



LATVIJAS LAUKSAIMNIECĪBAS UNIVERSITĀTE
MEŽA FAKULTĀTE

LATVIA UNIVERSITY OF AGRICULTURE
FACULTY OF FORESTRY

Mg. biol. VILNIS ŠĶIPARS

**PARASTĀS PRIEDES (*PINUS SYLVESTRIS* L.)
REZISTENCES PRET SAKŅU PIEPES
(*HETEROBASIDION ANNOSUM* (FR.) BREF.) IZRAISĪTO
SAKŅU TRUPI ĢENĒTISKIE ASPEKTI**

**GENETIC ASPECTS OF RESISTANCE OF SCOTS PINE
(*PINUS SYLVESTRIS* L.) AGAINST ROOT ROT CAUSED
BY *HETEROBASIDION ANNOSUM* (FR.) BREF**

PROMOCIJAS DARBA KOPSAVILKUMS
mežzinātņu doktora (Dr. silv.) zinātniskā grāda iegūšanai Mežzinātnes nozarē
Meža ekoloģijas un mežkopības apakšnozarē

SUMMARY OF THE DOCTORAL THESIS
for the scientific degree Dr. silv. in Forest Ecology and Silviculture

Jelgava, 2011

Promocijas darba zinātniskais vadītājs:
Academic adviser:

Dainis Ruņģis
Dr. biol.

Darbs izpildīts Latvijas Valsts Mežzinātnes institūtā „Silava” (LVMI „Silava”).
Pētījumi veikti laika posmā no 2007. līdz 2011. gadam.

The research has been carried out at Latvian State Forest Research Institute „Silava” (LSFRI „Silava”). The studies have been performed in the period between 2007 – 2011.

Oficiālie recenzenti / *Official reviewers:*

- Dr. silv. **Andrejs Dreimanis**,
- Dr. habil. biol. **Īzaks Rašals**,
- Dr. scient. **Ari M. Hietala**, Norvēģijas Meža un Ainavu institūta vecākais pētnieks

Ievērojama darba daļa veikta ESF projekta ietvaros.

Considerable part of studies included in PhD paper were part of an EDF funded project.



ieguldījums tavā nākotnē

Eiropas Savienība

Promocijas darba aizstāvēšana notiks LLU Mežzinātņu nozares un Materiālzinātņu nozares Koksnes materiālu un tehnoloģijas apakšnozares promocijas padomes atklātajā sēdē 2011. gada 17. novembrī, plkst. 10:30 Jelgavā, Dobeles ielā 41, sēžu zālē.

The Promotional paper will be presented for public criticism in an open session of the Promotion Council of Forest Sciences and Material Sciences (sub-branch of Wood Materials and Technology) of LUA held on November 17, 2011, at 10.30 a.m. in the Conference hall, Dobeles street 41, Jelgava.

Ar promocijas darbu un kopsavilkumu var iepazīties LLU Fundamentālajā bibliotēkā / *The thesis and resume are available at the Fundamental Library of LUA, Lielā iela 2, Jelgava, LV-3001 vai / or <http://llu.fb.llu.lv/llu-theses.htm>.*

Atsauksmes sūtīt LLU Mežzinātņu nozares un Materiālzinātņu nozares Koksnes materiālu un tehnoloģijas apakšnozares promocijas padomes sekretāram, LLU profesoram A. Drēskam / *References are welcome to be sent to Dr.sc.ing. A. Drēška, the Secretary of the Promotion Council, Akadēmijas iela 11, Jelgava, Latvija, LV-3001 vai / or mfmezizm@llu.lv.*

Saturs	3
<i>Table of contents</i>	3
DARBA APROBĀCIJA/	4
<i>Approbation of research results</i>	4
DARBBA VISPĀRĒJS RAKSTUROJUMS /	6
<i>General description of work</i>	44
SAĪSINĀJUMI /.....	9
<i>Abbreviations</i>	9
1. LITERATŪRAS APSKATS /.....	10
<i>Literature overview</i>	47
2. MATERIĀLI UN METODEDES /	11
<i>Materials and methods</i>	48
3. REZULTĀTI /.....	13
<i>Results</i>	50
4. DISKUSIJA /	35
<i>Discussion</i>	72
SECINĀJUMI/.....	42
<i>Conclusions</i>	79

DARBA APROBĀCIJA

APPROBATION OF RESEARCH RESULTS

Promocijas darba rezultāti prezentēti 3 starptautiskās un 4 nacionālā līmeņa zinātniskajās konferencēs /

Results of research included in the doctoral thesis have been presented at 3 international and 4 national level scientific conferences:

1. Latvijas Universitātes 67. konference. 2009. gada 4. februārī. V. Šķipars, Ā. Jansons, I. Baumanis, D. Ruņģis „Parastās priedes *Pinus sylvestris* L. rezistences ģenētiskie aspekti”,
2. 5. starptautiskā konference “Research and conservation of biological diversity in Baltic region”, Daugavpils, 22-24 April, 2009. V. Šķipars, Ā. Jansons, I. Baumanis, D. Ruņģis “Detection of pine root rot fungus *Heterobasidion annosum* in forest stands by a polymerase chain reaction assay”,
3. Latvijas Universitātes 68. konference 2010.g. 4. februārī. V. Šķipars, D. Ruņģis “Parastās priedes ar rezistenci pret sakņu trupes izraisītāju (*Heterobasidion annosum*) saistīto kandidātģēnu pētījumi”,
4. LLU Meža fakultātes zinātniski praktiskā konference „Zinātne un prakse nozares attīstībai” 2010. g. 23. martā. V. Šķipars “Antimikrobiālo proteīnu un tos kodējošo ģēnu izpēte - praktiski piemēri un nākotnes iespējas pret sakņu trupi rezistentu priežu selekcionešanā Latvijā”,
5. Starptautiskā konference “Research for Rural Development” 2010. gada 19. – 21. Maijs, Jelgava, Latvija. V. Šķipars “Research on Genetic Aspects of Scots Pine Resistance to Root Rot”,
6. Latvijas Universitātes 69. konference 2011. g. 2. februārī. V. Šķipars, B. Krivmane, D. Ruņģis “Parastās priedes *Pinus sylvestris* molekulāri ģenētiskās atbildes reakcijas sakņu trupes infekcijai”,
7. Konference “Advances in plant biotechnology in Baltic sea region”, Kauņa, Lietuva, 2011. gada 30. – 31. marts. V. Šķipars, M. Kjos, B. Krivmane, N. Nagy, I. Gaile, D. Ruņģis, C. G. Fossdal „Expression analysis of taumatin-like protein gene and pinosylvin synthase gene in Scots pine”; A. Korica, V. Beļeviča, V. Šķipars, D. Ruņģis „PCR-mediated detection and identification of forest tree pathogens”.

Promocijas darba rezultāti publicēti 2 zinātniskos rakstos /

Results of the doctoral thesis have been published in _scientific publications:

1. Šķipars V., Baumanis I, Ruņģis D. Research on genetic aspects of Scots pine resistance to root rot. (2010) Research for Rural Development 2010. Annual 16th International Scientific Conference Proceedings, Jelgava, LLU, p 222-226.

2. Vilnis Šķipars, Dainis Ruņģis “Detection of *Heterobasidion annosum* in Scots pine trees using a polymerase chain reaction based method”, *Baltic Forestry*, 17(1): 2-7.

Sagatavotās un iesniegtās publikācijas, kas pieņemtas publicēšanai /

Prepared and submitted scientific publications accepted for publishing:

1. Vilnis Šķipars, Dainis Ruņģis „Thaumatococin-like protein gene copy number variation in Scots pine”, *Experimental and Environmental Biology*,
2. Vilnis Šķipars, Tālis Gaitnieks, Dainis Ruņģis „Metodikas aprobācija *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. izraisītās pigmentācijas novērtēšanai parastās priedes koksne”, *Mežzinātne*.

DARBA VISPĀRĒJS RAKSTUROJUMS

Darba aktualitāte

Latvijā parastā priede ir ekonomiski nozīmīga meža koku suga. Parastā priede sastāda 47 % no AS „Latvijas Valsts Meži” apsaimniekošanā esošajiem mežiem, pie tam 74 % no priežu mežiem ir tīraudzes, kas veicina sugai specifisku slimību ātru izplatību. Latvijas priežu audzēs izplatīta ir sakņu trupe. Šī slimība samazina koksnes pieaugumu, veicina vējgāzes un izraisa koku nokalšanu. Priežu sakņu trupi ir grūti konstatēt, vadoties pēc koka virszemes daļas stāvokļa, jo sakņu trupe var neizraisīt redzamas izmaiņas pat tad, ja tā ir skārusi pusi no koka sakņu sistēmas, bez tam, līdzīgus simptomus var izraisīt vairāki patogēni. Atbrīvoties no sakņu trapes izraisītāja inficētā mežaudzē ir praktiski neiespējami, jo šāda mērķa sasniegšanai nepieciešams aizvākt no augsnes visas inficētās saknes un pat pēc tam augsnē paliktu sakņu fragmenti. Latvijā *Heterobasidion parviporum* izraisītā sakņu trupe inficētās egļu audzēs nodara 800 – 4790 eiro lielus zaudējumus, rēķinot uz hektāru (Gaitnieks et al., 2007). Vērojama arī tendence, palielinoties mežaudzes vecumam, palielināties inficēto koku skaitam (Gaitnieks et al., 2007). Vadoties no *Heterobasidion annosum* un *H. parviporum* līdzības, var pieņemt, ka *H. annosum* izraisītie ekonomiskie zaudējumi inficētās priežu audzēs arī ir būtiski. Minētā informācija aktualizē pētījumus par parastās priedes rezistences pret sakņu trupi ģenētiskajiem aspektiem ar uzsvāru uz dabā sastopamu ģenētisku polimorfismu, kas varētu pozitīvi ietekmēt rezistenci, meklēšanu, ģenētisku metožu izstrādi rezistentāku koku identificēšanai vai koku atļasei selekcijas programmām.

Darba zinātniskais mērķis ir izpētīt ar *Pinus sylvestris* rezistenci pret *Heterobasidion annosum* saistīto gēnu kopiju skaita genomā atšķirības, ekspresijas izmaiņas pēc inokulēšanas ar *H. annosum* un kopiju skaita *P. sylvestris* genomā saistību ar gēnu ekspresiju. **Darba praktiskā nozīme** ir izstrādāt parastās priedes selekcijas materiāla molekulāri ģenētisku atlasē kritēriju rezistentāko pret *H. annosum* klonu atļasei.

Promocijas **darba pētnieciskie uzdevumi** ir:

1. noteikt ar rezistenci saistīto parastās priedes gēnu kopiju skaita polimorfismu,
2. veikt gēnu ekspresijas analīzes pirms un pēc priedes koku inokulēšanas ar *H. annosum*, lai iegūtu informāciju par šo gēnu ekspresijas izmaiņām un konstatētu to korelāciju ar gēnu kopiju skaitu,
3. pārbaudīt lāzera mikrosecēšanas mikroskopijas izmantošanas iespējas gēnu ekspresijas pētījumiem dažādos audu tipos,
4. izvērtēt vizuāli novērtējamās inokulācijas ar *H. annosum* izraisītos bojājumus, pārbaudīt to garuma korelāciju ar gēnu kopiju skaitu,

5. izstrādāt metodi augošu priežu koku inficētības ar *H. annosum* līmeņa raksturošanai.

Pētījumā izmantotie materiāli

Eksperimentā izmantoti 300 koki no eksperimentālā stādījuma pie Kalsnavas (eksperimenta numurs ilglaicīgo zinātnisko pētījumu objektu reģistrā: 235, Meža pētīšanas stacijas „Kalsnava” 224. kvartāls) un, mazākā apjomā, 9 koki no eksperimentālā stādījuma pie Zvirgzdes (eksperimenta nr. 27, Vecumnieku mežniecības 193. kvartāls).

Pētījumā lietotās metodes

Šajā darbā priedes rezistences pret sakņu trupi ģenētiskie aspekti pētīti, izmantojot gēnu kopiju skaita analīzes un gēnu ekspresijas analīzes. Individuālu koku fitosanitārā stāvokļa novērtēšanai, attiecībā uz to inficētību ar *H. annosum*, aprobēta uz PĶR (polimerāzes ķēdes reakciju) balstīta molekulārās ģenētikas metode.

Promocijas darba hipotēze

Zināšanas par parastās priedes rezistences pret sakņu trupi ģenētiskajiem aspektiem ir potenciāli izmantojamas priežu selekcijas programmās.

Pētījuma novitāte un zinātniskais nozīmīgums

Darba novitāti apliecina tas, ka doktora darbā izmantotās metodes individuālu koku fitosanitārā stāvokļa novērtēšanai un gēnu kopiju skaita analizēšanai, attiecībā uz pētījumiem par skuju kokiem, ir jaunievedums. Lai gan metode individuālu koku fitosanitārā stāvokļa novērtēšanai ir attīstīta no Hantula un Vainio izstrādātās metodes, kas domāta *H. annosum* detektēšanai koksnē, tā tomēr ir pirmā, kas izmantojama individuāla koka fitosanitārā stāvokļa precīzākai raksturošanai. Līdz šim par pieaugušām *P. sylvestris* sugas priedēm nav publicēti darbi par rezistences mehānismiem molekulārās ģenētikas līmenī. Šis ir pirmais darbs, kurā pētītas un detektētas dažādu gēnu kopiju skaita variācijas priežu genomos. Šajā darbā pirmo reizi tiek aprakstīta palielināta gēnu kopiju skaita korelācija ar šī gēna ekspresijas pieaugumu reakcijā uz *H. annosum* inokulāciju. Gēnu ekspresijas analīzes dažādiem audu tiptiem viengadīgos priedes sēņņos, kombinējot lāzera mikrosecēšanas mikroskopiju ar gēnu ekspresijas analīzēm, arī ir aprakstītas pirmo reizi.

Promocijas darba struktūra

Promocijas darba struktūra veidota atbilstoši pētniecisko uzdevumu atspoguļošanas vajadzībām. Darbs sastāv no 5 nodaļām.

1. *Literatūras apskats*. Sadaļā detalizēti aprakstīta sakņu trapes izraisītāja *Heterobasidion annosum* bioloģija, parastās priedes atsevišķi un augu kopumā rezistences mehānismi ar uzsvaru uz

iesaistītajiem proteīniem un gēniem, sniegta virspusēja informācija par doktora darbā izmantotajām metodēm.

2. *Materiāli un metodes.* Sadaļā detalizēti aprakstītas doktora darbā izmantotās metodes un iegūto datu interpretēšanā izmantotās matemātiskās darbības.
3. *Rezultāti.* Sadaļā loģiskā kārtībā detalizēti aprakstīti katra pētnieciskā uzdevuma veikšanai veikto eksperimentu rezultāti, sniegts rezultātu grafisks un tabulārs atainojums.
4. *Diskusija.* Sadaļā aprakstīti eksperimentos iegūtie rezultāti un šo rezultātu potenciālā nozīme dažādos jautājumos, īpaši parastās priedes rezistences pret sakņu trupi mehānismos.
5. *Secinājumi.* Sadaļā apkopoti septiņi darba pētnieciskajiem uzdevumiem atbilstoši secinājumi.

Kopumā darbs noformēts uz 107 lpp., tas satur 35 attēlus un 15 tabulas. Izmantoti 192 informācijas avoti. Promocijas darba nobeigumā formulēti 7 secinājumi.

SAĪSINĀJUMI / ABBREVIATIONS

4CCAL	– 4-kumarāt-CoA ligāzes / <i>4-coumarate CoA ligase</i>
ACS1	– <i>Pinus sylvestris</i> 1-aminociklopropān-1-carboksilāt sintāze 1 / <i>Pinus sylvestris 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 1</i>
ACS2	– <i>Pinus sylvestris</i> 1-aminociklopropān-1-carboksilāt sintāze 2 / <i>Pinus sylvestris 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 2</i>
C3HL	– kumarāt 3-hidroksilāzes / <i>coumarate 3 hydroxylase</i>
CAD	– cinamil alkohola dehidrogenāze / <i>cinnamyl-alcohol dehydrogenase</i>
CCOMT	– kafeil-CoA o-metiltransferāze / <i>caffeoyl-CoA o-methyltransferase</i>
COAR	– cinamil-CoA reduktāze / <i>cinnamoyl-CoA reductase</i>
COMT	– kafeāta o-metiltransferāzes / <i>caffeate O-methyltransferase</i>
CYP	– ciklofilīns / <i>cyclophilin</i>
d. p. i.	– dienas pēc inokulēšanas / <i>days post inoculation</i>
Def1	– defenzīns 1 / <i>defensin 1</i>
Def2	– defenzīns 2 / <i>defensin 2</i>
GAPDH	– glicerāldehīda 3-fosfāta dehidrogenāze / <i>glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
LCM	– lāzera mikrosecēšanas mikroskopija / <i>laser capture microdissection</i>
MYB2	– MYB domēnu saturošs transkripcijas faktors / <i>transcription factor containing MYB domain</i>
MYB4	– R2R3-MYB transkripcijas faktors / <i>R2R3-MYB transcription factor</i>
Pal1	– fenilalanīna deamināze / <i>phenylalanine deaminase</i>
PĶR / PCR	– polimerāzes ķēdes reakcija / <i>polymerase chain reaction</i>
PsBBs	– pinosilvīna sintāze / <i>pinosylvin synthase</i>
PsR	– <i>Pinus sylvestris</i> rezistences gēns / <i>Pinus sylvestris resistance gene</i>
SCR1	– SCARECROW transkripcijas faktors / <i>SCARECROW transcription factor</i>
TC4H	– trans-cinamāt 4-hidroksilāze / <i>trans-cinnamate 4-hydroxylase</i>
TLP	– taumatīnam līdzīgais proteīns / <i>thaumatin-like protein</i>
WRKY	– WRKY domēns / <i>WRKY domain</i>

1. LITERATŪRAS APSKATS

Promocijas darbā šai nodaļai veltītas 24 lappuses un 2 attēli.

H. annosum izraisītā sakņu trupe ir viena no postošākajām skujkoku slimībām ziemeļu puslodē. Ikgadējie ar *H. annosum* infekciju saistītie zaudējumi Eiropā ir 800 miljoni eiro (Asiegbu et al., 2005a). *Heterobasidion annosum* ir *Basidiomycota* nodalījuma *Basidiomycetes* klases *Russulales* rindas *Bondarzewiaceae* dzimtas *Heterobasidion* ģints sēne. Pēc trofiskuma šī suga ir iedalāma pie nekrotrofiem patogēniem. Pirms 1978. gada *H. annosum* un *H. parviporum* tika uzskatītas par vienas sugas - *H. annosum* dažādām intersterilitātes grupām (Korhonen, 1978). Tagad šīs intersterilitātes grupas tiek uzskatītas par atsevišķām sugām – *H. annosum* (inersterilitātes grupa P) un *H. parviporum* (intersterilitātes grupa S) (Niemelä & Korhonen, 1998). Līdz ar to rodas situācija, ka dažās disertācijā minētajās atsaucēs esošā informācija nevar tikt droši attiecināta uz *H. annosum*, jo, iespējams, ka konkrētajā darbā aprakstīta *H. parviporum*. Tomēr jāuzsver, ka abu sugu īpašības ir ļoti līdzīgas, izņemot to saimniekauga izvēli (Korhonen, 1978). Attiecībā uz *H. annosum* bieži tiek attiecinātas piebildes *s. stricto* un *s. lato*, tādā veidā aprakstot kādu jautājumu tieši par *H. annosum* vai par *H. annosum* un *H. parviporum* kopumā.

Latvijā sastopamas abas iepriekš minētās sugas. Bez šīm sugām Eiropā sastopama arī *Heterobasidion abietinum*. *H. abietinum* galvenokārt inficē baltegles (*Abies alba*) (Niemelä & Korhonen, 1998). Šīs Eiropā sastopamās sugas kopā ar Amerikā sastopamajām *Heterobasidion irregulare* un *Heterobasidion occidentale* dēvē par *Heterobasidion annosum* kompleksu. Par divu Austrālijā un Jaunzēlandē sastopamu saprotrofu sugu - *Heterobasidion auraceae* un *Heterobasidion insulare* piederību *H. annosum* kompleksam zinātnieku viedoklis ir dalīts.

Pētniekus jau sen interesē skujkoku rezistences pret *Heterobasidion* ģints patogēnajām sēnēm ģenētiskie aspekti. Arī latviešu zinātnieki aktīvi pētījuši ar parastās priedes rezistenci pret *H. annosum* saistītus jautājumus, mēģinot noteikt sveķu satura koksne un citu faktoru ietekmi uz rezistenci (Lauska, 1970). Veikti vairāki pētījumi, kuri raksturo, cik liela loma rezistencē pret sakņu trupi eglē ir ģenētiskajiem faktoriem kopumā, neiedziļinoties konkrētu auga aizsardzības mehānismos iesaistītu gēnu izpētē (Wallendorf & Thomsen, 2008; Swedjemark & Karlsson, 2004a; Swedjemark & Karlsson, 2004b; Bodles et al., 2007). Viens no šo publikāciju secinājumiem ir tāds, ka *Heterobasidion parviporum*, kas ir egles inficējošā *Heterobasidion* ģints suga, augšanas ātrums koksne starp dažādiem indivīdiem nozīmīgi variē, un šī īpašība tiek pārmantota nākamajās paaudzēs (pārmantojamības indeksa vērtība (H^2) tika noteikta kā 0,18), tāpat tika konstatēta būtiska pozitīva korelācija starp koka izmēriem un sēnes augšanas ātrumu kokā, bet būtiska no egles genotipa atkarīga korelācija starp sēnes augšanas ātrumu un bojājumu garumu zem

mizas netika konstatēta (Swedjemark and Karlsson, 2004b). Konstatēts, ka pastāv atšķirības rezistencē pret sakņu trupi arī starp dažādiem *Pinus sylvestris* indivīdiem (Korshikov & Demkovich, 2008).

