabela 11). Menimo, da je pri teh osebkih signal najverjetneje posledica kontaminacije med rastlinami med rastjo, meritvami in vzorčenjem. Vzrokov za pojav kontaminacij je več: zaradi prostorske stiske so bile v rastni komori vse skupine rastlin, razen negativne kontrole, na isti polici, med njimi pa ni bilo preprek. Med rastjo je lahko prišlo do dotikanja zelo okužene rastline z neokuženo. Možno je tudi, da smo rastline med izvajanjem meritev in premikanjem ranili. Če bi želeli ugotoviti, ali je virus vstopil v rastlino ali smo zaznali le RNA virusa na površini listov, bi te rastline morali ločeno gojiti še 1 do 3 mesece. Vmes bi spremljali, če se okužba povečuje, torej bi ponovno izvedli metodo RT-qPCR. Nižja vrednost ct bi potrdila, da je rastlina okužena. V primeru C2 (signal pri 29.4 ciklih) je lahko prišlo bodisi do pozne okužbe zaradi kontakta z rastlinami B skupine ali zaradi kontaminacije pri vzorčenju.

Vrednost smo zaznali tudi pri negativni kontroli izolacije RNA (osebki B), kar nakazuje kontaminacijo pri izolaciji (Tabela 11). Pri ostalih negativnih kontrolah virusna RNA ni bila zaznana.

vzorci	A (MOCK)	B (PVY)	C (nov virus iz rodu <i>Potyvirus</i>)	D (PVY + nov virus iz rodu <i>Potyvirus</i>)	E (PVY + nov virus iz rodu <i>Potyvirus</i> po 7 dneh)
1	37,6	23,3	34,1	34,0	29,3
2	36,0	7,0	29,8	35,2	5,8
3	UNDET	7,4	35,1	33,7	27,5
4	UNDET	7,8	34,9	33,8	6,4
NEGATIVNA KONTROLA IZOLACIJE rna	UNDET	34,3	UNDET	UNDET	UNDET

Tabela 11: Rezultati RT-qPCR za virus PVY *UNDET – nezaznan signal

6. Razprava

6.1. Interpretacija rezultatov

Z izvedenim raziskovalnim delom smo želeli ugotoviti, ali novo odkrit virus iz rodu *Potyvirus* okužuje testno rastlino *Nicotiana benthamiana* samostojno, oziroma v mešani okužbi z virusom PVY. Poleg tega nas je zanimala podobnost delovanja med obema virusoma, in če pri mešani okužbi lahko pride do medsebojnega delovanja ali izključevanja obeh virusov. Glede na zastavljena vprašanja in hipoteze, raziskovalni poskus ni v celoti izpolnil naših pričakovanj. Hipoteza 1: je bila je bila sicer potrjena, saj so testne rastline iz skupine B kazale tipične znake okužbe z virusom PVY. Skupino B smo inokulirali samo z virusom PVY. Rastline so bile navzven manjše, z manjšim številom listov, ki so bili porumeneli. Masa nadzemeljskega dela rastlin je bila manjša, prav tako masa koren. Rezultati analize z RT-qPCR pa so tudi potrdili okuženost rastlin z virusom PVY. Izvedba RT-qPCR je potrdila okuženost z virusom PVY pri vseh osebkih iz skupine B (Tabela 11). Okuženost rastlin B2 in B4 smo predvideli že pred izvedbo RT-qPCR, saj so bili na osebkih vidni znaki okužbe s PVY (pritlikavost, rumenenje ter venenje listov). Pri rastlini B1 je bilo pri analizi z RT-qPCR število ciklov 23, kar pomeni, da je bilo virusne RNA prisotne manj kot pri ostalih osebkih skupine B. Rastlina zato ni kazala bolezenskih znamenj. Okuženost se kaže v majhni masi korenin in nadzemeljskega dela. Pri osebku B3 jasna bolezenska znamenja okužbe niso bila vidna, opazna je bila samo večja gostota listov na spodnjem predelu rastline (Slika 10). Razlika v razporeditvi listov je bila najverjetneje posledica okužbe. Če bi pustili rastlino rasti dlje časa, predvidevamo, da bi bolezenska znamenja postala intenzivnejša.