Līdz šim tiek uzskatīts, ka nav atrasts parastās priedes vai citu skujkoku indivīds, kurš būtu absolūti rezistents pret sakņu trupi, lai gan publikācijās sastopamas tādas frāzes kā „rezistentais klons, rezistentie koki” u.c. Turklāt skujkoku rezistenci pret sakņu trupi ir grūti pierādīt eksperimentālos stādījumos vai dabiskās mežaudzēs, jo, pat gadījumā, ja puse no sakņu sistēmas jau ir inficēta, augs var neuzrādīt ārējas slimības pazīmes. Inficējot koku mākslīgi (parasti pieaugušiem kokiem inokulātu ievieto aiz mizas), infekcijas process nenotiek dabīgi, jo parasti koki tiek inficēti caur sakņu kontaktu ar slimu koku. Iespējams, ka risinājumu sniedz sējeņu inficēšana, bet šāda pieeja nav plaši pielietojama, lai raksturotu mežaudzē augošu koku, jo sējenis nav kāda pieauguša koka klons, bet gan dzimumvairošanās procesa rezultāts, kas nav ģenētiski identisks nevienam no vecākiem. Turklāt auga aizsargmehānismi dažāda vecuma augiem darbojas atšķirīgi. Skujkoku rezistence pret sakņu trupi ir kompleksa, rezistences mehānisms ietver vairākus gēnus un to kodētos proteīnus, no kuriem daļa vēl nav noskaidroti. Katrs gēns individuāli un dažādas gēnu kombinācijas iespaido indivīda rezistenci pret sakņu trupi dažādā mērā. Izmantojot molekulārās ģenētikas metodes, ir iespējams precīzāk izpētīt sarežģītos rezistences mehānismus ar mērķi atklāt un identificēt gēnus, kas iesaistīti rezistences pret sakņu trupi procesos, un izpētīt šo gēnu darbības efektus.

2. MATERIĀLI UN METODES

Promocijas darbā šo nodaļu veidojošās informācijas apkopošanai veltītas 24 lappuses, 1 attēls un 2 tabulas.

Molekulārās ģenētikas metode *H. annosum* klātbūtnes noteikšanai paraugā

Tika aprobēta metodika, kas ļauj noteikt, vai koksnes paraugā ir atrodams *H. annosum* DNS. Metodes pamatā ir Hantula un Vainio 2003. gada publikācijā aprakstītā metode. Šī metode ir balstīta uz PĶR reakciju, kurā izmanto *H. annosum* specifiskus praimerus. Analīzēs izmantojamais DNS tiek izdalīts no interesējošās vietas kokā vai citā paraugā, un, ja šis materiāls satur *H. annosum*, tas satur arī šīs sēnes DNS, kuras klātbūtni paraugā var noteikt ar minēto PĶR.

Eksperimentā izmantots eksperimentālais stādījums pie Kalsnavas (eksperimenta numurs ilglaicīgo zinātnisko pētījumu objektu reģistrā: 235, Meža pētīšanas stacijas „Kalsnava” 224. kvartāls). Koku inficētības ar *H. annosum* pārbaudei paraugi tika ievākti ar 2 cm diametra apļveida kaltu ne

augstāk kā 3 cm no zemes, paraugu ņēmēju ievadot 2-3 cm dziļumā virzienā uz koka serdi. Laboratorijā no iegūtā koksnes fragmenta tika izdalīta DNS.

Molekulārās ģenētikas metode individuālu koku inficētības pakāpes noteikšanai

Paraugu ievākšana un analīze bija tāda pati kā aprakstīta sadaļā par molekulārās ģenētikas metodes *H. annosum* klātbūtnes noteikšanai paraugā izstrādā, izņemot to, ka no katra koka tika ievākti pieci paraugi. Pēc elektroforēzes datu analīzes paraugi tika sadalīti klasēs pēc inficētības pakāpes. Kopumā paraugkoki tika sadalīti sešās klasēs: 0/5, 1/5, 2/5, 3/5, 4/5 un 5/5, kur skaitlis pirms slīpsvītras norāda, cik no pieciem paraugiem, kas tika ņemti no koka, uzrāda *H. annosum* klātbūtni, bet skaitlis pēc slīpsvītras – no koka ņemto paraugu skaitu.

Inokulēšanas metodes izstrāde

Eksperimentālā materiāla mākslīgas inficēšanas jeb inokulācijas eksperimenti ir vajadzīgi, lai izstrādātu atkārtojamu inokulācijas metodi. Parauga inokulēšana ir nepieciešama gēnu ekspresijas analīžu veikšanai. Pieauguši koki tika inokulēti, ievietojot *H. annosum* saturošu barotni aiz koka mizas. Pieaugušu koku inokulēšanai tika izmantota *H. annosum* kultūra *I Sm 15 92* no LVMI „Silava” fitopatoloģijas laboratorijas kolekcijas, un piloteksperimentā arī agresīvākais *H. annosum* izolāts 358. Eksperimentos izmantoti koki no eksperimentālā stādījuma pie Kalsnavas (eksperimenta nr. 235) un koki no eksperimentālā stādījuma pie Zvirgzdes (eksperimenta nr. 27, Vecumnieku mežniecības 193. kvartāls).

Kandidātģēnu kopiju skaita variāciju analīzes

Paraugi gēnu kopiju skaita variāciju analīzēm tika ievākti no 29 kokiem eksperimentālā stādījumā pie Kalsnavas (eksperimenta nr. 235). DNS izdalīšanai tika ievāktas skujas. Ievāktu paraugu vidū no dažām ģimenēm (viena mātes koka pēcnācēji) bija arī vairāki paraugi.

DNS tika izdalīta no skužām, pēc DNS izdalīšanas tika veikts papildus attīrīšanas solis ar mērķi samazināt PĶR inhibējošu vielu koncentrāciju. Izdalītās DNS koncentrācija tika noteikta, izmantojot spektrofluorimetrijas metodi.

Gēnu kopiju skaita analīzēm tika izmantota reālā laika PĶR relatīvās kvantitēšanas metode. Gēnu kopiju skaita variācijas analīzē tiek salīdzināts kāda gēna daudzums dažādu paraugu genomos, izmantojot kādu paraugu kā atskaites paraugu. Lai aprēķinātu absolūto gēnu kopiju skaitu, iespēju robežās tika sekots protokolam, kuru publicējusi Barbara D’haene ar līdzautoriem (D’haene et al., 2010). Pārreķināto rezultātu ticamības novērtēšanai tiek aprēķināta Z vērtība. Ja Z vērtības modulis ir lielāks par 2, iegūtais rezultāts konkrētajam paraugam nav ticams.

Ar priedes rezistenci pret *H. annosum* saistīto gēnu ekspresijas analīzes

Gēnu ekspresijas analīzēm nepieciešamie paraugi no inokulētajiem kokiem tika ievākti pirms inokulācijas un ar dažādu laika intervālu pēc inokulācijas. Eksperimentos izmantoti koki no eksperimentālā stādījuma pie Kalsnavas (eksperimenta nr. 235). Eksperimentos, kuros tika noteikta *TLP* gēna ekspresija, paraugi tika ievākti vienu, septiņas un 30 dienas pēc inficēšanas, bet pārējo gēnu ekspresijas analīzēm tika ievākts kontroles paraugs un paraugi septiņas un 40 dienas pēc inokulēšanas.

No ievāktajiem paraugiem tika izdalīta RNS un, izmantojot spektrofluorimetrijas metodi, noteikta RNS koncentrācija.

Gēnu ekspresijas atšķirību starp dažādiem paraugiem raksturošanai tika izmantota relatīvā kvantitēšana. Šī metode savstarpēji salīdzina paraugus, izmantojot lietotāja izvēlētu paraugu kā atskaites paraugu.

Gēnu ekspresijas analīzes priedes sējeņu parenhīmā un sveķu aiļu audos

Gēnu ekspresijas analīzes sadaļas nosaukumā minētajiem audiem tika veiktas, paraugus šīm analīzēm iegūstot ar lāzera mikrosecēšanas mikroskopijas (LCM, no angļu *Laser Capture Microdissection*) metodi.

Gēnu ekspresijas datu analīzē, vadoties pēc iegūtajām standartlīknēm, tika noteikta kandidātģēna ekspresijas un endogēnās kontroles ekspresijas absolūtās vērtībās. Kandidātģēnu relatīvā ekspresija konkrētam paraugam tika iegūta, dalot kandidātģēna ekspresijas vērtību ar endogēnās kontroles ekspresijas vērtību.

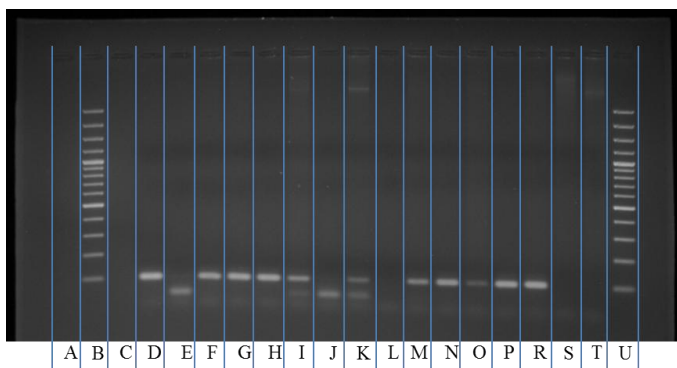
Datu iegūšanas obligāts nosacījums ir endogēnās kontroles reālā laika PQR datu esamība, pretējā gadījumā dati par kandidātģēna ekspresiju nav interpretējami vai salīdzināmi ar citu paraugu analīžu rezultātiem.

3. REZULTĀTI

Doktora disertācijā šai sadaļai veltītas 33 lappuses, 31 attēls un 13 tabulas.

***Heterobasidion annosum* klātbūtnes noteikšana augošos kokos**

H. annosum klātbūtnes noteikšanai tika izvēlēta PQR metode. Amplificējot no koksnes izdalīto DNS ar *H. annosum* specifiskiem PQR praimeriem, tika iegūti DNS fragmenti ar gaidīto garumu (aptuveni 100 bp). Negatīvajā kontrolē netika konstatēti PQR amplifikācijas fragmenti (3.1. attēls).



3.1. att. *H. annosum* specifiskās PĶR reakcijas produktu elektroforēzes analīze.

Attēla 3.1. B un U celiņos ir DNS garuma standarti. Standarta īsākā fragmenta, kas atrodas viszemāk, garums ir 100 bp. Celiņos D – T ir analizējamie paraugi, no kuriem paraugi celiņos D, F, G, H, I, K, M, N, O, P un R ir pozitīvi (uzrāda gaidīto DNS fragmenta garumu), bet paraugi celiņos E, J, L, S un T ir negatīvi, tie uzrāda praimeru dimērus, kas ir īsāka garuma, nekā *H. annosum* specifiskais fragments. Paraugs celiņā C ir negatīvā kontrole, bet celiņš A ir tukšs.

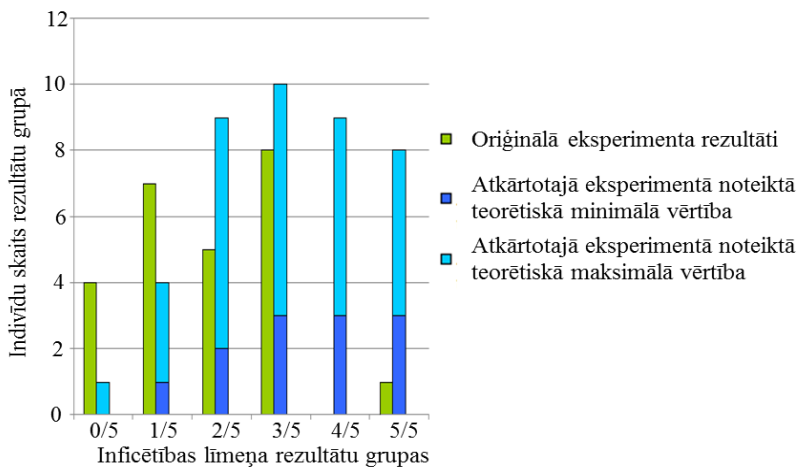
Mežaudzes fitosanitārais stāvoklis tika raksturots, nosakot *H. annosum* klātbūtni mežaudzē kopumā, pārbaudot 300 kokus, analizējot DNS no viena parauga katram kokam. No 300 analizētajiem paraugiem 119 uzrādīja pozitīvu rezultātu. Jāpiebilst, ka vizuāli noteikt, vai koks ir inficēts ar sakņu truji, var vienīgi atrodot uz stumbra pamatnes *H. annosum* augļķermeni. Šādus augļķermeņus izdevās atrast četriem no pārbaudītajiem kokiem, taču analizē divi no šiem četriem kokiem deva negatīvu rezultātu. Šāds rezultāts varēja tikt izskaidrots ar *H. annosum* nevienmērīgu izplatību analizētajos kokos. Lai to pārbaudītu, tika izrakti un analizēti divi celmi. Viens celms bija no nokaltuša koka, bet otrs no vizuāli vesela koka ar *H. annosum* augļķermeni. *H. annosum* izplatības celmos novērtēšanas rezultāti apkopoti tabulā 3.1.

***H. annosum* izplatības celmos novērtēšanas rezultāti**

	Parauga numurs	Parauga atrašanās vieta	<i>H. annosum</i> DNS (+/-)
Veselā koka celms	1	Stumbrs, ārpuse (1 cm no mizas)	+
	2	Stumbrs, 5 cm no centra	-
	3	Stumbrs, 2 cm no centra	+
	4	1. sānsakne, pieguļoši stumbram, ārpuse	+
	5	1. sānsakne, pieguļoši stumbram, centrs	+
	6	2. sānsakne, 10 cm no stumbra	-
	7	Mietsakne, pieguļoši stumbram	-
	8	Mietsakne, 20 cm no stumbra	+
Nokaltušā koka celms	9	Stumbrs, ārpuse (1 cm no mizas)	-
	10	Stumbrs, 1 cm no centra	-
	11	1. sānsakne, pieguļoši stumbram, ārpuse	+
	12	1. sānsakne, pieguļoši stumbram, centrs	+
	13	2. sānsakne, 5 cm no stumbra, ārpuse	-
	14	2. sānsakne, 5 cm no stumbra, centrs	+
	15	3. Sānsaknes gals, 30 cm no stumbra	+
	16	Mietsakne, 5 cm no stumbra	-

Iegūtie dati par *H. annosum* nevienmērīgo izplatību rosināja veikt eksperimentu, kurā no katra koka tika ņemti pieci paraugi.

Inficētības pakāpes noteikšanai no iepriekš pārbaudītajiem 300 kokiem tika atlasīti 20 koki, kas pēc iepriekšējām analizēm uzrādīja negatīvu rezultātu un pieci koki, kas uzrādīja pozitīvu rezultātu. Lai pārbaudītu šo datu atkārtojamību, eksperiments pēc gada tika atkārtots. Abu eksperimentu rezultāti apkopoti 3.2. attēlā.



3.2. att. Individuālu koku inficētības ar *H. annosum* pakāpes noteikšanas rezultāti.

Rezultāti par atkārtoto eksperimentu atspoguļoti kā teorētiskā minimālā vērtība un teorētiskā maksimālā vērtība, jo dažiem no analizētajiem paraugiem nebija iespējams iegūt datus par visiem pieciem ņemtajiem paraugiem. Lielākoties inficētības līmenis atkārtotajā eksperimentā pieaug vai paliek nemainīgs, tomēr ir daži izņēmumi. Izņēmumu esamību varētu izskaidrot ar *H. annosum* nevienmērīgo izplatību, kas varētu novest pie tā, ka atkārtotajā eksperimentā analizēm paņemti paraugi, kas objektīvi nesatur *H. annosum*. Atkārtotā inficētības līmeņa noteikšanas rezultāti norāda, ka zemākās inficētības grupu (0/5 un 1/5) īpatsvars samazinās un augstākās inficētības grupu (2/5, 3/5, 4/5, 5/5) - palielinās. Tas liecina, ka pēc gada šo pašu koku inficētības līmenis ir lielāks, nekā pirmajā inficētības noteikšanas reizē un *H. annosum* sēne ir izplatījies priedes indivīdos.

Parastās priedes inokulācija ar *H. annosum*

Eksperimentālām vajadzībām tika inokulētas 30 gadu vecas priedes. Pēc parauga zemzīdas inokulēšanas lūksnē veidojās gareniska pigmentācija, kas vērsta uz augšu un uz leju no inokulēšanas vietas. Uz sāniem pigmentācija izplatījās minimāli. Šī pigmentācija tiek izmantota, lai raksturotu koku rezistenci pret *H. parviporum*, pieņemot, ka koki, kuros pigmentācijas izplatīšanās ātrums, kas norāda uz sēnes augšanas ātrumu, ir mazāks, ir salīdzinoši rezistentāki (Bodles et al., 2007). Arī doktora darba ietvaros inokulētajos kokos tika konstatētas pigmentācijas garuma atšķirības, salīdzinot dažādus kokus.

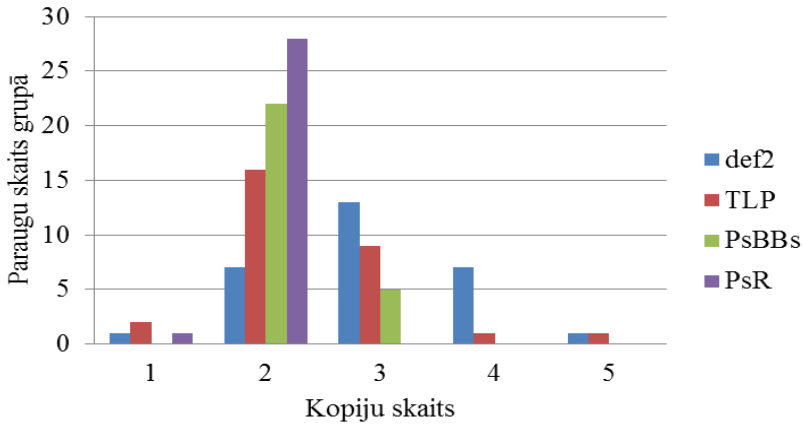
Tas, ka pigmentāciju izraisījusi *H. annosum*, tika apstiprināts, izmantojot iepriekš aprakstīto PQR metodi *H. annosum* noteikšanai. Analīzei tika ņemta koksne no pigmentācijas apgabala galējā punkta.

Ar rezistenci saistīto gēnu kopiju skaita analīžu rezultāti

Kandidātģēnu kopiju skaita analīzes tika veiktas divos soļos. Pirmajā solī, izmantojot reālā laika PQR ar SybrGreen fluorescento krāsu, tika veikts kandidātģēnu skrīnings – tika noteikti kandidātģēni ar lielāku iespēju, ka tiem novērojamas kopiju skaita variācijas. Otrajā solī atlasītie kandidātģēni tika analizēti, izmantojot reālā laika PQR ar TaqMan zondēm, kas ir dārgāka, bet precīzāka un robustāka tehnoloģija.

Pirmajā solī tika analizēti sekojoši kandidātģēni: *TLP*, *Def2*, *PsBBs*, *PsR*, *MYB2*, *COAR*, *CAD*, *COMT*, *C3HL*, *4CCAL*, *MYB4*, *TC4H*, *WRKY*, *Pal1*, *CCOMT*, *SCR1*, *CYP*, *ACS1*, *ACS2*, *Def1*. Relatīvais kopiju skaits tika noteikts 8 paraugiem *4CCAL*, *MYB4* un *TC4H* gēniem, septiņiem paraugiem *C3HL*, *CCOMT*, *COMT*, *MYB2*, *Pal1*, *SCR1* un *WRKY* gēnam, un pieciem paraugiem *ACS1*, *ACS2*, *CYP*, *Def1*, *Def2*, *PsR*, *PsBBs* un *TLP* gēniem. Katram gēnam tika noteikta maksimālā amplitūda starp diviem dažādiem paraugiem, savstarpēji dalot parauga ar lielāko kopiju skaitu vērtību ar parauga ar mazāko kopiju skaitu vērtību.

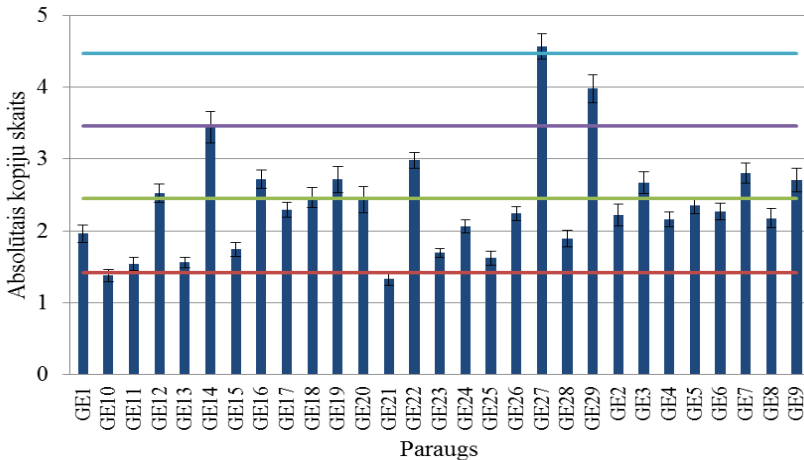
Otrajā solī analizēti četri kandidātģēni – *TLP*, *Def2*, *PsBBs* un *PsR*. Ir vairāk gēnu, kuru kopiju skaita variācija pirmajā CNV analīžu solī tika interpretēta kā iespējama, taču šie kandidātģēni, izņemot *CYP*, ir no lignīna biosintēzē iesaistīto kandidātģēnu un transkripcijas faktorus kodējošo kandidātģēnu grupām, kuru izpēte nebija primārais darba mērķis. *PsR* un *Def2* gēni, kuru kopiju skaita variācija tika novērtēta kā mazāk iespējama, tika izvēlēti apzināti salīdzināšanas nolūkiem. *CYP* gēns netika izvēlēts, jo ir ļoti maz informācijas par šī proteīna darbības mehānismiem. Diviem kandidātģēniem – *TLP* un *Def2*, kopiju skaita variācijas tika konstatētas. Ļoti uzskatāmi šos rezultātus ataino attēls 3.3.



3.3. att. Noteiktā absolūtā kopiju skaita frekvences analizētajiem gēniem.

TLP gēna kopiju skaita analīžu rezultāti

TLP gēna analīzes rezultāti attēloti 3.4. attēlā. Analizēti 29 paraugi. Iegūtie dati liecina, ka divu paraugu genomos TLP gēns ir 1 kopijā, 16 paraugu genomos – divās kopijās, deviņu paraugu genomos – 3 kopijās, vienā paraugā – četrās un vienā paraugā piecās kopijās.



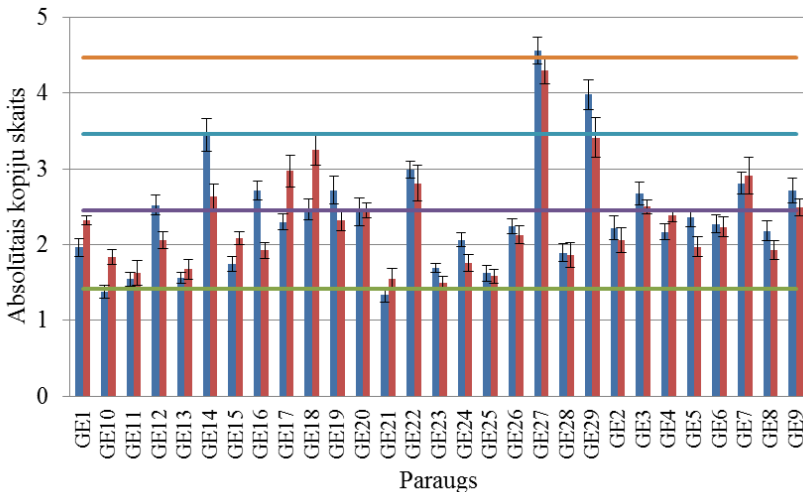
3.4. att. TLP gēna kopiju skaita analīzes rezultāti.

Stabiņi norāda analizēto paraugu TLP gēna absolūto kopiju skaitu. Horizontālās līnijas sadala paraugus grupās, vadoties pēc to TLP gēna kopiju skaita. Sākot no apakšējās, tās nodala paraugus ar vienu TLP gēna kopiju no paraugiem ar divām šī gēna kopijām, katrā nākamā līnija atdala paraugu grupu ar lielāku TLP gēna kopiju skaitu.

CNV analīžu rezultātu ticamības kritērijs – Z vērtība visiem paraugiem gan *TLP* gēna CNV analīzēs, gan citu gēnu CNV analīzēs ir normas robežās, t. i., mazāka par 2.

Visos otrā CNV analīžu soļa rezultātu grafikos ir horizontālas līnijas, kas apzīmē interpretācijas robežas, kas nosaka paraugu grupu sadalījumu pa kopiju skaita absolūtajām vērtībām. Šīs robežas ir ģeometriskās vidējās vērtības starp 1 un 2, 2 un 3, 3 un 4, u.t.t.

Lai iegūtu lielāku ticamību iegūtajiem datiem, tika veikts eksperiments, kurā 3.4. attēlā redzamo rezultātu iegūšanai veiktajos eksperimentos izmantotā endogēnā kontrole – *GAPDH* gēns tika aizstāts ar *PsR* gēnu. *PsR* gēna kopiju skaita analīzēs netika atklāta kopiju skaita variācija (3.3. attēls, 3.8. attēls). Līdz ar to *PsR* gēns kļūst par piemērotu kandidātu endogēnās kontroles funkcijai. Iegūtie rezultāti, izmantojot *PsR* gēnu kā endogēno kontroli, bija ļoti līdzīgi rezultātiem, kuri tika iegūti ar iepriekš izmantoto endogēno kontroli (3.5. attēls). Iegūtie rezultāti apliecina to, ka noteiktais kopiju skaita polimorfisms nav rezultātu interpretācijas kļūda, ko būtu izraisījis kopiju skaita polimorfisms endogēnās kontroles gēnam.



3.5. att. *TLP* gēna kopiju skaita analīžu ar divām dažādām endogēnajām kontrolēm rezultātu salīdzinājums.

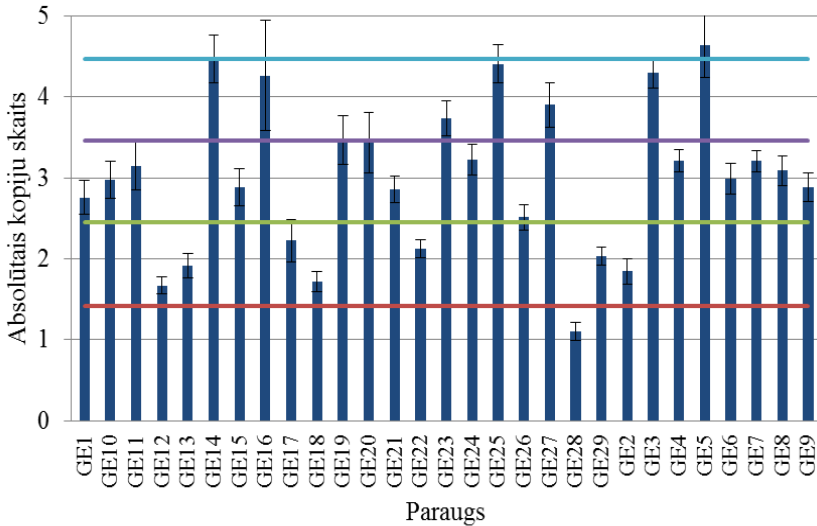
Zilais stabiņš norāda analizētā parauga *TLP* gēna absolūto kopiju skaitu analīzē, kurā kā endogēnā kontrole izmantotā *GAPDH* gēns, bet sarkanais stabiņš – *TLP* gēna absolūto kopiju skaitu, ja kā endogēno kontroli izmanto *PsR* gēnu. Horizontālās līnijas sadala paraugus grupās, vadoties pēc to *TLP* gēna kopiju skaita. Sākot no apakšējās, tās nodala paraugus ar vienu *TLP* gēna kopiju no paraugiem ar divām šī gēna kopijām, katra nākamā līnija atdala paraugu grupu ar lielāku *TLP* gēna kopiju skaitu.

Lai arī dažiem paraugiem, salīdzinot analīzes, kas veiktas ar dažādām endogēnajām kontrolēm, mainās rezultātu interpretācija, to tendence ir līdzīga, un, visticamāk, tas ir paraugu sagatavošanas reālā laika PQR analīzēm neprecizitāšu rezultāts. *Z* vērtību salīdzinājums norāda uz to, ka nevienam paraugam *Z* vērtība nav lielāka par 2, neatkarīgi no izmantotās endogēnās kontroles. Nav vērojama tendence, ka *Z* vērtības, izmantojot kādu no endogēnajām kontrolēm būtu zemākas vai augstākas, salīdzinot ar otru. Šādai gēnu kopiju skaita analīžu datu interpretācijai, kas tika izmantota pētījumā, nepieciešams liels skaits kontroles paraugu, kuriem analizētā gēna kopiju skaits būtu zināms jau iepriekš, bet šādu paraugu nav, jo līdzīgas analīzes parastajai priecī nav veiktas. Datu interpretācijai par kontroles paraugiem tika atlasīti paraugi no analizēto paraugu kopas. Iespējams, ka kāds no kontroles paraugiem tika izvēlēts nepareizi, tomēr tas varētu izskaidrot tikai visas paraugu grupas nobīdes uz augšu vai uz leju analīžu rezultātos, nevis dažādu interpretāciju rezultātos, kas iegūti, izmantojot dažādās endogēnās kontroles. Tā kā iegūtie dati sakrīt ļoti labi, un dažādo kandidātģēnu analīzēm izmantotie paraugi ir vieni un tie paši, tika nolemts citu kandidātģēnu analīzēm par endogēno kontroli izmantot tikai *GAPDH* gēnu.

TLP gēnam tika noteikta gēnu kopiju skaita variācijas esamība un tika konstatēts, ka kopiju skaita izmaiņas sakrīt ar analizēto koku ģimenes struktūru. *TLP* gēna gadījumā visiem Ja3 ģimenes kokiem, izņemot paraugu GE 20, kas ir ļoti tuvu robežai, *TLP* gēna kopiju skaits ir lielāks par divi.

***Def2* gēna kopiju skaita analīžu rezultāti**

Defenzīna 2 gēna kopiju skaita analīžu rezultāti redzami 3.6. attēlā. Analizēti 29 paraugi. Iegūtie dati liecina, ka viena parauga genomā šis gēns ir vienā kopijā, septiņu paraugu genomos *Def2* gēns ir divās kopijās, 13 paraugu genomos – trīs kopijās, septiņos paraugos – četrās, un vienā paraugā piecās kopijās.



3.6. att. Defenzīna 2 gēna kopiju skaita analīžu rezultāti.

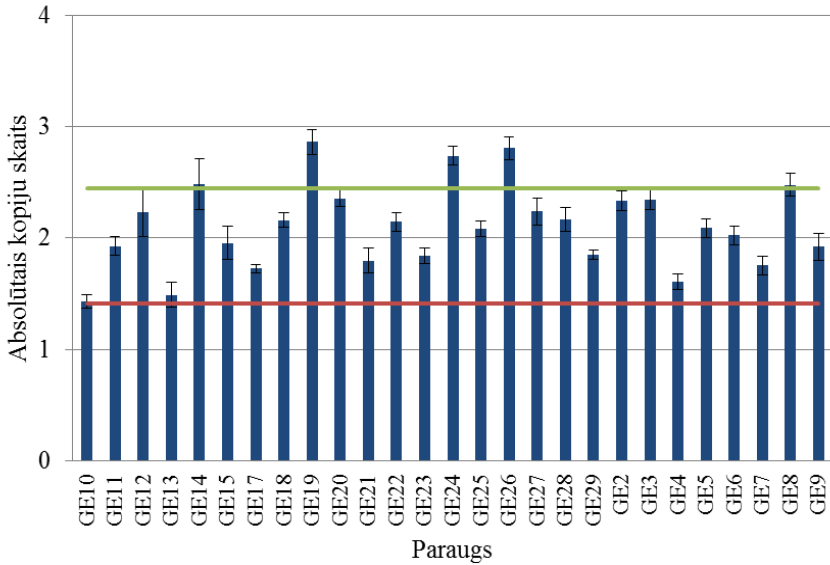
Stabiņi norāda analizēto paraugu *Def2* gēna absolūto kopiju skaitu. Horizontālās līnijas sadala paraugus grupās, vadoties pēc to *Def2* gēna kopiju skaita. Sākot no apakšējās, tās nodala paraugus ar vienu *Def2* gēna kopiju no paraugiem ar divām šī gēna kopijām, katra nākamā līnija atdala paraugu grupu ar lielāku *Def2* gēna kopiju skaitu.

Def2 rezultātu Z vērtību apkopojumā nav paraugu, kuri tuvotos vērtībai „2”, kas ir maksimālā pieļaujamā vērtība.

Arī *Def2* gēna analīzē iegūtajie rezultāti sakrīt ar ģimenes struktūru - visiem ģimenes Ja15 pārstāvjiem ir vismaz trīs šī gēna kopijas. Paraugiem GE16, GE3, GE7, GE27, un, iespējams, paraugam GE20 ir lielāks skaits gan *Def2*, gan *TLP* gēna kopiju. Nav zināms, cik tuvu šie gēni atrodas genomā, un vai tika dublicēts genoma fragments, kurā atrodas abi šie gēni. Ir zināms, ka cilvēku genomā dublicēto fragmentu garums var pārsniegt 200 kb (Samonte & Eichler, 2002), tomēr šis process nav bijis pētīts priedē. Šis pētījums ir pirmais, kas ir uzrādījis gēnu kopiju skaitu variāciju parastajā priedē.

PsBBs gēna kopiju skaita analīžu rezultāti

Pinosilvīna sintāzes gēna kopiju skaita analīžu rezultāti redzami 3.7. attēlā. Analizēti 27 paraugi. Iegūti dati, ka, 22 paraugu genomos *PsBBs* gēns ir divās kopijās, bet piecu paraugu genomos – trīs kopijās.

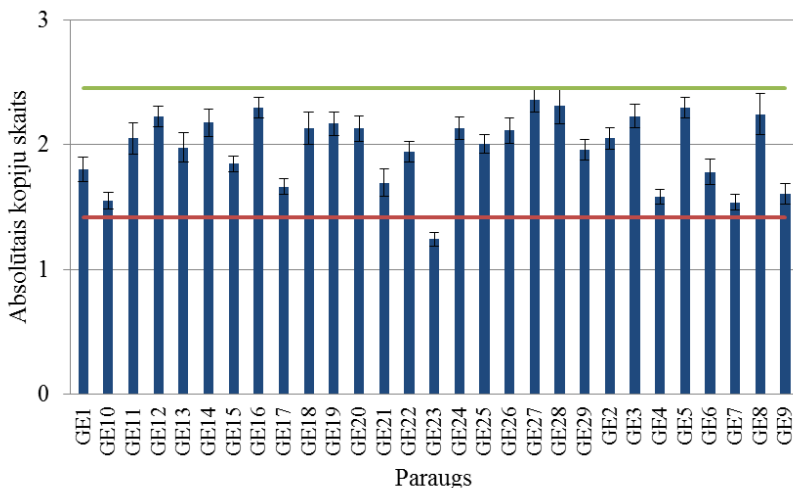


3.7. att. *PsBBs* gēna kopiju skaita analīžu rezultāti.

Stabiņi norāda analizēto paraugu *PsBBs* gēna absolūto kopiju skaitu. Horizontālās līnijas sadala paraugus grupās, vadoties pēc to *PsBBs* gēna kopiju skaita. Sākot no apakšējās, tās nodala paraugus ar vienu *PsBBs* gēna kopiju no paraugiem ar divām šī gēna kopijām, nākamā līnija atdala paraugu grupu ar lielāku *PsBBs* gēna kopiju skaitu.

PsR gēna kopiju skaita analīžu rezultāti

PsR gēna kopiju skaita analīzei tika ņemti 29 paraugi (3.8. attēls). Iegūti dati, ka viena parauga genomā šis gēns ir vienā kopijā, bet 28 paraugu genomos – divās kopijās. Lai gan pirmajā kopiju skaita analīžu solī tika konstatēta liela kopiju skaita variācijas iespēja, *PsR* gēna analīze otrajā solī ieguva vēl viendabīgākus rezultātus, nekā *PsBBs* gēna kopiju skaita analīze.



3.8. att. *PsR* gēna kopiju skaita analīžu rezultāti.

Stabiņi norāda analizēto paraugu *PsR* gēna absolūto kopiju skaitu. Horizontālās līnijas sadala paraugus grupās, vadoties pēc to *PsR* gēna kopiju skaita. Sākot no apakšējās, tās nodala paraugus ar vienu *PsR* gēna kopiju no paraugiem ar divām šī gēna kopijām, nākamā līnija atdala paraugu grupu ar lielāku *PsR* gēna kopiju skaitu.

Gan *PsBBs* gēna, gan *PsR* gēna analīzē visi paraugi ar ļoti retiem izņēmumiem iekļaujas grupā ar divām gēna kopijām. Paraugiem, kas ir citās kopiju skaita grupās, starpība līdz divu kopiju grupai ir neliela, un varētu tikt izskaidrota ar paraugu sagatavošanas CNV analīzēm neprecizitātēm.

Palielināta *TLP* gēna kopiju skaita sakritība ar zemāku noteikto infekcijas pakāpi, kas aprakstīts sadaļā „*Heterobasidion annosum* klātbūtnes noteikšana augošos kokos”, netika konstatēta. Šāda sakritība netika konstatēta arī *Def2* gēnam. Tomēr šie dati nav pilnīgi piemēroti šādiem salīdzinājumiem, jo koki nav kontrolēti inficēti.

Ar rezistenci saistīto gēnu ekspresijas analīžu rezultāti

TLP gēna ekspresijas analīze

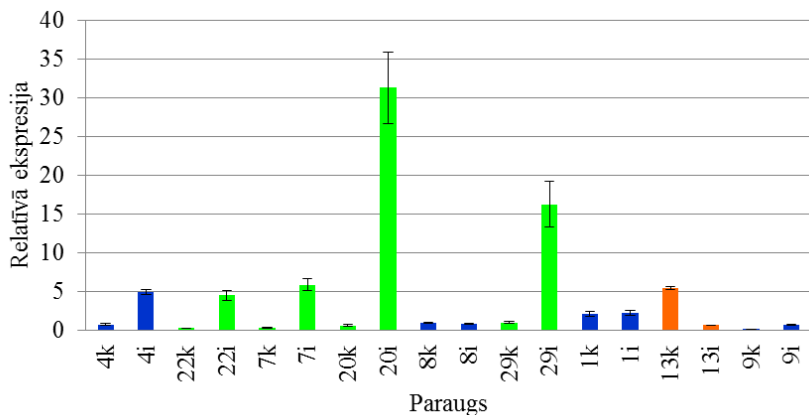
Gēnu ekspresijas analīzes veiktas deviņiem paraugu pāriem - kontrolei un paraugam, kas ievākts septiņas dienas pēc inokulēšanas.

Sešiem no deviņiem paraugu pāriem novērots *TLP* gēna ekspresijas pieaugums paraugos pēc inokulācijas. Diviem paraugu pāriem ekspresija būtiski nemainījās, bet viens paraugu pāris uzrādīja sākotnēji lielāku ekspresijas līmeni ar sekojošu ekspresijas pavājināšanos. Ekspresijas izmaiņas bija robežās no 0,12 reizēm (ekspresijas pazemināšanās) līdz 48,57 reizēm, salīdzinot ar atskaites paraugu. Aprēķinos izmantoti dati no 3.2. tabulas. Atskaites paraugs, pret kuru salīdzināta citu paraugu ekspresija bija paraugs 8k.

***TLP* gēna ekspresijas analīžu dati**

Paraugs	Relatīvā ekspresija	Attiecība starp kontroles un inokulēto paraugu
4k	0.78	6.30
4i	4.90	
22k	0.27	16.49
22i	4.52	
7k	0.30	19.30
7i	5.89	
20k	0.64	48.57
20i	31.28	
8k	1.00	0.82
8i	0.82	
29k	1.03	15.85
29i	16.27	
1k	2.09	1.06
1i	2.20	
13k	5.48	0.12
13i	0.67	
9k	0.16	4.60
9i	0.74	

Četri paraugu pāri bija no kokiem ar palielinātu *TLP* gēna kopiju skaitu, un pieci paraugu pāri – no kokiem ar normālu šī gēna kopiju skaitu. Iegūtie gēnu ekspresijas analīžu rezultāti liecina, ka neinficētā stāvoklī kokos ar palielinātu *TLP* gēna kopiju skaitu genomā ekspresija nav pastiprināta, salīdzinot ar paraugiem, kuru genomos šī gēna kopiju skaits ir normāls. Tomēr pēc infekcijas paraugos ar palielinātu *TLP* gēna kopiju skaitu šī gēna ekspresijas pieaugums ir lielāks nekā pārējos paraugos (3.9. attēls).



3.9. att. *TLP* gēna ekspresijas analīžu rezultāti.

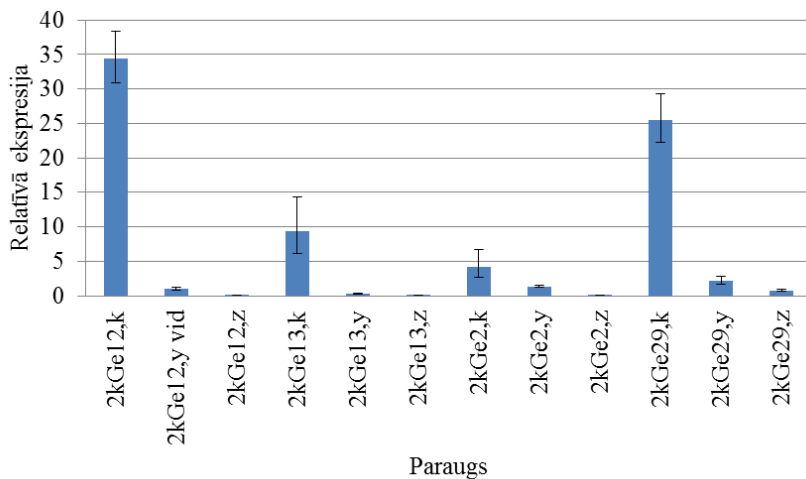
Zaļā krāsā atzīmēti paraugi, kuru *TLP* gēna kopiju skaits ir palielināts (visi no Ja3 ģimenes). Zilā krāsā paraugi ar normālu *TLP* gēna kopiju skaitu, oranžā krāsā paraugi ar atšķirīgiem ekspresijas rezultātiem (kontroles paraugam ekspresija lielāka, nekā inficētam, pretēji pārējiem paraugiem). Kontroles paraugiem aiz parauga numura ir indekss „k”, inokulētajiem paraugiem – indekss „i”.

Tas, ka ir novērojama šāda sakritība starp gēnu kopiju skaita analīzēm un gēnu ekspresijas analīzēm, vēlreiz pastiprina gēnu kopiju skaita analīzes rezultātu ticamību.

Def2 gēna ekspresijas analīze

Def2 gēna ekspresija tika noteikta 33 paraugiem no 15 dažādiem kokiem. Paraugi gēnu ekspresijas eksperimentiem tika ievākti pirms inokulēšanas, 7 dienas pēc inokulēšanas (d. p. i.) un 40 dienas pēc inokulēšanas. Iegūtie dati liecina, ka *Def2* gēna ekspresija pēc koka inficēšanas nevis pieaug, kā gadījumā ar *TLP* gēnu, bet ievērojami samazinās. Atskaites paraugs ir Ge12, 7 d. p. i. Ir trīs šī parauga atkārtējumi, grafikos izmantota vidējā vērtība, kas šajā tabulā uzrādīta kā „2kGE12,y vid.”

Paraugos, kuru genomos ir divas *Def2* gēna kopijas, šī gēna ekspresija turpina samazināties arī laika gaitā, bet trijos no četriem paraugu komplektiem vairs ne tik strauji (3.10. attēls).

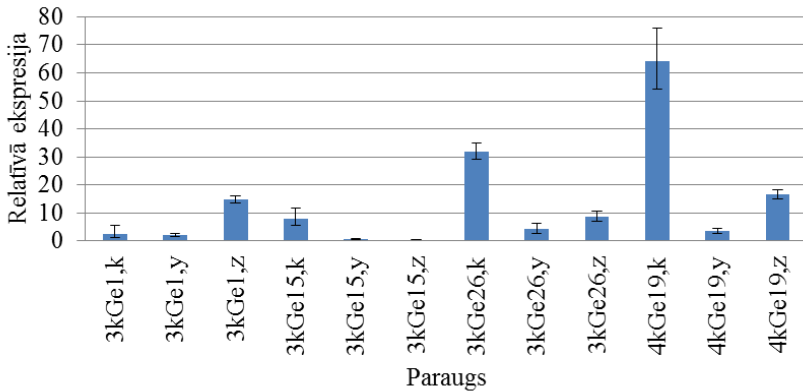


3.10. att. *Def2* gēna ekspresijas analīžu rezultāti.