Pri rastlinah skupine C, ki so bile okužene samo z novim virusom iz rodu *Potyvirus*, smo dobili vizualno zdrave rastline, brez kakršnihkoli bolezenskih znamenj. Tudi rezultati meritev mase nadzemeljskega dela in korenin ter število listov niso bistveno odstopali. Z manjšim številom listov in višino sta odstopala osebka C2 in C4, vendar nista kazala nobenih bolezenskih znamenj. S postopkom RT-PCR in gelsko elektroforezo smo preverjali okuženost z novim virusom iz rodu *Potyvirus*. Vsi rezultati so bili negativni, kar pomeni, da se ni okužila nobena rastlina. S tem poskusom je bila zavrnjena naša druga hipoteza.

Ker je bil nov virus iz rodu *Potyvirus* odkrit šele pred kratkim, nismo imeli predhodne podlage in pregleda nad relevantnimi raziskavami, ampak smo izhajali iz dotodanjih raziskav rodu *Potyvirus*. Virusi iz rodu *Potyvirus* okužujejo številne eksperimentalne rastline. Največkrat se okuževanje izvaja z metodo mehanske inokulacije (A. Kazuko Inoue-Nagata, 2022). Sklepali smo, da ima tudi nov virus podobne značilnosti kot preostali predstavniki rodu in bo povzročil podobne negativne učinke na listih kot ostali virusi iz te družine. Iz tega razloga smo za metodo okuževanja izbrali mehansko inokulacijo.

Zavrnjena je bila tudi hipoteza št. 3, kjer smo predvidevali, da bo hkratna inokulacija virusa PVY in novega virusa iz rodu *Potyvirus* rastline (skupina D) prizadela bolj kot le okužba z virusom PVY. Rastline iz skupine D, ki smo jih hkrati okuževali z obema virusoma, so imele višino in število listov primerljivo z meritvami neokuženih rastlin. Do odstopanja je prišlo le pri masi korenin, ki je bila presenetljivo nizka in je ustrezala povprečni masi korenin okuženih rastlin (Graf 11). Pri tem gre najverjetneje za naključje. Potrebne pa bi bile dodatne raziskave, ki bi lahko pojasnile to odstopanje. S postopkom RT-PCR in gelsko elektroforezo smo preverjali okuženost z novim virusom iz rodu *Potyvirus*. Presenetilo nas je, da so imeli vsi osebki skupine D visok ct (nad 33) pri zaznavi PVY (Tabela 11). Rastline torej niso bile okužene in niso imele bolezenskih znamenj. Ker smo to skupino hkrati okuževali z obema virusoma naenkrat, bi bilo v prihodnje potrebno preveriti ali je na slednji rezultat imel vpliv izbran način okuževanja.

Naša četrta hipoteza, kjer smo predvidevali, da bodo rastline, ki bodo prvotno okužene z virusom PVY, ob naknadni okužbi z novim virusom iz rodu *Potyvirus* postale še bolj prizadete, je bila le delno potrjena. Pri skupini E, ki je bila inokulirana najprej s PVY, čez 7 dni pa še z novim virusom iz rodu *Potyvirus*, je bila okužba rastline E2 potrjena že s hitrim testom za virus PVY. RT-qPCR pa je nedvoumno okužbo potrdil, še pri osebku E4 (Tabela 11). Bolezenska znamenja okužbe so bila pri teh dveh rastlinah jasno izražena in bolj intenzivna kot pri okuženih osebkih skupine B (povprečno 2 cm nižji in s 6 listi manj). Glede na rezultate RT-PCR pa se nobeden od osebkov ni okužil z novim virusom iz rodu *Potyvirus* (Slika 23).

Mešane okužbe več virusov se v naravi pojavljajo zelo pogosto. Okužba lahko poteče sočasno z obema virusoma (koinfekcija) ali pa se rastlina najprej okuži z enim in nato, čez nekaj časa, še z drugim virusom (superinfekcija). Glede na to, kako posamezna virusa vplivata drug na drugega, je njun odnos lahko nevtralen, sinergističen ali antagonističen (Z. Kogej, 2018, str. 6–8). Menili smo, da bosta imela virus PVY in nov virus iz rodu *Potyvirus* drug na drugega sinergističen učinek. To bi se kazalo, kot povečano pomnoževanje enega ali obeh virusov ter kot izrazitejša bolezenska znamenja na rastlinah. To se ni zgodilo, saj nov virus ni bil zaznan pri nobeni rastlini.