Paraugu šifrējums: Pirmie divi simboli apzīmē *Def2* gēna kopiju skaitu šī parauga genomā, nākamie 3 – 4 simboli pirms komata ir parauga numurs, un simbols pēc komata nosaka parauga ievākšanas laiku: k – kontrole (neinficēts), y – ievākts 7 dienas pēc inficēšanas, z – ievākts 40 dienas pēc inficēšanas.

Ekspresijas līmenis, salīdzinot ar kontroles paraugu, septiņas dienas pēc inokulācijas pazeminās 3,12 līdz 33,73 reizes. Ekspresijas kritums, salīdzinot paraugus, kas ievākti 7 d. p. i. ar paraugiem, kas ievākti 40 d. p. i. ir robežās no 2,82 līdz 16,17 reizēm, izņemot paraugu Ge2, kur ekspresija samazinās par 73,96 reizēm. Salīdzinot kontroles paraugus ar 40 d. p. i. ievāktajiem paraugiem, ekspresijas līmenis 40 d. p. i. ir 33,72 līdz 545,43 reizes zemāks nekā kontroles paraugos.

Paraugos, kuros *Def2* gēna kopiju skaits ir lielāks par divi, daļai no tiem *Def2* ekspresija paraugos, kas ievākti 40 dienas pēc inokulācijas, atkal palielinājās (3.11. attēls).



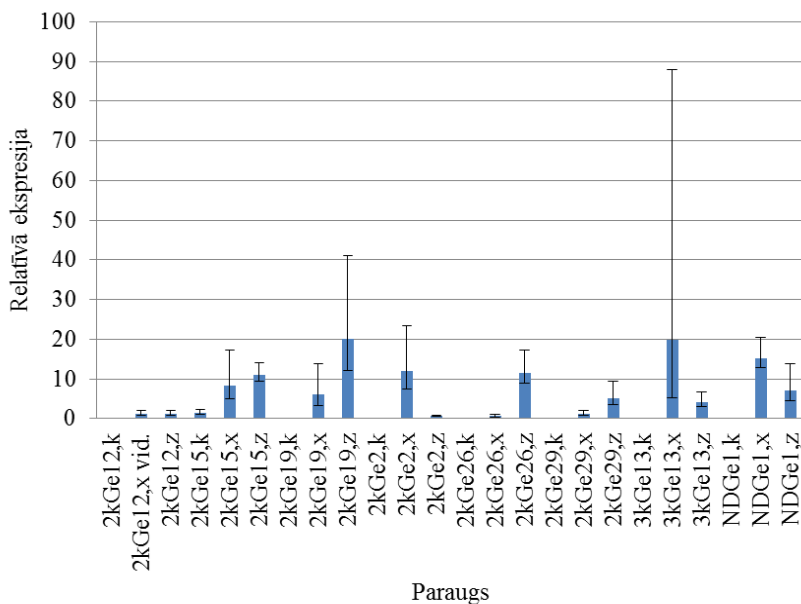
3.11. att. *Def2* gēna ekspresijas analīžu rezultāti paraugiem, kuros *Def2* kopiju skaits > 2.

Paraugu šifrējums: Pirmie divi simboli apzīmē *Def2* gēna kopiju skaitu šī parauga genomā, nākamie 3 – 4 simboli pirms komata ir parauga numurs, un simbols pēc komata nosaka parauga ievākšanas laiku: k – kontrole (neinficēts), y – ievākts 7 dienas pēc inficēšanas, z – ievākts 40 dienas pēc inficēšanas.

Def2 gēna ekspresijas noteikšanas analīzēs bija tādi paraugi, par kuriem dati par kādu no trim analīzes punktiem (kontroli, paraugu septiņas, un paraugu 40 dienas pēc inokulēšanas) nebija iegūstami. Šie paraugi grafikos nav iekļauti, lai tie netraucētu datu vizuālās atspoguļošanas saprotamībai. Viens no šiem paraugiem bija kontroles paraugs no indivīda ar *Def2* kopiju skaitu 3, kura relatīvā ekspresijas vērtība ir 190, kas ir salīdzinoši augsts ekspresijas līmenis un norāda uz iespējamu gēna kopiju skaita saistību ar ekspresiju *Def2* gēnam, tomēr tas ir tikai viens izņēmums, un kopumā kontroles paraugos neatspoguļojas parauga gēnu kopiju skaita ietekme uz ekspresiju. *Def2* gēna ekspresijas pieaugums paraugos, kas ievākti 40 dienas pēc infekcijas varētu būt saistīts ar *Def2* kopiju skaita atšķirībām, tomēr, lai par to pārliecinātos, būtu jāatkārto šī analīze ar lielāku paraugu skaitu, jo, kā redzams 3.11. attēlā, šāda parādība nav novērojama visos paraugos ar palielinātu *Def2* kopiju skaitu.

Pinosilvīna sintāzes gēna ekspresijas analīzes

Pinosilvīna sintāzes gēna ekspresijas analīzes tika veiktas 33 paraugiem no 15 dažādiem kokiem. Paraugi gēnu ekspresijas eksperimentiem tika ievākti pirms inokulēšanas, 7 dienas un 40 dienas pēc inokulēšanas. Šī gēna ekspresijas analīžu rezultāti norāda, ka šī gēna ekspresija pēc koka inokulācijas pieaug (3.12. attēls). Maksimālā relatīvā gēnu ekspresija ir aptuveni 20 reizes lielāka, nekā references paraugam. Viennozīmīga ekspresijas līmeņa atkarība no kopš inokulēšanas pagājušā laika rezultātos nav konstatējama.



3.12. att. *PsBBs* gēna ekspresijas analīzes.

Paraugu šifrējums: Pirmie divi simboli apzīmē *PsBBs* gēna kopiju skaitu šī parauga genomā (ND – nav datu), nākamie 3 – 4 simboli pirms komata ir parauga numurs, un simbols pēc komata nosaka parauga ievākšanas laiku: k – kontrole (neinficēts), y – ievākts 7 dienas pēc inficēšanas, z – ievākts 40 dienas pēc inficēšanas.

Ekspērimētā iegūtie dati norāda uz to, ka pirms inokulācijas šī gēna darbība pakļauta stingrai darbību apturošai kontrolei, jo ekspresija nav novērojama vai ir salīdzinoši neliela visos kontroles paraugos (3.12. attēls). Dažiem paraugiem nav aprēķināts minimālais un maksimālais relatīvās ekspresijas līmenis, jo kāds no tehniskajiem atkātojumiem reālā laika PQR reakcijā deva kvalitātes kritērijiem neatbilstošus rezultātus.

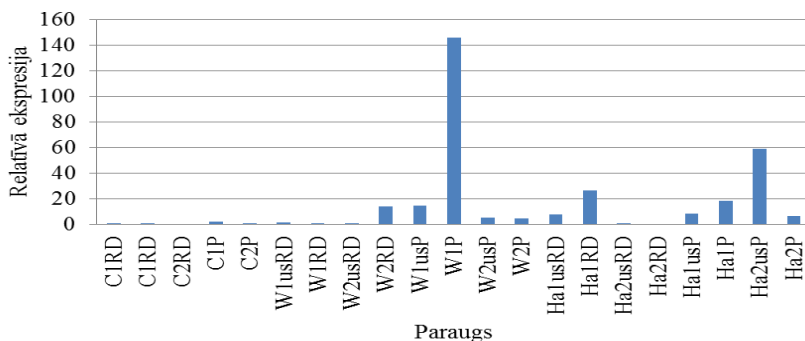
Vienīgais paraugs, kurā šī gēna kopiju skaits, iespējams, ir palielināts (GE13), neuzrāda būtiskas atšķirības no pārējiem paraugiem.

Gēnu ekspresijas analīzes dažādos priedes sējeņu audu tipos

Paralēli darbam par gēnu ekspresiju pieaugušos parastās priedes kokos tika veikti eksperimenti par šo pašu gēnu ekspresiju vienu gadu vecu sējeņu parenhīmas un sveķu aiļu audos. Eksperimenti tika veikti Norvēģijas meža un ainavu institūtā un Norvēģijas dabaszinātņu universitātes mikroskopijas centrā. Eksperiments tika veikts ar mērķi noskaidrot, vai pastāv atšķirības šo gēnu ekspresijā dažādos audos. Eksperimentam pieejamais laiks un materiālie

līdzekļi bija ierobežoti, līdz ar to paraugu apjoms ir neliels. Šis ir arī pirmais šāda veida pētījums par gēnu ekspresiju dažādos audos parastajā priedē.

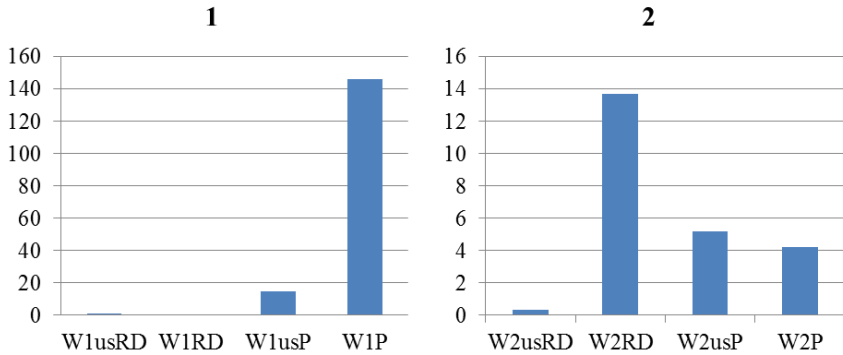
TLP gēna ekspresijas noteikšanai tika izanalizēts 21 paraugs. No tiem 5 kontroles paraugi, 8 paraugi no traumētiem sējeņiem un 8 paraugi no inficētiem sējeņiem (3.13. attēls). Kontroles paraugi ņemti no divu sējeņu parenhīmas un sveķu aiļu audiem. Arī traumēto sējeņu un inokulēto sējeņu paraugi ņemti no divu sējeņu parenhīmas un sveķu aiļu audiem, pie tam katra augu tipa paraugi ņemti gan no traumētās / inokulētās vietas sējeņa stumbrā, gan no neskartas vietas stumbra otrā pusē. *TLP* gēna ekspresijas analīzē konstatēts, ka gēna ekspresija pastiprinās pēc sējeņu traumēšanas vai inokulēšanas. Lielākā relatīvās ekspresijas vērtība novērota traumēta sējeņa parenhīmas audos (aptuveni 146), bet otra lielākā ekspresijas vērtība novērota inficēta sējeņa parenhīmas audiem no neskartās puses (aptuveni 59).



3.13. att. *TLP* gēna ekspresija dažādos audos atšķirīgos apstākļos.

Paraugu atšifrējums: C – paraugs no kontroles sējeņa, W – paraugs no traumēta sējeņa, Ha – paraugs no inokulēta sējeņa; sekojošais skaitlis norāda kontroles / traumētā / inokulētā sējeņa numuru; dažiem paraugiem seko kods „us”, kas norāda, ka paraugs ņemts no manipulācijai pretējās stumbra puses; pēdējie simboli: RD – sveķu ailes, P – parenhīma.

Tika konstatēta variācija starp paraugiem no traumētiem sējeņiem (3.14. attēls).

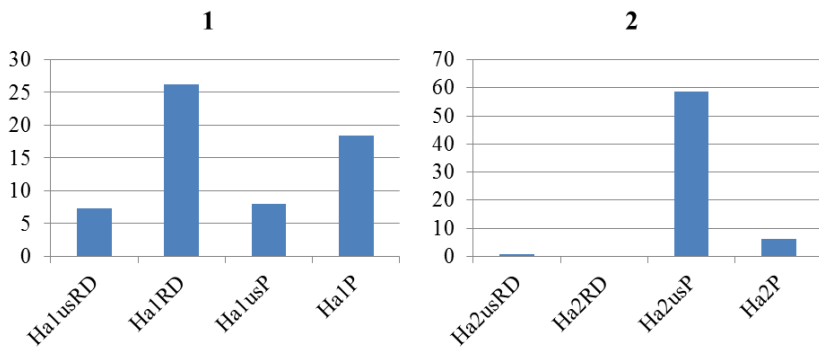


3.14. att. Variācija starp paraugiem no traumētiem sējeņiem *TLP* gēna ekspresijas analizē.

Paraugu atšifrējums kā 3.13. att. Uz X ass izvietoti paraugi. Y ass – relatīvā ekspresija. 1 – pirmā traumētā sējeņa audu paraugu *TLP* gēna ekspresijas analīzes rezultāti. 2 – otrā traumētā sējeņa audu paraugu analīzes rezultāti.

Paraugu no traumētiem sējeņiem analizē iegūtie dati norāda, ka, izņemot paraugu W1P, ekspresijas rezultāti ir līdzīgi. Lielākā variācija novērojama starp no pirmā sējeņa iegūtajiem paraugiem, un to izraisa W1P paraugs. Pirmā sējeņa paraugu analizēs paraugi no sveķu aiļu audiem uzrāda ļoti līdzīgu rezultātu, *TLP* ekspresija šajos paraugos ir zema, bet parenhīmas audu analīze norāda uz lielāku *TLP* gēna ekspresiju traumētajā pusē. *TLP* gēna ekspresija konstatēta arī paraugā, kas ņemts no traumēšanai pretējās stumbra puses. Otrā sējeņa paraugu analīzes rezultāti norāda uz augstāku ekspresijas līmeni sveķu aiļu audos no traumēšanas skartās stumbra puses un līdzvērtīgu ekspresiju abos parenhīmas paraugos.

Konstatēta arī variācija starp paraugiem, kas ņemti no inokulētiem sējeņiem (3.15. attēls).



3.15. att. Variācija starp paraugiem no inokulētiem sējeņiem *TLP* gēna ekspresijas analīzē.

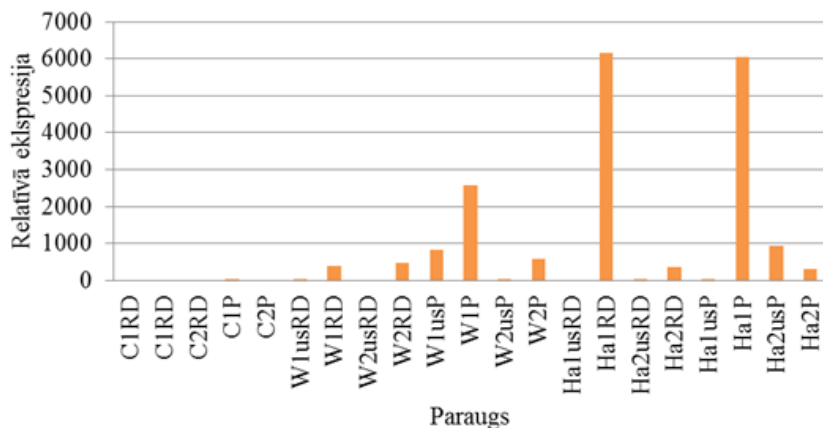
Paraugu atšifrējums kā 3.13. att. Uz X ass izvietoti paraugi. Y ass – relatīvā ekspresija. 1 – pirmā inokulētā sējeņa audu paraugu *TLP* gēna ekspresijas analīzes rezultāti. 2 – otrā inokulētā sējeņa audu paraugu analīzes rezultāti.

Analizējot *TLP* ekspresiju pirmā sējeņa paraugos, gan parenhīmas, gan sveķu aiļu paraugos no inokulācijas puses *TLP* gēna ekspresijas vērtības ir lielākas, nekā šo pašu audu paraugos no pretējās stumbra puses. Vērtību starpība starp abu audu tipu paraugiem, kas ņemti no dažādām stumbra pusēm, ir līdzīga. Paraugi no otra sējeņa analīzēs dod rezultātus, kas norāda, ka parenhīmas audos atbildes reakcija ir izteiktāka inokulācijas vietai pretējā stumbra pusē, un atšķirība starp parenhīmas audu paraugiem no dažādām stumbra pusēm ir lielāka, nekā novērots paraugiem no pirmā sējeņa. Sveķu aiļu audu paraugos no otrā inokulētā sējeņa ekspresija ir zema abos gadījumos.

Iegūtie dati liecina, ka *TLP* gēna ekspresija vairāk tiek pastiprināta parenhīmas audos, tomēr analizēto paraugu skaits ir neliels. Aprēķinot vidējo relatīvās ekspresijas vērtību traumētiem un inokulētiem sējeņiem no paraugiem, kas ņemti no abām stumbra pusēm, iegūstam, ka vidējā ekspresijas vērtība parenhīmā ir 32,7, bet vidējā ekspresijas vērtība sveķu aiļu audos ir 6,28. Ja līdzīgi tiek analizēti paraugi tikai no traumēto un inokulēto sējeņu stumbru daļas, iegūstam, ka vidējā ekspresijas vērtība parenhīmā ir 43,73, bet sveķu aiļu audos tā ir 10,15.

PsBBs gēna ekspresijas noteikšanai tika izanalizēts 21 paraugs. No tiem 5 kontroles paraugi, 8 paraugi no traumētiem sējeņiem, un 8 paraugi no inficētiem sējeņiem (3.16. attēls). Paraugu ievākšanas un sagatavošanas procedūra ir tāda pati kā aprakstīts par *TLP* gēna ekspresijas rezultātiem. *PsBBs* gēna ekspresijas analīzē konstatēts, ka gēna ekspresija pastiprinās pēc sējeņu traumēšanas vai inokulēšanas. Lielākais relatīvās ekspresijas līmenis novērots inokulēta sējeņa sveķu aiļu audos (relatīvās ekspresijas vērtība aptuveni 6146), bet otra augstākā relatīvās ekspresijas vērtība, 6040, konstatēta inficēta sējeņa

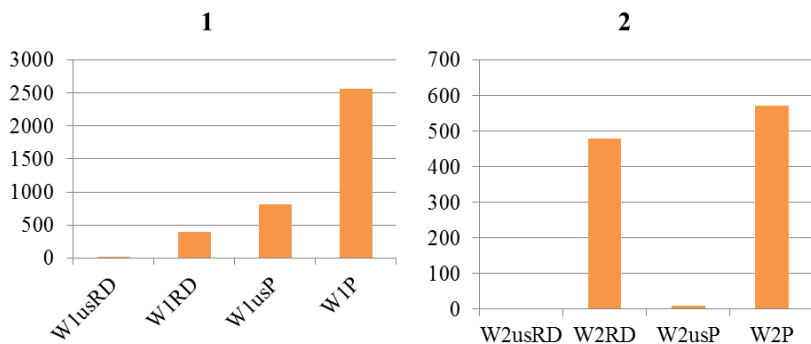
parenhīmas audos. Augstākā relatīvās ekspresijas vērtība traumēto sējeņu paraugu starpā ir konstatēta parenhīmā (aptuveni 2567). Gēna ekspresija netika konstatēta četros no pieciem kontroles paraugiem. Vienīgais izņēmums bija parenhīmas audu paraugs no pirmā kontroles sējeņa, taču konstatētā ekspresija ir niecīga, salīdzinot ar lielākajām vērtībām.



3.16. att. *PsBBs* gēna ekspresija dažādos audos atšķirīgos apstākļos.

Paraugu atšifrējums: C – paraugs no kontroles sējeņa, W – paraugs no traumēta sējeņa, Ha – paraugs no inokulēta sējeņa; sekojošais skaitlis norāda kontroles / traumētā / inokulētā sējeņa numuru; dažiem paraugiem seko kods „us”, kas norāda, ka paraugs ņemts no manipulācijai pretējās stumbra puses; pēdējie simboli: RD – sveķu ailes, P – parenhīma.

Tika konstatēta variācija starp paraugiem no traumētiem sējeņiem (3.17. attēls).

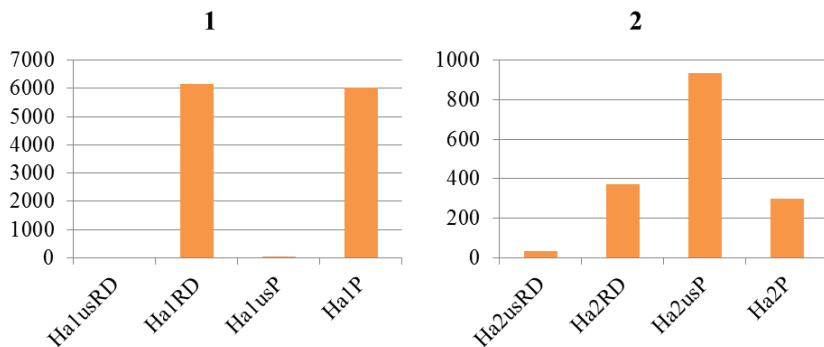


3.17. att. Variācija starp paraugiem no traumētiem sējeņiem *PsBBs* gēna ekspresijas analīzē.

Paraugu atšifrējums kā 3.16. att. Uz X ass izvietoti paraugi. Y ass – relatīvā ekspresija. 1 – pirmā traumētā sējeņa audu paraugu *PsBBs* gēna ekspresijas analīzes rezultāti. 2 – otrā traumētā sējeņa audu paraugu analīzes rezultāti.

Paraugos, kas iegūti no abiem traumētajiem sējeņiem, gēnu ekspresija paraugos no manipulācijas skartās puses ir lielāka nekā gēnu ekspresija šajos pašos audos, kas iegūti no manipulācijai pretējās stubra puses. Paraugos no abiem sējeņiem relatīvās ekspresijas vērtību starpība starp paraugiem no manipulācijas skartās un pretējās puses ir vismaz 379. Lielākā starpība ir starp parenhīmas paraugiem no pirmā traumētā sējeņa (~1752). Šī starpība ievērojami pārsniedz maksimālo vērtību paraugos no otrā traumētā sējeņa.

Konstatēta arī variācija starp paraugiem, kas iegūti no inokulētiem sējeņiem (3.18. attēls).



3.18. att. Variācija starp paraugiem no inokulētiem sējeņiem *PsBBs* gēna ekspresijas analizē.

Paraugu atšifrējums kā 3.16. att. Uz X ass izvietoti paraugi. Y ass – relatīvā ekspresija. 1 – pirmā inokulētā sējeņa audu paraugu *PsBBs* gēna ekspresijas analīzes rezultāti. 2 – otrā inokulētā sējeņa audu paraugu analīzes rezultāti.

Inokulētajos paraugos lielākā novērotā starpība starp paraugu no manipulācijas skartās puses un stumbra pretējās puses ir ~ 6146, kas pārsniedz maksimālo no otra inokulētā sējeņa iegūtā parauga vērtību vairāk nekā 6,5 reizes. Trijos no četriem paraugiem ekspresija ir stiprāka manipulācijas skartajā pusē.

Aprēķinot vidējo relatīvās ekspresijas vērtību traumētiem un inokulētiem sējeņiem no paraugiem, kas iegūti no abām stumbra pusēm, iegūstam, ka vidējā ekspresijas vērtība parenhīmā ir 1409,62, bet vidējā ekspresijas vērtība sveķu aiļu audos ir 930,35. Ja līdzīgi tiek analizēti paraugi tikai no traumēto un inokulēto sējeņu stumbru manipulācijas skartās daļas, vidējā ekspresijas vērtība parenhīmā ir 2369,76, bet sveķu aiļu audos tā ir 1847,92. Šie dati liecina, ka traumētos vai inokulētos sējeņos vienu dienu pēc manipulācijas lielāka *PsBBs* gēna ekspresija ir parenhīmas šūnās. Ja izrēķina vidējo ekspresijas līmeni, tikai traumētos vai tikai inokulētos paraugos, vidējais ekspresijas līmenis traumētu sējeņu sveķu aiļu audos manipulācijas pusē ir 436,73, bet parenhīmai šiem pašiem paraugiem vidējais ekspresijas līmenis ir 1569,75. Inokulētos sējeņos ekspresijas vidējā vērtība sveķu aiļu audu paraugos no manipulācijas puses ir 3259,09, bet parenhīmas paraugos tā ir 3169,75. Vienīgi inokulētu sējeņu sveķu aiļu audos *PsBBs* gēns ir ekspresēts spēcīgāk nekā parenhīmā, tomēr starpība ir neliela. Šo datu apstiprināšanai būtu jāveic papildus eksperimenti, jo analizēto paraugu skaits ir pārāk neliels, lai izdarītu drošus secinājumus. No iepriekšējiem salīdzinājumiem izriet arī tas, ka *PsBBs* gēna ekspresija inokulētos paraugos ir lielāka nekā traumētos paraugos.

4. DISKUSIJA

Nodaļai doktora disertācijā veltītas 15 lappuses un 1 attēls.

Eksperimentu plānojums

Līdz šim zinātniskajā literatūrā visbiežāk sastopamā pieeja molekulāri ģenētiskos pētījumos par ar rezistenci saistītām izmaiņām ir pētījumi par gēnu ekspresijas izmaiņām. Doktora darba mērķu sasniegšanai tika izvēlēta cita pieeja - vispirms analizēt kandidātģēnu kopiju skaitu. Izvēles pirmais iemesls bija pieejamības piemērotam materiālam gēnu ekspresijas analizēm trūkums, jo, izmantojot mežaudzē augošus kokus, grūti nodrošināt kontrolētus eksperimentālus apstākļus. Piemēram, pirms inokulēšanas koki var būt dabiski inficēti ar patogēnu, pret kuru vērstā priedes rezistence tiek pētīta vai ar citiem patogēniem. Šāda blakusinfekcija var novest pie izmainītas gēnu ekspresijas. Ir pierādīts, ka eglēs eksistē ierosinātā rezistence (Krokene et al., 1999) – ja koks tiek inficēts ar patogēnu, un pēc laika inficēšanu atkārtu, otrajā reizē patogēnam izplatīties saimniekorganismā ir grūtāk. Nav precīzi zināms, kā šis process atspoguļojas gēnu ekspresijā, un kuriem gēniem ir galvenā loma, bet gēnu ekspresija noteikti ir iesaistīta. Otrs iemesls bija tas, ka vairāku kandidātģēnu, piemēram, defenzīna 2 un taumatīnam līdzīgā proteīna gēna ekspresiju ietekmē ne tikai patogēnu sēnīšu invāzija priedē, bet arī abiotiski stresa faktori kā sausums un karstums, un eksperimentā izmantotās mežaudzes ietvaros mikroklimats var būt atšķirīgs. Līdz ar to ir komplicēti izmantot mežaudzes kokus uz gēnu ekspresijas datiem balstītiem pētījumiem par koku rezistences atšķirībām, jo nav zināms to fitosanitārais stāvoklis un šī stāvokļa ietekme uz inokulāciju. Trešais šo izvēli nosakošais faktors doktora darbā bija tas, ka gēnu ekspresijas analīžu veikšanai, no niecīga koksnes daudzuma (aptuveni 0,1 g) nepieciešams iegūt kvalitatīvu un koncentrētu RNS paraugu, kas priedes koksnes īpašību dēļ ir apgrūtināsi. CNV analizēm nepieciešama DNS, kuru vajadzīgā kvalitātē un daudzumā izdalīt ir krietni vieglāk. Tādējādi kopiju skaita analīzes izmantošanai meža koku izpētē ir priekšrocība, jo šīs analīzes izvēle par primāro dod iespēju ātrāk iegūt sākotnējos datus, no kuriem vadoties, plānot gēnu ekspresijas eksperimentus. Gēnu kopiju skaita un gēnu ekspresijas analīžu kombinēta lietošana dod lielāku ieskatu priedes rezistences mehānismu ģenētiskajos aspektos un, abu analīžu rezultātiem vienam otru papildinot, ļauj izdarīt drošākus secinājumus.

***H. annosum* klātbūtnes noteikšanas analīzes**

Pastāv vairākas PQR metodes *H. annosum* DNS detektēšanai, un šajā darbā izmantota metode, kura ir bijusi pārbaudīta *H. annosum* noteikšanā koksnes paraugos (Hantula & Vainio, 2003). Tomēr PQR metodes izmantotas tikai *H. annosum* detektēšanai koksnes paraugā, bet ne infekcijas līmeņa noteikšanā individuāliem kokiem. Kā aprakstīts sadaļā 3.1., ir iegūti rezultāti,

ka *H. annosum* izplatīšanās priedē ir izteikti nevienmērīga, līdz ar to analīzes, kurās no pārbaudāmā mežaudzes koka tiek ņemts viens koksnes paraugs, ir izmantojamas tikai vispārējas informācijas gūšanai par kopējo mežaudzes fitosanitāro stāvokli, bet ne par individuālu koku inficētību.

Pirms eksperimentu uzsākšanas *H. annosum* klātbūtnē eksperimentālajā plantācija tika konstatēta, atrodot *H. annosum* augļķermeņus uz vairākiem kokiem. Sākotnējā pārbaude (pārbaudīti 300 koki, viens paraugs no katra) apstiprināja, ka infekcijas līmenis plantācijā ir augsts, gandrīz 40 % no pārbaudīto koku deva pozitīvu rezultātu *H. annosum* DNS detektēšanas analīzē. Pārsteidzošs rezultāts bija tas, ka no četriem kokiem, uz kuriem tika atrasti *H. annosum* augļķermeņi, tikai divi deva pozitīvu rezultātu PĶR analīzē. Analizējot divu izraktu celmu daļēju sakņu sistēmu, tika iegūti rezultāti, kas liecina, ka *H. annosum* izplatība tajos ir ļoti nevienmērīga. PĶR rezultāti no paraugiem, kas ņemti ļoti tuvu viens no otra, piemēram, paraugi no sānsaknes centra un ārējās daļas un paraugi, kas ņemti ar 3 cm atstatumu no celma virspuses, uzrādīja dažādus rezultātus. Ņemot vērā to, ka celmu izrakšana ir ļoti darbietilpīgs process, un prasa koka nozāģēšanu, tika nolemts analizēt paraugus no augošu koku stumbru pamatnes, ņemot vairākus paraugus no katra koka. Detalizētākās analīzēs, izmantojot piecus paraugus no koka, noteiktā inficēto koku proporcija bija ievērojami augstāka (86%) nekā pirmajā analīzē, norādot, ka koku pārbaude, izmantojot vienu paraugu no koka dod daudz nepatiesi negatīvus rezultātus. Pirmajā inficētības līmeņa noteikšanas eksperimentā 16 paraugi uzrādīja infekcijas līmeni no 0/5 līdz 2/5, un deviņu paraugu inficētības līmenis bija no 3/5 līdz 5/5. Šie dati varētu nozīmēt, ka paraugi ar zemāku infekcijas pakāpi ir inficējušies vēlāk nekā deviņi paraugi ar augstāku inficētības līmeni. Telpiska paraugkoku atrašanās vietas korelācija ar infekcijas līmeni netika konstatēta. *H. annosum* infekcijas virzību plantācijā nebija iespējams noteikt. Cita iespēja, kas izskaidro paraugu ar zemu inficētības līmeni lielo proporciju, ir tas, ka šie indivīdi varētu izmantot rezistences faktorus, kas inhibē *H. annosum* izplatību kokā.

Atkārtotais inficētības līmeņa noteikšanas eksperiments tika veikts gandrīz gadu pēc pirmā inficētības līmeņa noteikšanas eksperimenta, līdz ar to *H. annosum* dabīgā izplatīšanās saimniekkokā ir ietekmējusi atkārtotā eksperimenta rezultātus. Ir aprakstīts, ka *H. annosum* izplatīšanās ātrums saknēs var sasniegt divus metrus gadā (Rishbeth, 1962). Salīdzinot abu eksperimentu datus, novērots, ka augstākas inficētības klases īpatsvars ir palielinājies atkārtotajā eksperimentā. To varētu izskaidrot ar *H. annosum* izplatīšanos kokā vienpadsmit mēnešu laikā pēc sākotnējā eksperimenta. Salīdzinot datus par viena indivīda inficētības līmeni abos eksperimentos, lielākajā daļā gadījumu ekspresijas līmenis palielinājās vai saglabājās nemainīgs, tomēr divos paraugos inficētības līmenis atkārtotajā eksperimentā samazinājās, kas, iespējams, ir paraugu ņemšanas izraisīts artefakts, kuru izraisījusi *H. annosum* nevienmērīgā izplatība stumbra pamatnē.

Ņemot vērā *H. annosum* nevienmērīgo izplatību parastajā priedē, lai izvairītos no nepatiesi negatīviem rezultātiem, nepieciešams infekcijas konstatēšanai un inficētības līmeņa noteikšanai analizēt vairākus paraugus no katra koka. Doktora darbā iegūtie rezultāti norāda, ka piecu paraugu izmantošana no katra koka sniedz individuālu koku inficētības līmeņa novērtējumu, tomēr noteiktais inficētības līmenis nav absolūts patogēna nevienmērīgās izplatības priedēs dēļ. Fakts, ka atkārtotajā eksperimentā lielākajai daļai paraugu inficētības līmenis palielinājās vai palika nemainīgs, norāda, ka piecu paraugu izmantošana no katra koka norāda aktuālo inficētības līmeni paraugos, un noteiktais inficētības līmenis norāda infekcijas attīstību laika gaitā. Nozīmīgs faktors, kas ierobežo no parauga analizēm ievācamo paraugu skaitu, ir koka stumbra diametrs. Analizētajā plantācijā paraugu skaita palielināšanai varētu būt negatīvs efekts. Pārbaudot kokus ar lielāku diametru būtu iespējams analizēm ievākt lielāku paraugu skaitu, novedot pie precīzākiem rezultātiem. Iespējams izmantot arī alternatīvas paraugu ievākšanas stratēģijas, piemēram, vertikālā virzienā pa koka stumbru. Alternatīvu parauga ievākšanas stratēģiju izmantošanas iespēju noskaidrošanai nepieciešams veikt papildus pētījumus par *H. annosum* izplatības raksturu priedes stumbra pamatnē.

Šajā darbā ir izstrādāta metode mežaudzes individuālu koku inficētības līmeņa noteikšanai. Ar šo metodi iegūtie dati ir ļāvuši konstatēt inficētības līmeņa atšķirības starp vairākiem paraugiem. Darbā iegūta informācija, kas norāda uz izteikti nevienmērīgu *H. annosum* izplatību parastās priedes stumbra pamatnē un sakņu sistēmā. Metodes pielietošana mežaudzēs vai plantācijās ļaus noteikt audzes vispārējo fitosanitāro stāvokli un identificēt potenciālas atšķirības rezistencē pret *H. annosum* starp paraugiem vai ģimenēm. Šādi dati varēs tikt izmantoti turpmākos rezistences pētījumos vai selekcijas programmās.

TLP un Def2 gēnu kopiju skaita analīzes

Sakritība starp *TLP* gēnu kopiju skaita analīzēm un gēnu ekspresijas analīzēm vēlreiz pastiprina gēnu kopiju skaita analīzes rezultātu ticamību. Palielināts noteikta gēna kopiju skaits var novest pie fenotipiskām izmaiņām. Cilvēka genoma pētījumos ir novērota sakritība starp palielinātu kopiju skaitu un pastiprinātu gēna ekspresiju (Chen et al., 2006). Šie rezultāti liecina arī par to, ka, ja šī gēna kodētais proteīns ir pietiekami efektīvs pret *H. annosum*, indivīdiem ar palielinātu šī gēna kopiju skaitu varētu būt palielināta rezistence pret *H. annosum*. Ir nepieciešams veikt pētījumus par *TLP* iedarbību pret *H. annosum*. Informāciju par gēnu kopiju skaitu atšķirībām antimikrobiālos proteīnus kodējošos gēnos un to iespaidu uz auga rezistences spējām varētu iekļaut priekšu selekcijas programmas atlases kritērijos. Tomēr proteīnu ekspresija ne vienmēr sakrīt ar gēnu ekspresiju, jo proteīnu ekspresija arī tiek pakļauta papildus regulācijai. Gadījumā, ja gēns, kura kopiju skaits ir palielināts, tiktu ekspresēts augā nepārtraukti, un pastāvētu sakritība starp

palielinātu kopiju skaitu un pastiprinātu gēna ekspresiju, šī gēna kodētais antimikrobiālais proteīns auga šūnās tiktu uzkrāts lielākā koncentrācijā nekā kokā ar normālu konkrētā gēna kopiju skaitu. Ja konkrētais antimikrobiālais proteīns būtu efektīvs pret *H. annosum*, minētajam patogēnam šo koku inficēt būtu grūtāk, ja infekcija tomēr notiktu, patogēna augšana būtu lēnāka. Slimības simptomi kokam izpaustos vēlāk vai, iespējams, līdz ciršanas vecumam neizpaustos nemaz. Gadījumā, ja palielināts kopiju skaits ir antimikrobiālam gēnam, kura darbība pastiprinās reakcijā uz patogēna invāziju, tas novedīs pie antimikrobiālā proteīna straujāka koncentrācijas pieauguma un lielākas gala koncentrācijas pēc infekcijas, padarot slimības progresu lēnāku.

Pirmā varianta gadījumā teorētiski ir iespējams, ka kāda antimikrobiālā proteīna līmenis priedes šūnās pirms infekcijas ir tik liels, ka tā nevar tikt inficēta, tomēr noderīga ir arī relatīvi lielāka rezistence pret patogēnu, nevis tikai absolūta rezistence. Palielinātam antimikrobiāla gēna skaitam varētu būt arī blakusefekti, piemēram, koka lēnāka augšana. Pie lēnākas augšanas varētu novest lielāka antimikrobiālā proteīna koncentrācijas izraisītas problēmas mikorizas veidošanās procesā. Cita iespējamība ir auga šūnu resursu novirze antimikrobiālā proteīna sintēzei, samazinot pieejamos resursus šūnas struktūrelementu sintēzei, novedot pie lēnākas augšanas vai koksnes blīvuma izmaiņām. Antimikrobiālos proteīnus kodējošo gēnu palielināta kopiju skaita ietekme uz šādiem priedes bioloģijas aspektiem vēl nav pētīta. Katra pretsēnīšu proteīna efektivitāte pret *H. annosum* var būt atšķirīga, tādējādi indivīds ar lielāku kāda gēna kopiju skaitu var neuzrādīt pastiprinātu rezistenci pret *H. annosum*, salīdzinot ar pārējiem indivīdiem. Būtu jāpievērš uzmanība indivīdu, kuru genomos lielākā kopiju skaitā ir vairāki ar rezistenci saistīti gēni, atlasei. Jāuzsver, ka patogēns, šajā gadījumā *H. annosum*, nemitīgi attīstās, un var ar laiku pielāgoties „labāku” genotipu inficēšanai

Šis ir pirmais darbs, kurā ir pētītas gēnu kopiju skaita variācijas priedē. Atsevišķi pētījumi būtu nepieciešami, lai novērtētu atklāto un potenciālo kopiju skaitu variāciju ietekmi uz fenotipu. Gēnu ekspresijas pētījumi ir tikai daļa no nepieciešamajiem eksperimentiem, nepieciešama plašāka fenotipisko pazīmju klāsta izpēte.

***PsBBs* un *PsR* gēnu kopiju skaita analīzes**

Lai gan *PsBBs* un *PsR* gēnu kopiju skaita analīžu dati norāda, ka šiem gēniem kopiju skaita variācijas ir maz ticamas, šie rezultāti tomēr ir lietderīgi, jo tie uzskatāmi parāda – parastajā priedē ir gēni, kuriem kopiju skaita variācijas ir sastopamas, un ir gēni, kuriem šādas variācijas sastopamas nav. Tas dod lielāku ticamību rezultātiem, pretējā gadījumā, ja visiem gēniem tiktu konstatētas gēnu kopiju skaita variācijas, analīžu rezultāti varētu šķist šaubīgi, jo kopiju skaita variācijas, vismaz cilvēku genomā, nepiemīt visiem gēniem. Par *PsR* gēnu ir zināms tas, ka priedē ir vairāki šim gēnam līdzīgi, kopā septiņi gēni (Li & Asiegbu, 2004b), bet NCBI datu bāzē pieejama tikai viena no šo

gēnu sekvencēm. Gadījumā, ja visas septiņas vai daļa no kopijām ir tik līdzīgas, ka šī gēna analīzēm konstruētie praimerī amplificē nevis vienu, bet vairāku šīs gēnu grupas pārstāvju fragmentus, gēnu kopiju skaita izmaiņu noteikšana tiktu apgrūtināta. Priedēs ir līdzīgu pinosilvīna sintāžu gēnu ģimene (Preisig-Müller et al., 1999), bet domājams, ka šie gēni ir atšķirīgi DNS sekvences līmenī, jo šo gēnu kodēto gēnu sintezēto proteīnu savstarpējā aminoskābju sekvences līdzība ir aptuveni 95 %. Tāpat kā *PsR* gēna gadījumā, ir noteikts, ka priedes genomā atrodas pinosilvīna sintāzes gēnu ģimene, kura sastāvā ir vairāki gēni, bet kopiju skaita variācijas nav pētītas (Preisig-Müller et al., 1999).

***TLP* gēna ekspresijas analīzes**

Apkopojot datus par veiktajiem gēnu ekspresijas eksperimentiem, var secināt, ka praktiskai izmantošanai interesantākie ir dati par *TLP* gēna ekspresiju, jo tie uzskatāmi norāda uz korelāciju starp gēnu kopiju skaitu un ekspresijas pieauguma līmeni pēc koka inokulēšanas. Analīžu rezultāti liecina, ka paraugos, kuriem iepriekš tika konstatēts *TLP* gēna kopiju skaits, kas lielāks par divi, šī gēna ekspresijas pieaugums pēc inokulēšanas ir lielāks, nekā paraugos ar *TLP* kopiju skaitu divi. Potenciālie šī novērojuma efekti un blakusparādības aprakstīti diskusijas nodaļā „*TLP* un *Def2* gēnu kopiju skaita analīzes”. Šajā darbā pirmo reizi tiek aprakstīta priedes gēna kopiju skaita izmaiņu sakritība ar šī gēna ekspresijas līmeni. *TLP* gēna ekspresija pēc inokulācijas nepieaug tik stipri kā *PsBBs* gēna ekspresija. Šādu secinājumu var izteikt balstoties uz to, ka *PsBBs* gēna ekspresijas analīzēs kontroles paraugu ekspresija gandrīz visiem paraugiem ir minimāla vai nav detektējama. Tā kā gēnu ekspresijas analīzēs tika izmantota relatīvās kvantitēšanas metode, indivīdos, kuru kontroles paraugos ekspresija nav detektējama, nevar noteikt ekspresijas pieaugumu. *TLP* gadījumā ekspresija tiek detektēta visos kontroles paraugos, kas var liecināt, ka šī gēna produkts tiek sintezēts nepārtraukti, kaut nelielos apjomos, un ir viens no auga aizsargsistēmas pirmajiem ieročiem pret patogēna invāziju. Ekspresija kontroles paraugos var nozīmēt arī to, ka šo gēnu regulējošie mehānismi ir jutīgāki pret dažādiem ārējās vides stresa faktoriem nekā *PsBBs* gēna darbību regulējošie mehānismi. *TLP* gēna ekspresijas pieaugums saskan arī ar literatūras datiem, kur aprakstīts, ka cits šīs gēnu grupas pārstāvis tiek pastiprināti ekspresēts pēc parastās priedes inokulēšanas ar *H. annosum* (Asiegbu et al., 2005b).

***Def2* gēna ekspresijas analīzes**

Dati par *Def2* gēna ekspresiju norāda, ka šī antimikrobiālā proteīna, kas ir aktīvs pret *H. annosum*, gēna ekspresija pēc koka inokulēšanas ar šo patogēnu samazinās. Turpretī Asiegbu darbā par parastās priedes gēnu ekspresijas izmaiņām dīgstos pēc inokulācijas ar *H. annosum* norādīts uz šīs gēnu grupas ekspresijas pieaugumu (Asiegbu et al., 2005b). Šeit jāprecizē, ka Asiegbu darbā šis konkrētais defenzīna gēns nav minēts, bet ir minēti vairāki

citi defenzīnu klases gēni. Šādu situāciju varētu izskaidrot arī ar to, ka *Def2* gēns citādi darbojas dīgstu vecumā. Ir zināms, ka gēnu darbība ir atkarīga no organisma vecuma, tāpēc abi skaidrojumi varētu būt iespējami.