6.2. Vpliv na kmetijsko pomembne rastline

Na podlagi dosedanjih raziskav vemo, da je virus PVY zelo agresiven. Razširjen je po celem svetu in povzroča ogromne izgube pridelka krompirja in njemu sorodnih rastlin. Njegovo invazivnost smo potrdili tudi z našim delom. S tem virusom se je namreč okužilo najmanj pet gostiteljskih rastlin, ki so jih prizadeli številni bolezenski znaki, kot so pritlikavost, uvijanje listov ter rumeno obarvanje na listih. Če bi rastline gojili dalj časa, bi bolezenski znaki postali še izrazitejši.

Pričakovali smo, da bo tudi nov virus iz rodu *Potyvirus* okužil testno rastlino *Nicotiana benthamiana* iz družine *Solanace*, saj je ena najbolj dovzetnih za okužbe z virusi. Okuževanje vrste *Nicotiana benthamiana* z novim virusom bi lahko predstavljalo morebitno možnost okužbe tudi pri drugih rastlinah te družine, kar pa bi povzročilo škodo pomembnih nasadov krompirja, paradižnika, jajčevca in paprike ter predstavljalo novo težavo slovenskim kmetovalcem.

Čeprav ima *Nicotiana benthamiana* kar nekaj skupnih značilnosti s prej omenjenimi rastlinami, ne moremo z gotovostjo trditi, da so virusi, ki jo okužujejo, nevarni tudi za ostale rastline iz družine razhudnikovk (*Solanaceae*). Velja tudi nasprotno, in sicer, da lahko virus, ki na vrsto *N. benthamiana* nima učinka, napada katero drugo prehransko pomembno rastlino. Pri določanju lastnosti nekega novega patogena je raziskave potrebno izvesti na širokem krogu gostiteljskih rastlin, da lahko z gotovostjo potrdimo, ali nov virus predstavlja nevarnost okužbe za določene rastline.

Naša raziskava je pokazala, da se nov virus iz rodu *Potyvirus* z načinom mehanske inokulacije ne prenaša na rastlino *N. benthamiana*. Pri opazovanju bolezenskih znamenj na nobeni rastlini nismo opazili rumenega obarvanja krožne oblike, ki ga je nov virus povzročil na plevelu regačica (*Aegopodium podagraria*) iz družine kobulnic (*Apiaceae*). Rezultati RT-PCR in gelske elektroforeze pa so bili pri vseh osebkih v skupini C, ki smo jo okuževali le z novim virusom, negativni.

7. Zaključek

Glede na izvedeno raziskavo lahko zaključimo, da novi virus iz rodu *Potyvirus* testne rastline *Nicotiana benthamiana* ne okužuje. Enako velja pri mešani okužbi z virusom PVY. Rezultati so v resnici vzpodbudni, saj bi to lahko pomenilo, da virus ni preveč invaziven in v prihodnosti ne bo povzročal škode na kmetijskih pridelkih. Postavi se nam celo vprašanje ali ni prav novi virus zavrl okužbe z virusom PVY v testnih skupini D. To hipotezo bi bilo mogoče razvijati z novimi raziskavami s poudarkom na mešanih okužbah novega virusa z nekaterimi drugimi pomembnimi rastlinskimi virusi. Poudariti pa je potrebno, da brez dodatnih raziskav ni mogoče trditi, da se virus ne prenaša na katero izmed drugih kmetijskih in gospodarsko pomembnih rastlin. Več o tem bi v bodoče lahko izvedeli s spremembo protokolov, načinom inokulacije in širšim izborom gostiteljskih rastlin.

Rezultati našega raziskovanja so morda ovrgli večino postavljenih hipotez, vendar nam odpirajo številna vprašanja in ideje za nadaljnje delo.

8. Literatura

1. I. Mavrič Pleško. 2016. *Rastlinski virusi in njihovo poimenovanje* (16–22, 44). Kmetijski inštitut Slovenije, Hacquetova ulica 17, Ljubljana.
2. T. Pršin. 2018. *Eksperimentalna evolucija virusa mozaika pepina (PopMV) in virusa Y krompirja (PVY) v mešani in samostojnih okužbah* (1, 23). Magistrska naloga. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta.
3. G. L. Schumann, C. J. D'Arcy. 2006. *Essential Plant Pathology* (85–90). The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, U.S.A.
4. I. Mavrič Pleško, S. Širca. 2016. *Prenosi rastlinskih virusov* 1 (14, 15). Kmetijski inštitut Slovenije, Hacquetova ulica 17, Ljubljana.
5. J. Dijkstra. C. P. De Jager, 1998. *Practical plant virology: Inoculation of plants* (5–6). *Springer lab manual*. Springer, Berlin, Heidelberg.
6. M. Fillion. ur. 2012. *Quantitative Real-time PCR in Applied Microbiology* (3–11). Caister Academic Press, Norfolk, UK.
7. Z. Kogej. 2018. Vpliv mešanih okužb virusa Y krompirja in virusa mozaika pepina na količino virusov in bolezenske znake v različnih gostiteljskih rastlinah (6–8). Magistrska naloga. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta.