Def2 gēna ekspresijas izmaiņu raksturs varētu liecināt par šī proteīna dalību primārajā aizsargreakcijā. To var pamatot ar iegūtajiem datiem, kas norāda, ka, lai arī pēc inokulēšanas šī gēna ekspresija krītas, sākotnēji *Def2* ekspresija ir samērā augstā līmenī (lielākais ekspresijas līmeņa kritums ir 33,73 reizes). Pretēji *TLP* gēnam, kurš varētu būt iesaistīts arī primārajā, ne tikai ierosinātajā aizsargreakcijā, jo kontroles paraugi uzrāda šī gēna ekspresiju, defenzīns 2, vadoties no iegūtajiem datiem, vismaz pieaugušos kokos, galvenokārt darbojas primārajā aizsargreakcijā. Iegūtie dati varētu liecināt, ka augs defenzīna 2 proteīna sintēzei miera apstākļos, t. i. pirms inokulēšanas, salīdzinot ar *TLP*, velta salīdzinoši lielus resursus, un pēc inokulēšanas pārslēdzas uz inducētās aizsargsistēmas izmantošanu, kurā svarīgāku lomu spēlē taumatīnam līdzīgais proteīns un pinosilvīna sintāze, kurus kodējošo gēnu ekspresija pēc inokulēšanas pastiprinās.

***PsBBs* gēna ekspresijas analīzes**

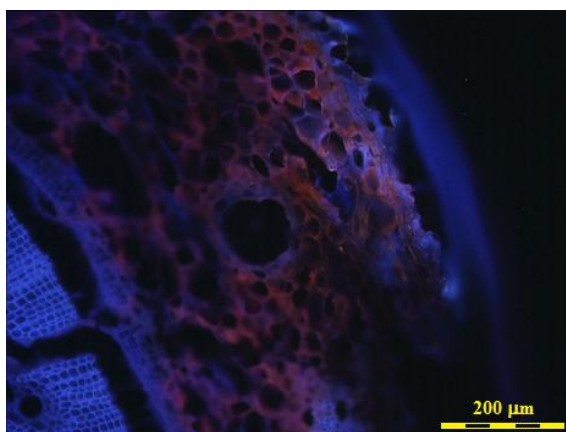
PsBBs gēna ekspresija pēc inokulēšanas pastiprinās. Ekspresijas kāpums pēc inokulēšanas ir liels, bet nav skaitliski izsakāms, jo lielākajā daļā kontroles paraugu šis gēns pakļauts tik lielai tā darbību nomācošai kontrolei, ka tā ekspresija nav detektējama. Iespējams, ka *PsBBs* gēna ekspresijas līmeņa kāpums ir samērojams ar šī gēna ekspresijas kāpumu vienu gadu vecos sējeņos, kurus analizējot ar nedaudz atšķirīgu metodi, tika iegūti dati, ka šī gēna ekspresija pieaug pat vairāk par 6040 reizēm. Ar tradicionālo gēnu ekspresijas analīzes metodi iegūtajiem datiem novērojamas lielas standartklūdas, un citus secinājumus kā vien to, ka ekspresija pēc inokulācijas palielinās, nav iespējams izdarīt. Šī gēna ekspresijas kāpums dod pamatu hipotēzei, ka pinosilvīnam, kas ir pinosilvīna sintāzes katalizētās reakcijas produkts, ir nozīmīga loma auga inducētajā aizsargreakcijā. Pinosilvīnam piemīt plaša spektra antimikrobiālas īpašības, līdz ar to varētu gaidīt, ka *PsBBs* gēna ekspresija netiek ierosināta specifiski tikai ar *H. annosum* infekciju.

Ekspresijas pieaugumu varēja prognozēt no iepriekšējiem pētījumiem par pinosilvīna sintāžu aktivitāti priedē (Preisig-Müller et al., 1999). Tomēr doktora darbā gūtie rezultāti par šī un citu gēnu ekspresiju ir unikāli, jo līdz šim lielākā daļa informācijas par gēnu ekspresiju ir iegūti no dīgstu vecuma augiem, inficējot tos ar *H. annosum* kontrolētos apstākļos, bet doktora darbā iegūtie rezultāti dod informāciju par šo gēnu ekspresiju pieaugušos kokos. Dati ir unikāli arī tādā ziņā, ka lielākā daļa iegūto datu par *Pinus sylvestris* gēnu darbību ir iegūti, izmantojot DNS mikročipu tehnoloģijas, kas ļauj analizēt daudzu gēnu darbību vienlaicīgi, tomēr šī analīze netiek uzskatīta par tik precīzu kā šajā darbā izmantotā reālā laika PĶR metode kvantitatīvā ziņā. Turklāt nav pieejams DNS čips, kurš būtu veidots no parastās priedes

ekspresēto sekvenču bāzes, tā vietā tiek izmantoti mikročipi, kuri satur radniecīgu organismu DNS. Rezultātā tiek iegūti dati, kas balstās uz salīdzinoši lielu līdzību nevis uz precīzu sakritību ar analizētajiem gēniem. Arī jebkura cita augstas produktivitātes ekspresijas pētīšanas sistēma analizētos datus salīdzina ar pieejamo informāciju datu bāzēs, kur informācijas par *P. sylvestris* sekvencēm ir salīdzinoši maz, līdz ar to iegūtie rezultāti tiek salīdzināti ar pēc iespējas radniecīgākām sugām.

Gēnu ekspresijas analīzes lāzera mikrosecēšanas mikroskopijas paraugiem

Izmantotajos vienu gadu vecajos sējeņos jau šajā vecumā sveķu ailes ir diezgan morfoloģiski diferencētas no parenhīmas. Par to var priest pēc fluorescentās mikroskopijas (4.1. attēls).



4.1. att. Vienu gadu veca parastās priedes sējeņa stumbra šķēsgriezums 200x palielinājumā. Fluorescentās mikroskopijas attēls.

4.1. attēlā zilas krāsas fluorescenci emitē lignīns, bet sarkanas krāsas fluorescenci emitē suberīns un hlorofils. Apļveida struktūra attēla vidū ir sveķu aile. Kā redzams, šūnas, kas veido sveķu aili (viena šūnu kārtā ap pašu kanālu), izskatās zilganas. Tas ļauj priest, ka šo šūnu struktūra un sastāvs ir atšķirīgs no apkārt esošo parenhīmas audu struktūras, tātad, šīs šūnas ir diferencētas.

Gan *TLP* gēna, gan *PsBBs* gēna ekspresija pēc traumēšanas un inokulēšanas palielinās. *PsBBs* gēna ekspresijas pieaugums reakcijā uz traumēšanu un inokulēšanu ir lielāks, nekā *TLP* gēna ekspresijas pieaugums, turklāt inokulēšana izraisa lielāku *PsBBs* gēna ekspresijas pieaugumu nekā sējeņu traumēšana. *PsBBs* gēna ekspresija kontroles paraugos praktiski nav detektējama. Šie rezultāti ir līdzīgi ar gēnu ekspresijas eksperimentos ar pieaugušiem kokiem iegūtajiem datiem. Šie rezultāti liek domāt, ka pinosilvīna sintāzes gēns miera apstākļos ir pakļauts stingrai tā darbību bloķējošai

regulācijai gan sēņos, gan pieaugušos kokos. Arī *TLP* gēna ekspresijas dati par kontroles paraugiem norāda uz šī gēna ļoti zemu ekspresiju, ja augs netiek pakļauts traumēšanai vai inokulēšanai, bet pieaugušu koku kontroles paraugos ekspresija tomēr, kaut nelielā līmenī, ir detektējama visiem analizētajiem kontroles paraugiem. To varētu izskaidrot vai nu ar atšķirīgu gēna darbību dažādos vecumos, vai ar to, ka sēņi, kas tika inkubēti kontrolētos apstākļos, tika pakļauti mazākam stresam, nekā pieaugušie koki mežaudzē.

Mehāniski traumētajiem un inokulētajiem paraugiem gan *TLP*, gan *PsBBs* gēnu ekspresijas analizēs novērotas ievērojamas atšķirības starp paraugiem no dažādiem sēņiem. Tomēr var secināt, ka abu gēnu ekspresija reaģē uz traumēšanu. Kā traumētos, tā arī inokulētos sēņos gēnu ekspresijas izmaiņas ir konstatējamas arī audu paraugos, kas ņemti no manipulācijai pretējās stumbra puses. Tas liecina, ka traumēšana / inokulācija sēņu stumbros *TLP* un *PsBBs* gēnu ekspresiju iespaido vismaz tādā attālumā, kas vienāds ar stumbra diametru. Tas liecina par signālu pārnese sistēmas darbību un efektu uz šī gēna ekspresiju attālos audos. Tomēr *PsBBs* gēna analizē, izņemot vienu paraugu, izteiktāka gēnu ekspresijas līmeņa reakcija ir manipulācijas skartajā stumbra pusē, gēnu ekspresijas izmaiņas pārsvarā lokalizētas traumēšanas / inokulācijas vietā. Salīdzinot parenhīmas un sveķu aiļu audus, rezultāti norāda uz to, ka *TLP* gēna ekspresija pēc traumēšanas / inokulēšanas vairāk pieaug parenhīmas audos, bet *PsBBs* gēna ekspresija paraugos no inokulētu sēņu manipulācijas skartās stumbra puses vairāk pieaug sveķu ailēs, kaut atšķirība nav liela. Salīdzinot pārējos paraugus no inokulētiem un traumētiem sēņiem, arī *PsBBs* ekspresija vairāk pastiprinās parenhīmā. Sveķu ailes priedēs pilda sveķus veidojošo metabolītu, tostarp pinosilvīna, koncentrēšanas un transporta funkciju. Veikto eksperimentu par vienu gadu veciem sēņiem rezultāti uzrāda, ka *PsBBs* gēna ekspresija sveķu aiļu audos nav palielināta, norādot, ka pinosilvīna biosintēzē šiem audiem varētu nebūt īpaša loma.

SECINĀJUMI

- Noteikts taumatīnam līdzīgā proteīna (*TLP*) un defenzīna 2 (*Def2*) gēnu kopiju skaita polimorfisms *Pinus sylvestris* genomā. Līdz šim gēnu kopiju skaita analīzes skuju kokiem nav veiktas.
- Noteiktas taumatīnam līdzīgā proteīna (*TLP*), *Pinus sylvestris* pinosilvīna sintāzes (*PsBBs*) un defenzīna 2 (*Def2*) gēnu ekspresijas izmaiņas pēc *P. sylvestris* inokulēšanas ar *H. annosum*. Noskaidrots, ka šo gēnu ekspresijas izmaiņas ir atšķirīgas, kas norāda uz šo gēnu dalību dažādos rezistences mehānismos.
- Konstatēta korelācija starp taumatīnam līdzīgā proteīna (*TLP*) gēna kopiju skaitu un ekspresijas pieaugumu.

- Lāzera mikrosecēšanas mikroskopija (LCM) kombinācijā ar gēnu ekspresijas analīzi sekmīgi izmantojama gēnu ekspresijas pētījumiem dažādos *Pinus sylvestris* sējeņu audu tipos.
- *Pinus sylvestris* parenhīmas un sveķu aiļu audos konstatēta ne tikai lokāla, bet arī sistēmiska *TLP* un *PsBBs* gēnu ekspresijas reakcija uz traumēšanu un inokulēšanu ar *H. annosum*.
- Taumatīnam līdzīgā proteīna (*TLP*) un defenzīna 2 (*Def2*) gēnu kopiju skaits nav saistīts ar *H. annosum* izraisītās priedes koksnes pigmentācijas izmēriem.
- Izstrādāta PĶR metode individuālu *P. sylvestris* koku inficētības līmeņa ar *H. annosum* noteikšanai. Konstatēts, ka *H. annosum* priedes stumbra pamatnē izplatās nevienmērīgi. Piecu stumbra pamatnes paraugu analīze no katra augoša priedes koka ir pietiekoša inficētības pakāpes un tās dinamikas raksturošanai.

GENERAL DESCRIPTION OF WORK

Topicality of the theme

In Latvia Scots pine is an economically important forest tree species. Scots pine comprises 47 % of forests managed by the joint stock Company “Latvijas Valsts Meži” and 74 % of pine forests are pure stands which promotes spread of species-specific diseases. Root rot is common in Latvian pine stands. This disease influences tree growth negatively, increases the possibility for trees to be wind-thrown and, ultimately, leads to withering of trees. In pine, root rot is hard to detect by visual inspection of trees, because symptoms may not be evident, even if half of the root system is damaged by this disease, and, in addition, similar symptoms can be caused by several pathogens. It is virtually impossible to decontaminate forest areas infected with the causative agent, fungus *Heterobasidion annosum*. It would be necessary to remove all infected roots from forest soil in order to decontaminate the forest area but even then fragments of infected roots could remain in the soil. In Latvia, root and butt rot caused by *Heterobasidion parviporum* in spruce stands causes losses of 800 – 4790 EUR per hectare (Gaitnieks et al., 2007). There is also a trend towards an increased number of diseased trees with increasing plantation age (Gaitnieks et al., 2007). Based on the similarities of *H. annosum* and *H. parviporum* economic losses inflicted by *H. annosum* in pine stands can be considered as substantial. The above mentioned factors ensure that research on the genetic aspects of Scots pine resistance against *H. annosum* root rot is of high importance.

The scientific aim of this doctoral thesis is to investigate variation in gene copy number, changes in gene expression after inoculation with *H. annosum* and correlation of gene copy number with gene expression for *P. sylvestris* genes involved with resistance against *H. annosum*. The **practical implication** of this doctoral research is to elaborate molecular genetic selection criteria for clones with increased resistance against *H. annosum* for Scots pine breeding programs. The scientific **tasks** of the doctoral research are:

- to determine copy number variation of resistance-linked genes of Scots pine,
- to perform gene expression analyses before and after inoculation of pine trees with *H. annosum* in order to gain information about changes in expression of these genes and to identify correlations with gene copy number,
- to investigate the use of laser capture microdissection for gene expression studies in various tissue types of Scots pine,
- to evaluate lesion length caused by tree inoculation with *H. annosum* and to determine correlation of lesion length with gene copy number,

- to elaborate a method for *H. annosum* infection level determination in mature pine trees.

Material used in the research

Experiments performed during this doctoral research utilised 300 trees from the experimental plantation near Kalsnava (experiment number in long-term scientific object register: 235, block 224 of Forest Research Station “Kalsnava”) and nine, trees from the experimental plantation near Zvirgzde (experiment number 27, block 193 of Vecumnieku forest district).

Methods utilised in the research

In this research the genetic aspects of Scots pine resistance against *H. annosum* root rot were studied using gene copy number variation analyses and gene expression analyses. For evaluation of the phytosanitary condition of individual Scots pine trees regarding *H. annosum* infection a PCR (polymerase chain reaction) based molecular genetics method was utilised.

Hypothesis of the doctoral thesis

Knowledge about the genetic aspects of Scots pine resistance against *H. annosum* root rot are potentially applicable in breeding programs of Scots pine.

Novelty and scientific relevance of the research

The novelty of this research is attested by the use of innovative methods regarding research of conifers in gene copy number variation and determination of the phytosanitary condition of individual trees. Although the molecular genetics method for determination of phytosanitary condition of individual trees is developed from the method for detection of *H. annosum* in wood samples reported by Hantula and Vainio, this method was adapted for a more exact characterisation of the phytosanitary condition of individual trees. To date, no research data have been published about resistance mechanisms at the molecular genetic level in mature *P. sylvestris* trees. This is the first study where gene copy number variations have been studied and detected in Scots pine genomes. For the first time, correlation of increased gene copy number with increase of expression of this gene in response to inoculation with *H. annosum* is described. Gene expression analyses in different tissue types of one year old Scots pine seedlings combining laser capture microdissection with gene expression analysis are also described for the first time.

Structure of the doctoral thesis corresponds to the above mentioned tasks and consists of 5 chapters:

1. *Literature overview.* In this chapter biology of the causative agent of Scots pine root rot, the fungus *Heterobasidion annosum* and resistance

mechanisms of Scots pine in particular and plants in general, and the proteins and genes involved are described in detail. General information about methods used in this doctoral research is provided.

2. *Material and methods.* In this chapter methods and mathematical operations used in the doctoral research are described in detail.
3. *Results.* This chapter provides a description about results of the doctoral research in logical order. Results are also illustrated using graphs and tables.
4. *Discussion.* Results of the experiments and potential implications of those results are discussed with emphasis on questions related to Scots pine resistance mechanisms against root rot.
5. *Conclusions.* Seven conclusions are summarised. Summarised conclusions comply with scientific tasks of this research.

The volume of the thesis of research is 107 pages, including 35 figures, 15 tables and 192 references. The final section contains 7 conclusions.

1. LITERATURE OVERVIEW

The chapter consists of 24 pages and 2 figures in the doctoral dissertation.

Root rot caused by *H. annosum* is one of most devastating conifer diseases in the Northern hemisphere. Annual economic losses inflicted by *H. annosum s. lato.* infection reach 800 million EUR in Europe (Asiegbu et al., 2005a).

H. annosum is a necrotrophic organism, which means that in order to access nutrients it kills the cells of the host organism. Before 1978, *H. annosum* and *H. parviporum* were considered to be one species. In 1978, two intersterility groups of *H. annosum* were reported (Korhonen, 1978). Recently, these intersterility groups have been reclassified as two separate species – *H. annosum* (former intersterility group P) and *H. parviporum* (former intersterility group S) (Niemelä & Korhonen, 1998). This leads to a situation that in some cited publications, *H. annosum* refers to the wider species complex. However, the biology of both species is very similar except for their primary host (Korhonen, 1978). The designations *s. stricto* and *s. lato* are often used to indicate *H. annosum* separately or together with *H. parviporum*.

Both species mentioned above are found in Latvia. Besides those species, *Heterobasidion abietinum* can also be found in Europe. It primarily infects European silver fir *Abies alba* (Niemelä & Korhonen, 1998). These European species together with the American species *Heterobasidion irregulare* and *Heterobasidion occidentale* are termed the *Heterobasidion annosum* complex. There is on-going scientific debate about the inclusion of two Australian and New Zealand species, *Heterobasidion auraceae* and *Heterobasidion insulare*, into the *H. annosum* complex.

The genetic aspects of resistance against pathogenic fungi of *Heterobasidion* genus have been studied for a long time. Latvian scientists were also active in this field by trying to find correlations between resin contents in pulp and resistance as well as studying the influence of other factors on resistance (Lauska, 1970).

Several studies focusing on the influence of genetic factors in general on resistance against root rot in spruce have been performed, without in-depth studies of genes involved in resistance mechanisms (Wallendorf & Thomsen, 2008; Swedjemark & Karlsson, 2004a; Swedjemark & Karlsson, 2004b; Bodles et. al., 2007). One of conclusions of those studies is that a significant difference in *H. parviporum* growth rate exists between individual trees. The heritability coefficient (H^2) value of this resistance was determined to be 0.18. A significant positive correlation between tree size and pathogen growth rate was also detected but a genotype-dependent fungal growth rate by measuring lesion length after inoculation was not found (Swedjemark & Karlsson, 2004b).

Differences in resistance against root rot have also been identified between *P. sylvestris* individuals (Korshikov & Demkovich, 2008).

Until now, the general scientific opinion is that Scots pine or other conifer species individuals absolutely resistant against root rot have not been identified, however descriptions such as „resistant tree” and „resistant clone” are present in the scientific literature. Conifer resistance against root rot is difficult to prove in experimental plantations. The infection can be established for a long period without showing any symptoms. Artificial inoculation of the stem does not fully imitate natural infection because usually the pathogen spreads from one tree to another through root contacts. It is possible to inoculate seedlings, but results obtained using this approach may not be applicable to mature trees, as seedlings have been subject to genetic recombination processes. In addition, it is possible that defence mechanisms act differently at different ages.

Conifer resistance against root rot is complex. Resistance mechanisms involve several genes and their proteins, some of which are still unknown. Each gene individually and in different combinations of genes has a different effect on resistance of the individual. It is possible to use molecular genetics methods to study the complicated mechanisms of resistance more accurately in order to discover and characterise genes involved in resistance against root rot and to study effects of the action of these genes.

2. MATERIALS AND METHODS

The chapter consists of 24 pages, 1 figure and 2 tables in the doctoral dissertation.

Molecular genetics method for determination of presence of *H. annosum*

In order to successfully perform studies about the influence of genetic factors on resistance capabilities of pine against root rot caused by *H. annosum*, a method for determination of *H. annosum* DNA in a wood sample was adapted.

This method is described in a publication of Hantula and Vainio, 2003. It is based on PCR reaction making use of primers specific to *H. annosum*. The total DNA used for these analyses is extracted from wood or other tissues and the presence of *H. annosum* DNA within the total DNA sample is determined.

Trees from the experimental plantation near Kalsnava (experiment number in long-term scientific object register: 235, block 224 of Forest Research Station “Kalsnava”) were used in this experiment. Samples were collected using a 2 cm diameter round chisel. Samples were taken at the very base of the stem, sampling depth was 2 – 3 cm towards the pith. Wood fragments from the end closest to the pith were cut in the laboratory and used for DNA extraction.

Molecular genetic method for determination of infection level of individual trees

Sampling and analysis were performed as described previously, except that five samples were collected from every tree. After electrophoretic analysis, samples were grouped into six classes: 0/5, 1/5, 2/5, 3/5, 4/5 and 5/5 where the first number indicates the number of samples containing *H. annosum* DNA, and the second number indicates the number of analysed samples from one tree.

Inoculation of mature *P. sylvestris* trees with *H. annosum*

Sample inoculation is necessary for gene expression analyses if the experimental design includes studies of changes in gene expression in response of the pathogen. Mature trees were inoculated by placing agar-based LB medium containing actively growing *H. annosum* under the bark of the tree. For inoculation of mature trees *H. annosum* isolate *I Sm 15 92* was used, and in a pilot-experiment a more aggressive isolate *358* was used. In this experiment trees from the experimental plantation near Kalsnava (experiment number: 235, block 224 of Forest Research Station “Kalsnava”) and the experimental plantation near Zvirgzde (experiment nr. 27, block 193, Vecumnieku forestry) were used. Inoculation was performed at breast height.