9. Internetni viri

1. R. C. Gergerich, V. V. Dolja. *Introduction to Plant Viruses, the Invisible Foe* [online]. 2006. *The Plant Health Instructor*. [Citirano: 12. 2. 2023; 15.30]. Dostopno na: <https://www.apsnet.org/edcenter/disandpath/viral/introduction/Pages/PlantViruses.aspx>
2. *The Viral Life Cycle* [online]. [s. d.]. *OpenStax Microbiology*. [Citirano: 2. 4. 2023; 17.20]. Dostopno na: <https://courses.lumenlearning.com/suny-microbiology/chapter/the-viral-life-cycle/>
3. L. Rubio, L. Galipienso, I. Ferriol. *Detection of Plant Viruses and Disease Management: Relevance of Genetic Diversity and Evolution* [online]. 2020. [Citirano: 12. 2. 2023; 17.30]. Dostopno na: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2020.01092/full>
4. M. Hollings, A. A. Brunt. *Potyvirus group* [online]. 1981. *Descriptions of Plant Viruses*. [Citirano: 26. 2. 2023; 12.15]. Dostopno na: <https://www.dpvweb.net/dpv/showdpv/?dpvno=245>
5. W. L. Morris. *Solanaceae. Solanaceae - an overview* [online]. [s. d.]. *ScienceDirect Topics*. [Citirano: 10. 1. 2023; 17.45]. Dostopno na: <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/solanaceae>
6. C. Kerlan. *Potato virus Y* [online]. 2006. *Descriptions of Plant Viruses*. [Citirano: 26.3. 2023; 16.15]. Dostopno na: <https://www.dpvweb.net/dpv/showdpv/?dpvno=414>
7. A. Kazuko Inoue-Nagata. *Family: Potyvirida* [online]. 2022. [Citirano: 28.3. 2023; 15.30]. Dostopno na: <https://ictv.global/report/chapter/potyviridae/potyviridae#Species>
8. *Nicotiana (Nicotiana benthamiana)* [online]. [s. d.]. [Citirano: 19. 1. 2023; 19.30]. Dostopno na: <https://www.jardineriaon.com/en/nicotiana-benthamiana.html>
9. R. Hull. *Mechanical Inoculation of Plant Viruses* [online]. 2009. [Citirano: 26. 2. 2023; 12.30]. Dostopno na: <https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9780471729259.mc16b06s13>

10. *What is gel electrophoresis?* [online]. 2021. [Citirano: 27.2.2023; 14.30]. Dostopno na: <https://www.yourgenome.org/facts/what-is-gel-electrophoresis/>
11. *Potato Virus Y Pocket Diagnostic Datasheet* [online]. [s. d.]. [Citirano: 20. 2. 2023; 14.15]. Dostopno na: [Potato Virus Y Pocket Diagnostic Datasheethttps://d3pcsg2wjg9izr.cloudfront.net › files › download](https://d3pcsg2wjg9izr.cloudfront.net › files › download)
12. *RNeasy Mini Handbook* [online]. [s. d.]. Qiagen. [Citirano: 20. 2. 2023; 17:00]. Dostopno na: <https://www.qiagen.com/fr/resources/resourcedetail?id=14e7cf6e-521a-4cf7-8cbc-bf9f6fa33e24&lang=en>
13. *OneStep RT-PCR Kit* [online]. 2012. Qiagen. [Citirano: 26. 2. 2023; 20.50]. Dostopno na: [QIAGEN OneStep RT-PCR Handbookhttps://www.qiagen.com › resources › download](https://www.qiagen.com › resources › download)
14. *Applied Biosystems™: AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Reagents* [online]. 2015. [Citirano: 26. 2. 2023; 21.00]. Dostopno na: [AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Reagentshttps://assets.thermofisher.com › LSG › manuals](https://assets.thermofisher.com › LSG › manuals)
15. S. E. Denman, C. S. Mcsweeney. *Quantitative (real-time) PCR* (105–115) [online]. 2005. [Citirano: 25. 2. 2023; 16.30]. Dostopno na: <https://www.researchgate.net/publication/227215581> *Quantitative real-time PCR*