Candidate-gene copy number variation analyses

Samples for gene copy number variation analyses were collected from 29 trees from the experimental plantation near Kalsnava (experiment nr. 235). Needles were collected for isolation of DNA. Some of trees used in this experiment belonged to half-sib (open-pollinated) families.

DNA isolation was performed following the protocol described in the section „Molecular genetic method for determination of presence of *H. annosum*”, with the exceptions that DNA was extracted from needles not from wood, and after DNA isolation an additional purification step to diminish concentration of PCR inhibitors was performed.

Exact information about DNA concentration is essential for copy number variation (CNV) analyses. Concentration of DNA samples was determined by spectrofluorimetry.

A relative quantification approach of the real-time PCR method was used for CNV analyses. In order to calculate the absolute copy number of genes analysed the protocol published by D’haene et al. was followed (D’haene et al., 2010). Z scores were calculated to estimate credibility of results gained after rescaling. If the absolute value of Z scores exceeds 2, the result is not credible.

Expression analyses of candidate genes involved in resistance against *H. annosum*

Samples were collected from inoculated trees at different time points after inoculation. Trees from experimental plantation near Kalsnava

(experiment number: 235) were used in gene expression experiments. In thaumatin-like protein (TLP) gene expression experiments, samples were collected at 1, 7 and 30 days post inoculation (d. p. i.) but in other gene expression experiments, the time points were 7 and 40 d. p. i. A control sample immediately before inoculation was also collected. RNA was extracted from collected samples and the concentration of RNA was measured using spectrofluorimetric method.

Real-time PCR relative quantification was used to characterise differences in gene expression between samples. This method compares samples to an arbitrarily chosen reference sample.

Gene expression analyses of pine sapling parenchyma and resin duct tissue samples

Gene expression analyses of pine sapling parenchyma and resin duct tissues were performed after laser capture microdissection (LCM) was used to dissect tissue samples.

In gene expression analyses utilising standard curves, the expression of the gene of interest and the endogenous control gene was determined in absolute values. The absolute value of relative expression for individual samples was determined by dividing the absolute value of candidate-gene expression with the absolute value of the endogenous control expression.

An absolute precondition in this method is existence of endogenous control real-time PCR data. In case endogenous control data are not available, the results about candidate gene expression cannot be characterised.

3. RESULTS

The chapter consists of 33 pages, 31 figure and 13 tables in the doctoral dissertation.

Determination of *Heterobasidion annosum* presence in living trees

A PCR method which allows the analysis of a large number of samples in a short period was chosen. After PCR amplification of DNA extracted from wood samples with *H. annosum* specific primers, DNA fragments of the expected size (approximately 100 bp) were produced. No products were detected in negative controls (figure 3.1.).

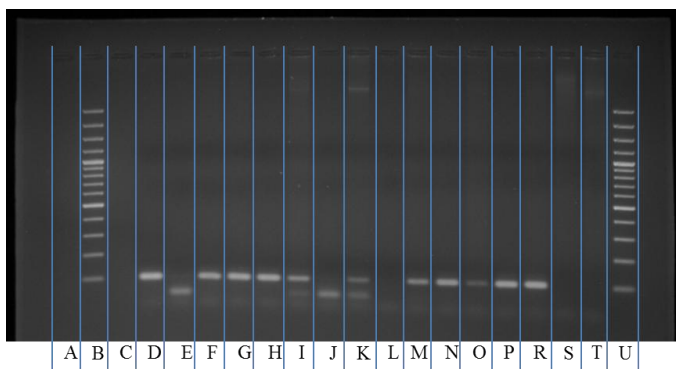


Figure 3.1. Electrophoresis analysis of PCR products of *H. annosum* specific PCR reaction.

In figure 3.1. lanes B and U contain DNA size standards. The size of shortest size standard fragment located closest to the bottom of picture is 100 bp. Lanes D – T contain samples, samples in lanes D, F, G, H, I, K, M, N, O, P and R are positive (DNA fragments of expected size have been amplified) but samples in lanes E, J, L, S and T are negative, they show only the presence of primer-dimers which are shorter in size than the *H. annosum* specific PCR fragment. Sample in lane C is the negative control, but lane A is empty.

To control for the quality of DNA used, positive PCR controls using primers specific to chloroplast DNA of Scots pine were performed.

The phytosanitary condition of a forest plantation in regard to *H. annosum* was characterised by analysing 300 trees. One sample per tree was analysed. Of the 300 trees analysed, 119 tested positive for *H. annosum* DNA. The only way of determining Scots pine infection with *H. annosum* by visual means is to find the fruiting body of this fungus on the base of the stem. Such fruiting bodies were found on four trees analysed, but two of these gave a negative result for the presence of *H. annosum* DNA. Such a result could be explained by the uneven distribution of *H. annosum* in infected trees. To clarify this, two trunks were excavated and analysed. One trunk was from a withered tree but the second – from a healthy tree (by visual inspection), upon which a *H. annosum* fruiting body had been detected. The results of the distribution of *H. annosum* in excavated trunks are presented in table 3.1.

Table 3.1.

Results of determination of spread of *H. annosum* in trunks

	Sample number	Location of sampling point	<i>H. annosum</i> DNA (+/-)
Trunk of healthy tree	1	Trunk, outside (1cm from bark)	+
	2	Trunk, 5cm from centre	-
	3	Trunk, 2cm from centre	+
	4	Lateral root #1, adjacent to trunk, outside	+
	5	Lateral root #1, adjacent to trunk, centre	+
	6	Lateral root #2, 10 cm from trunk	-
	7	Taproot, adjacent to trunk	-
	8	Taproot, 20 cm from trunk	+
Trunk of withered tree	9	Trunk, outside (1cm from bark)	-
	10	Trunk, 1cm from centre	-
	11	Lateral root #1, adjacent to trunk, outside	+
	12	Lateral root #1, adjacent to trunk, centre	+
	13	Lateral root #2, 5 cm from trunk, outside	-
	14	Lateral root #2, 5 cm from trunk, centre	+
	15	Tip of lateral root #3, 30 cm from trunk	+
	16	Taproot, 5 cm from trunk	-

Given the uneven distribution of *H. annosum* within pine trees, an experiment where five samples from each tree were analysed was performed. From the initial 300 trees analysed, 20 trees showing a negative result and 5 showing a positive result in detection of *H. annosum* DNA were chosen. In order to determine the repeatability of the analysis, the experiment was repeated after one year. Results of both experiments are summarised in figure 3.2.

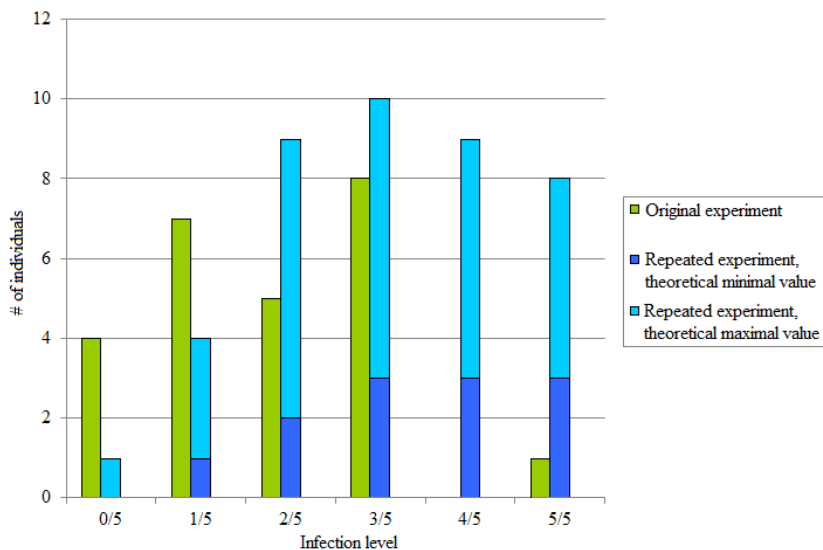


Figure 3.2. Results of determination of *H. annosum* infection levels in individual trees.

Results of the repeated experiment are depicted as theoretical minimal and theoretical maximal value because for some analysed sample trees it was not possible to acquire data about all five samples. A negative result for *H. annosum* detection was obtained for these samples, but the positive control reactions were also negative indicating insufficient DNA quality. Repeated collection of those samples was not performed because the small diameter of the trees (10 samples were already taken); and collection of additional samples could lead to withering of the trees. Infection levels were mostly the same or increased in the repeated experiment, however there were some exceptions. The exceptions could be explained with the uneven distribution of *H. annosum*. The results of the repeated experiment indicate that the proportion of samples in groups with low infection level (0/5 and 1/5) decreases and the proportion of samples included in sample groups 2/5, 3/5, 4/5 and 5/5 increases. Results suggest that the infection level increases during one year and that *H. annosum* has spread within the individuals.

Inoculation of Scots pine with *H. annosum*

Inoculation of mature trees was successful. After under bark inoculation, pigmentation formed in the phloem, spreading vertically up and down from the inoculation point. Horizontal spread of the pigmentation was minimal. This pigmentation has been used to characterise resistance against *H. parviporum* in spruce, assuming that trees in which the pigmentation (lesion) length is smaller

are comparatively more resistant (Bodles et al., 2007). In the doctoral research differences in pigmentation length when comparing different Scots pine trees inoculated with *H. annosum* were discovered.

It was confirmed that *H. annosum* was causing the pigmentation by using the PCR assay for detection of *H. annosum* DNA described above. For PCR analysis wood fragments from the ends of the pigmented area, the furthest distance from the inoculation point were used.

Results of copy number variation analyses of candidate resistance genes

Candidate-gene copy number variation analyses were performed in two steps. In the first step candidate-gene screening was performed by use of real-time PCR with SybrGreen fluorescent dye, and candidate-genes with an increased possibility of copy number variation were identified. In the second step, selected candidate-genes were analysed by real-time PCR using TaqMan probes which is a more expensive but also more exact and robust technology.

In the first step following candidate-genes were analysed: *TLP*, *Def2*, *PsBBs*, *PsR*, *MYB2*, *COAR*, *CAD*, *COMT*, *C3HL*, *4CCAL*, *MYB4*, *TC4H*, *WRKY*, *Pal1*, *CCOMT*, *SCR1*, *CYP*, *ACS1*, *ACS2*, *Def1*. For genes *4CCAL*, *MYB4* and *TC4H* relative gene copy number was determined in 8 samples. For genes *C3HL*, *CCOMT*, *COMT*, *MYB2*, *Pal1*, *SCR1* and *WRKY* relative gene copy number was determined in 7 samples. For *ACS1*, *ACS2*, *CYP*, *Def1*, *Def2*, *PsR*, *PsBBs* and *TLP* relative gene copy number was determined in 5 samples. For each gene the maximal amplitude comparing two different samples was determined.

In the second step four candidate-genes - *TLP*, *Def2*, *PsBBs* and *PsR*. There were additional genes where copy number variation was possibly detected in the first step but these candidate-genes, with the exception of *CYP*, were from lignin biosynthesis and transcription factor gene groups. The *CYP* gene was not chosen for further analysis as there is very little information about mode of action of this protein. For two candidate-genes – *TLP* and *Def2*, copy number variations were detected (Figure 3.3).

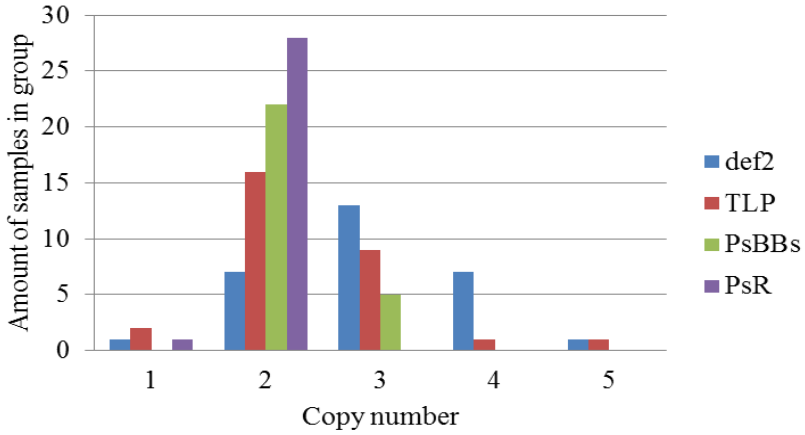


Figure 3.3. Absolute copy number frequencies for analysed genes.

Results of gene copy number analyses of *TLP* gene

Results of gene copy number analyses of *TLP* gene are depicted in figure 3.4. 29 samples were analysed. Results indicate that in genomes of two samples *TLP* gene is present in one copy, in genomes of 16 samples – in two copies, in genomes of nine samples – in three copies, in one sample – in four copies and in the genome of one sample this gene is presented in five copies.

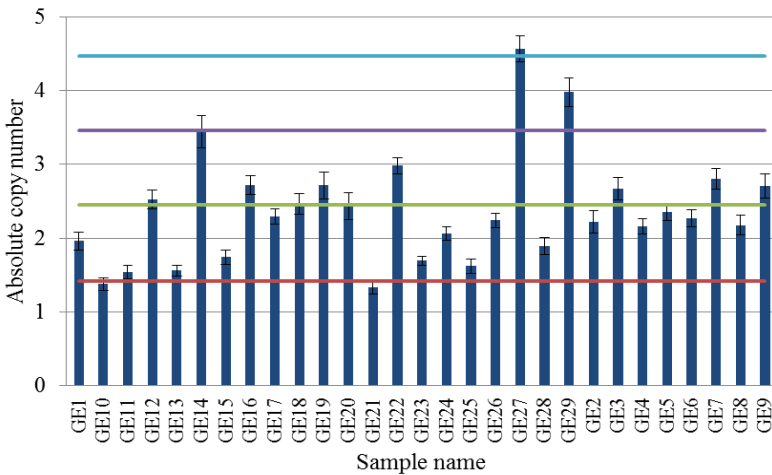


Figure 3.4. Results of gene copy number analyses of *TLP* gene.

The bars indicate values of absolute copy number of *TLP* gene. Samples are divided in groups according to copy number of *TLP* gene by horizontal lines.

Credibility criteria of CNV analyses – the Z score for all samples in CNV analyses of *TLP* and all other genes was in an acceptable range, e. g. the absolute value of Z score is less than two.

In figures depicting results of CNV analyses there are horizontal lines which divide samples into groups with different values of gene copy number. These boundaries are delineated by the geometrical mean values between adjacent whole numbers.

In order to increase the credibility of data an additional experiment was performed in which endogenous control *GAPDH*, used to obtain data depicted in figure 3.7., was replaced by the *PsR* gene. No gene copy number variation was detected in CNV analyses of *PsR* gene (Figures 3.3. and 3.10.). This makes the *PsR* gene appropriate for use as an endogenous control. Results obtained in CNV analysis of *TLP* gene using *PsR* as the endogenous control instead of *GAPDH* were very similar with results obtained with *GAPDH* as the endogenous control (figure 3.5.). These results confirm that the determined gene copy number polymorphism is not an error of interpretation of results caused by copy number polymorphism of the endogenous control gene.

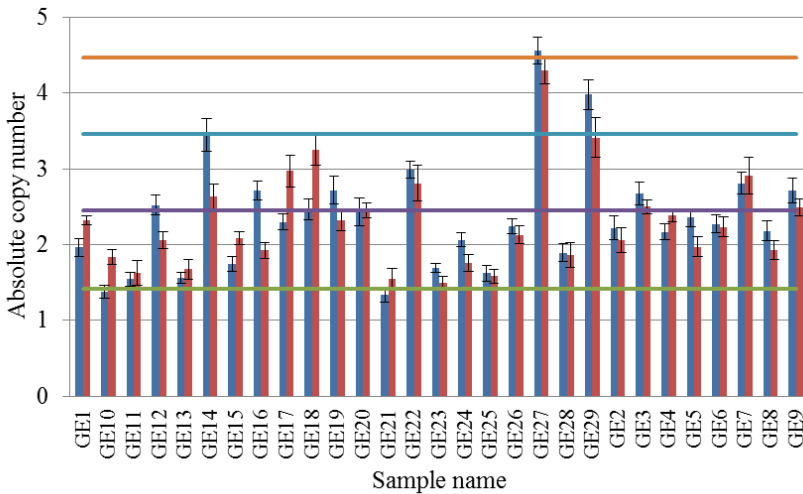


Figure 3.5. Comparison of results of copy number variation analyses of *TLP* gene obtained with two different endogenous controls.

Blue bars indicate absolute copy number of *TLP* gene in analysis where *GAPDH* is the endogenous control but red bars indicate absolute copy number of *TLP* gene in analysis where *PsR* is the endogenous control.

Although for some samples the interpretation of the absolute copy number is dependent on the endogenous control chosen, the trends are similar.

Values of Z scores stay in the acceptable range independent of the endogenous control used. There is no trend that Z scores are higher or lower, depending on the endogenous control used. For interpretation of absolute gene copy numbers in the manner described, reference samples with known copy number of the analysed gene are necessary. Such samples are not available because these types of analyses have not been performed in Scots pine. As the data acquired in CNV analyses using different endogenous controls are similar, *GAPDH* was used as the only endogenous control in further analyses.

For the *TLP* gene copy number variation was detected. It was clarified that there is a correlation between results of CNV analyses and the family structure of analysed trees. In case of the *TLP* gene, all members of Ja3 family except sample GE20 (which nevertheless is very close to the boundary value), have more than two copies of this gene in their genomes (figure 3.6).

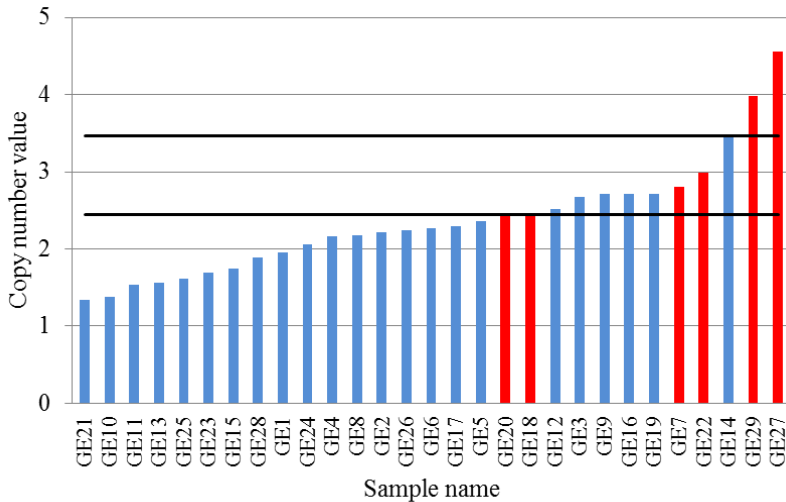


Figure 3.6. Copy number of the *TLP* gene.

Rescaled gene copy number values for the *TLP* gene. Ja3 family members are depicted with red bars, rest of samples – blue bars.

Results of gene copy number analyses of the *Def2* gene

Results of gene copy number analyses of the *Def2* gene are depicted in figure 3.7. In total 29 samples were analysed. Results obtained suggest that in one sample *Def2* is present in one copy, in genomes of seven samples the *Def2* gene is present in two copies, in genomes of 13 samples – in three copies, in seven samples the copy number is four and in one sample the copy number of *Def2* is estimated to be five.

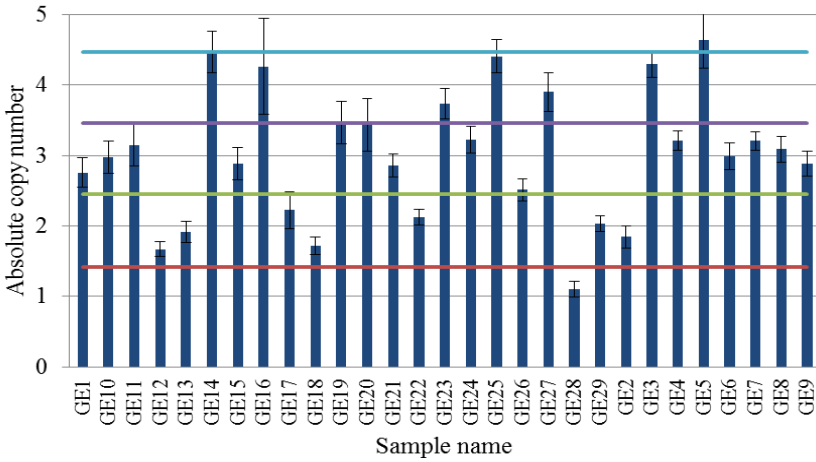


Figure 3.7. Results of gene copy number analyses of the *Def2* gene.

The bars indicate values of absolute copy number of the *Def2* gene. Samples are divided into groups according to copy number of *Def2* gene by horizontal lines.

Similar to the results for the *TLP* gene, the *Def2* gene CNV showed correlation with family structure. All members of Ja15 family have at least three copies of this gene (figure 3.8.).

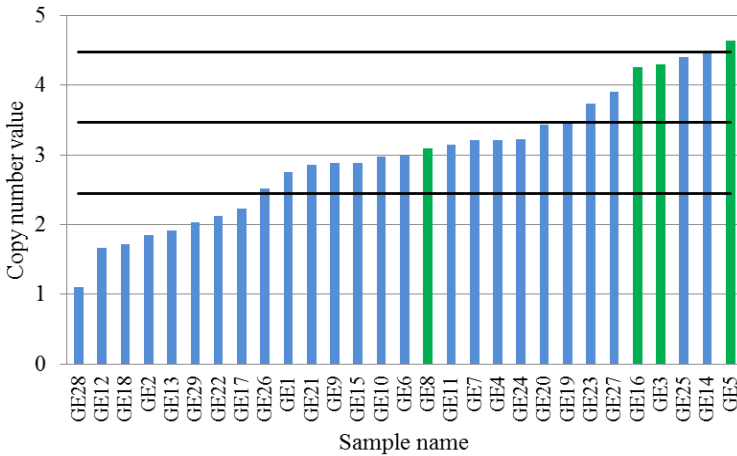


Figure 3.8. Copy number of *Def2* gene.

Rescaled gene copy number values for the *Def2* gene. Ja15 family members are depicted with green bars, rest of samples – blue bars.

In samples GE16, GE3, GE7, GE27 and, possibly, sample GE20 the copy number of both genes, *TLP* and *Def2* is increased. There is no information about how close these genes are located to each other in the pine genome and if both of those genes are on the same duplicated fragment of DNA. It is known that the size of duplicated DNA fragments can exceed 200 kbp (Samonte & Eichler, 2002), however this process has not been studied in Scots pine. This is the first research demonstrating gene copy number variation in pine.

Results of gene copy number analyses of the *PsBBs* gene

Results of gene copy number analyses of the *PsBBs* gene are depicted in figure 3.9. In total 27 samples were analysed. Results indicate presence of the *PsBBs* gene in two copies in the genomes of 22 samples, in five samples the gene copy number was three. Although in the first step CNV analyses the probability of copy number variation for the *PsBBs* gene was rated as high, results of second step CNV analyses show that some CNV polymorphism is possible but the credibility of these results have to be verified.

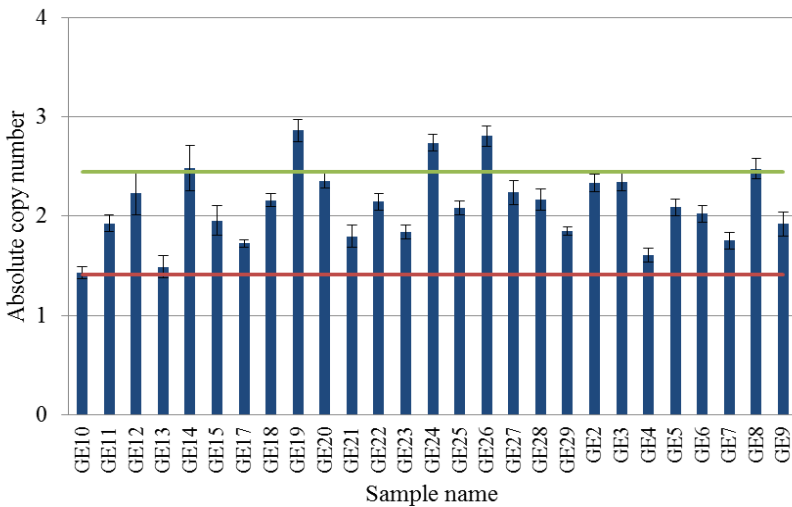
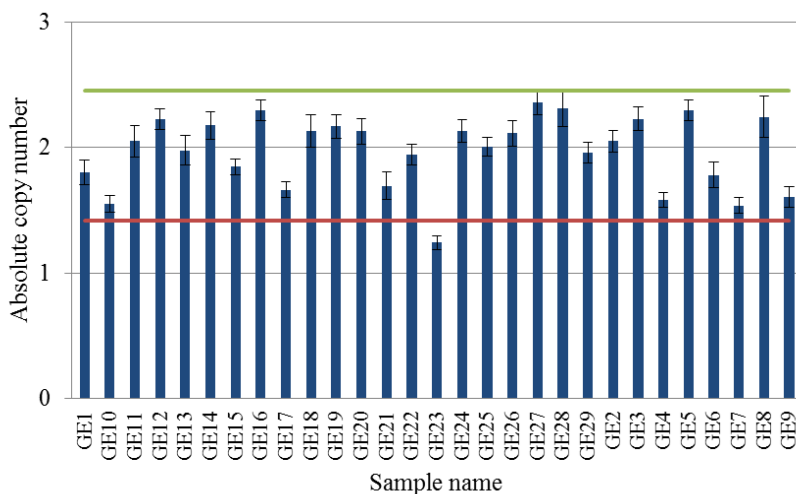


Figure 3.9. Results of gene copy number analyses of the *PsBBs* gene.

Results of gene copy number analyses of the *PsR* gene

In total 29 samples were analysed (figure 3.10.). Obtained data suggest that in the genome of one sample, the *PsR* gene is present in one copy but in the remaining 28 samples, there are two copies of this gene. Although in the first step CNV analyses the probability of copy number variation for *PsR* gene was rated as high, results of second step CNV analyses showed that CNV results of the *PsR* gene are even more uniform than those of the *PsBBs* gene.



3.10. att. Results of gene copy number analyses of the *PsR* gene.

CNV analyses of the *PsR* and *PsBBs* genes show that almost all samples belong to the sample group with two copies of these genes in their genomes. Samples with a different absolute copy number interpretation have values that are close to the boundary values for two copies. These results would need to be verified in additional experiments, utilising alternative endogenous controls.

Correlation of increased *TLP* or *Def2* gene copy number with lower infection level described in the section “Determination of *Heterobasidion annosum* in growing trees” was not found. However, the analysed trees were not inoculated in controlled conditions, and therefore further experiments are required to investigate this.

Results of expression analyses of candidate resistance genes

Expression analysis of the *TLP* gene

Gene expression analyses were performed for nine sample pairs – a control sample and an inoculated sample which was collected seven days post inoculation (d. p. i.). For six out of nine sample pairs, an increase in *TLP* gene expression after inoculation was detected. No significant change in expression was detected for two sample pairs but for one sample pair gene expression decreased after inoculation. Relative expression levels of the 7 d. p. i samples compared to controls is in range from 0.12 (decrease of expression) to 48.57. Data summarised in table 3.2. were used for calculations. Reference sample for comparison of all samples is sample 8k.

Table 3.2.

Expression analysis data for *TLP* gene

Sample	Relative expression	Ratio between control sample and inoculated sample
4k	0.78	6.30
4i	4.90	
22k	0.27	16.49
22i	4.52	
7k	0.30	19.30
7i	5.89	
20k	0.64	48.57
20i	31.28	
8k	1.00	0.82
8i	0.82	
29k	1.03	15.85
29i	16.27	
1k	2.09	1.06
1i	2.20	
13k	5.48	0.12
13i	0.67	
9k	0.16	4.60
9i	0.74	

Four sample pairs from individuals with increased copy number of the *TLP* gene and five sample pairs from individuals with normal copy number were included in analysis. Results suggest that before inoculation the expression of *TLP* gene in individuals with higher copy number of this gene is not increased compared to individuals with normal copy number. However, in inoculated samples increase in gene expression is larger in individuals with increased gene copy number of *TLP* gene (figure 3.11.)

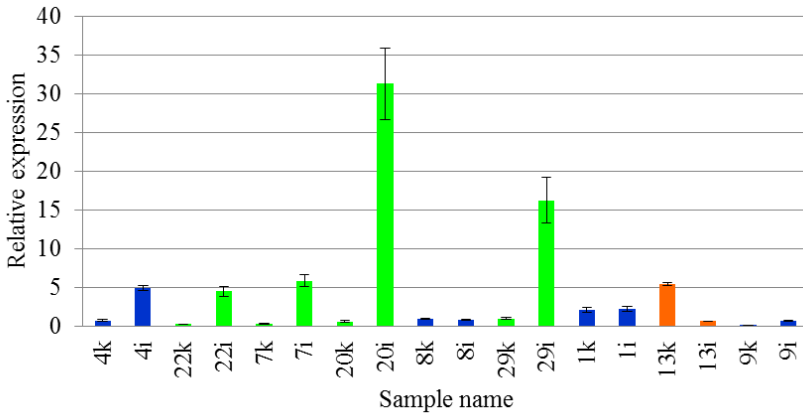


Figure 3.11. Results of expression analyses of the *TLP* gene.

Samples with increased copy number of the *TLP* gene are depicted in green (all are members of Ja3 family). Samples with normal copy number of the *TLP* gene are depicted in blue, samples with differing expression patterns are depicted in orange (gene expression in control sample exceeds expression in inoculated sample). Control samples are marked a subscript „k” after the sample number, inoculated samples are marked with the subscript „i”.

The observed correlation of gene copy number and gene expression results corroborates and supports the obtained CNV results.

Expression analysis of the *Def2* gene

Expression of the *Def2* gene was analysed in 33 samples isolated from 15 individuals. Samples were collected before inoculation, 7 d. p. i and 40 d. p. i. Obtained data show that the expression of the *Def2* gene, in contrast to the *TLP* gene, decreases in response to inoculation

In samples with two copies of the *Def2* gene in their genomes, the expression decreases with time, but for samples with three copies of the *Def2* gene, the decrease is not as rapid (figure 3.12.).

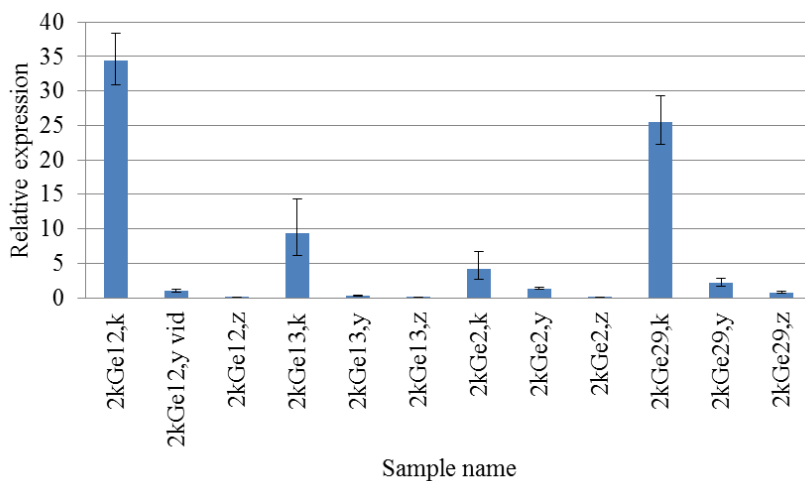


Figure 3.12. Results of expression analyses of the *Def2* gene.

In the sample names, the first two symbols indicate the copy number of the *Def2* gene in the genome of the sample (2k = 2 copies, 3k = 3 copies), next 3 – 4 symbols before comma is the sample name, symbol after the comma indicates sample type (k = control, y = 7 d. p. i., z = 40 d. p. i). There are three repeats of this sample; the mean value is used in graphs, in this table the mean value of Ge12 is indicated as sample „2kGE12,y vid.”

The expression level seven days after inoculation decreases 3.12 to 33.73 times compared to control samples. The decrease of expression, comparing samples collected at 7 d. p. i and 40 d. p. i. is from 2.82 to 16.17 times the value of 7 d. p. i. sample except for the sample Ge2; for this sample the decrease is 73.96 times the values of the corresponding 7 d. p. i. sample. The total decrease of expression when control samples and 40 d. p. i samples are compared is 33.72 to 545.43 times the value of control sample. In some samples with increased copy number of the *Def2* gene the expression in 40 d. p. i. samples was increasing (figure 3.13.).

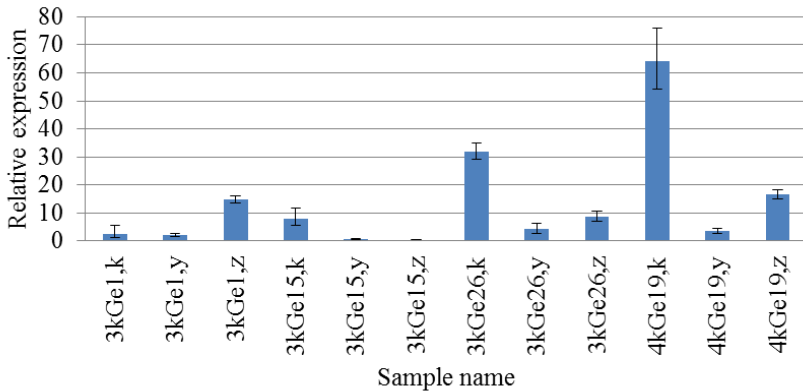


Figure 3.13. Results of expression analyses of the *Def2* gene for samples with *Def2* copy number > 2.

In the sample names, the first two symbols indicate the copy number of *Def2* gene in the genome of the sample (2k = 2 copies, 3k = 3 copies, 4k = 4 copies), next 3 – 4 symbols before comma is the sample name, symbol after the comma indicates sample type (k = control, y = 7 d. p. i., z = 40 d. p. i.).

There were some sample sets lacking results from some of the samples (either control, 7 d. p. i. or 40 d. p. i.). These sample sets have been excluded from figures. One of these samples was a control sample from an individual with increased *Def2* copy number with relative expression value of 190 i.e. a comparatively high expression level, suggesting correlation between gene copy number and expression for *Def2*, however, this is only one exception and in general, no correlation between *Def2* copy number and expression level of *Def2* in control samples was detected. Increase of *Def2* expression in samples collected 40 d. p. i. could be linked to differences in *Def2* copy number, however additional samples should be analysed because, as depicted in figure 3.13., all samples with increased copy number of *Def2* gene do not exhibit increased *Def2* expression levels at 40 d. p. i.

Expression analysis of the *PsBBs* gene

Expression of the *PsBBs* gene was analysed in 33 samples isolated from 15 individuals. Samples were collected before inoculation, 7 d. p. i. and 40 d. p. i. Obtained data show that expression of the *PsBBs* gene increases after inoculation (figure 3.14.). Maximum relative gene expression is approximately 20 times the value of control samples. A consistent decrease or increase in gene expression comparing 7 d. p. i. and 40 d. p. i. samples could not be detected.

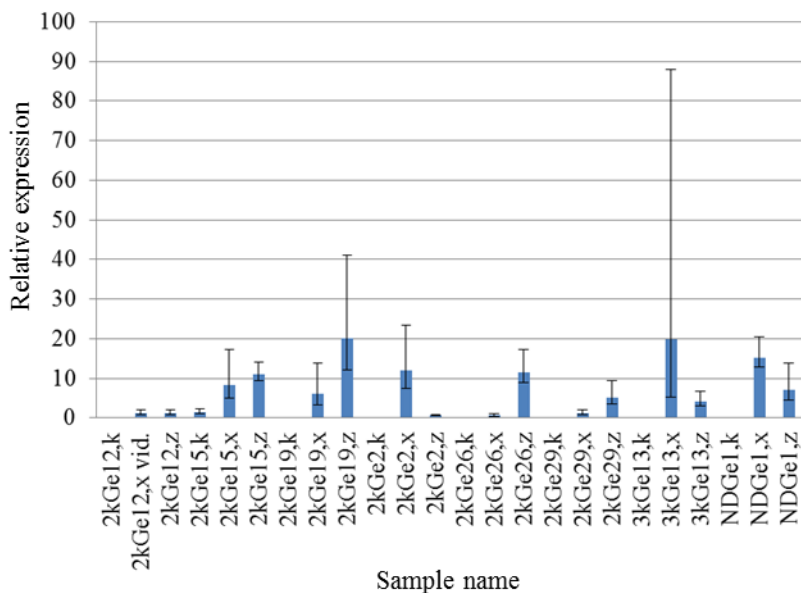


Figure 3.14. Results of expression analyses of the *PsBBs* gene.

Sample names: first two symbols indicate the copy number of *PsBBs* gene in the genome of the sample (2k = 2 copies, 3k = 3 copies and so on), next 3 – 4 symbols before comma is the sample name, symbol after the comma indicates sample type (k = control, y = 7 d. p. i., z = 40 d. p. i).

The obtained data suggest that this gene is subject to strong suppressing control before inoculation because is not detectable or insignificant in all control samples (figure 3.14.). For some samples no data about minimum and maximum relative expression values are available because of the unsatisfactory quality of some of technical repeats in real-time PCR.

The only sample with a possibly increased copy number of this gene (Ge13) does not show significant gene expression differences from the rest of the samples.

Gene expression analyses in different tissue types of pine saplings

In parallel to gene expression experiments in mature pines, expression experiments analysing the same genes in parenchyma and resin duct tissues of one year old Scots pine saplings were conducted. Experiments were performed at the Norwegian institute of Forest and Landscape. The aim of this experiment was to clarify if differences in expression of these genes exist between different tissues types. Time and funding available for this experiment were limited,

therefore the sample number is small. This is the first study of this kind investigating gene expression in different Scots pine tissues.

In total, 21 samples were analysed to characterise expression of the *TLP* gene. Of these, 5 were control samples, 8 were from wounded saplings and 8 – from inoculated saplings (figure 3.15.). Control samples were parenchyma and resin duct tissue from two untreated saplings. Samples from wounded and inoculated saplings were also taken from two plants, in addition, samples of each type were collected from the wounded / inoculated part in stems of saplings and from the untreated side of the stems.

Results of expression analysis of the *TLP* gene show that expression of this gene increases in response to wounding or inoculation. The highest value of relative expression was observed in the parenchyma tissue of a wounded sapling (approximately 146) but the second highest value was observed in parenchyma tissue from the untreated part of the stem of an inoculated sapling (approximately 59).

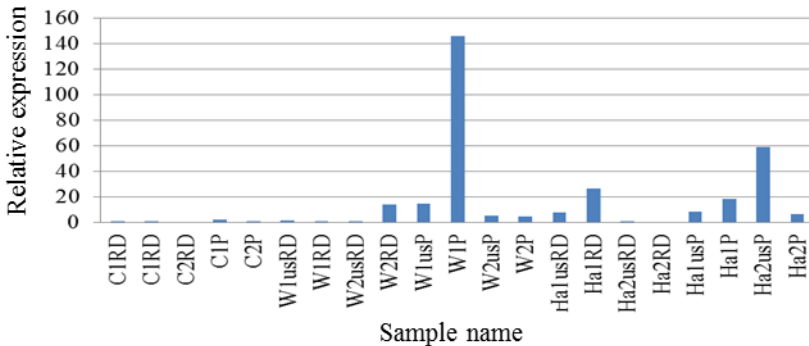


Figure 3.15. Expression of the *TLP* gene in resin duct and parenchyma tissues.

Sample names - first symbol: C – sample from control sapling, W – sample from wounded sapling, Ha – sample from inoculated sapling; the number which follows indicates number of control / wounded / inoculated sapling; for some samples the index “us” follows which indicates samples collected from untreated side of the stem; last symbols: RD – resin duct, P – parenchyma.

Variations in expression levels of the *TLP* gene were found between samples from wounded saplings (figure 3.16.).

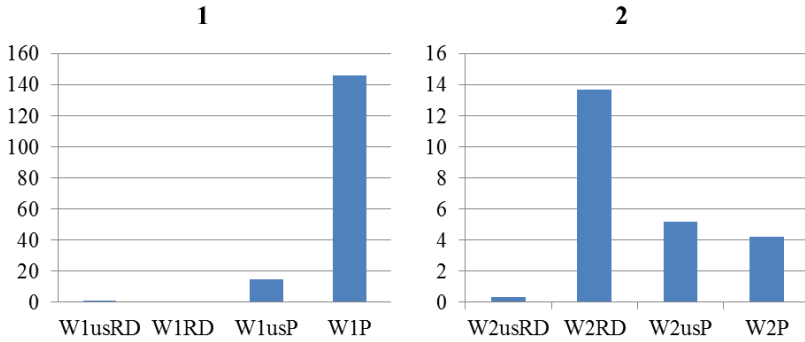


Figure 3.16. Variation in results of expression analyses of the *TLP* gene between samples from wounded saplings.

Sample names as in figure 3.15. Samples are distributed on X axis. Y axis – relative expression. 1 – results of analysis of samples from first wounded sapling. 2 – results of analysis of samples from second wounded sapling.

Analysis of samples from wounded saplings show that in general, the results are similar, the only exception is sample W1P, which shows elevated *TLP* gene expression levels. Results from samples collected from the first wounded seedling show similar results for resin duct tissue samples, expression of *TLP* is low in these samples but analysis of parenchyma tissue show higher expression of *TLP* in the wounded side of the stem. Expression of the *TLP* gene was detected in the sample from the untreated side of the stem also. Results of analysis of samples from second wounded sapling show higher expression in the resin duct sample from wounded side of stem and similar expression levels for both parenchyma tissue samples.

Variation between samples from inoculated saplings was also found (figure 3.17.). Sample nomenclature is as described in Figure 3.15.

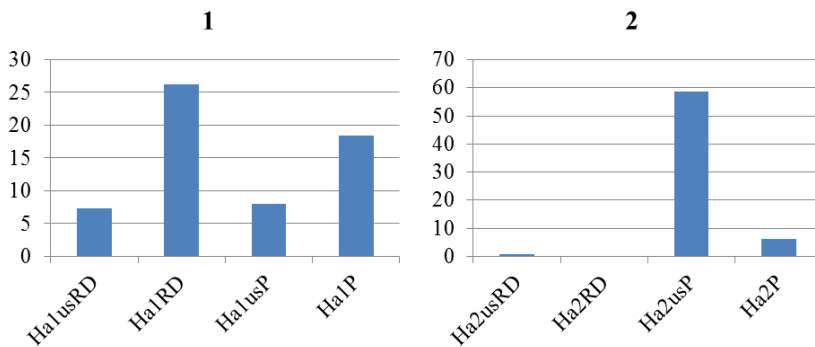


Figure 3.17. Variation in results of expression analyses of the *TLP* gene between samples from inoculated saplings.

Sample names as in figure 3.18. Samples are distributed on X axis. Y axis – relative expression. 1 – results of analysis of samples from first inoculated sapling. 2 – results of analysis of samples from second inoculated sapling.

Analysis of samples collected from first inoculated sapling show that in this case *TLP* gene expression is higher in samples taken from the inoculated side of the stem for both sample types. The difference between samples taken from untreated sides of the stem is similar for both tissue types. Analysis of samples collected from the second inoculated sapling show a stronger reaction to inoculation in samples from the untreated side of the stem. In this case the difference between expression levels in parenchyma tissue samples from opposite sides of the stem is larger than in samples from the first inoculated sapling. Expression of the *TLP* gene is low in both resin duct samples from second inoculated sapling.

The obtained data suggest that expression of the *TLP* gene is more strongly induced in parenchyma tissue in response to treatment, however, the number of analysed samples is small. The mean value of relative expression for samples from wounded and inoculated saplings (from both sides of the stems), are 32.7 for parenchyma and 6.28 for resin ducts. If only samples from the treated side of the stems (wounded and inoculated plants) are analysed the mean values are 43.73 for parenchyma and 10.15 for resin ducts.

In total 21 samples were analysed to characterise expression of the *PsBBs* gene. Of these, 5 were control samples, 8 were from wounded saplings and 8 – from inoculated saplings (figure 3.18.). Collection and preparation of samples were performed in the same manner as for analysis of the *TLP* gene. Results of expression analysis of the *PsBBs* gene show that expression of this gene increases after wounding or inoculation of saplings. The highest value of relative expression was observed in the resin duct tissue of an inoculated sapling (approximately 6146) but the second highest value (approximately

6040) was observed in the parenchyma tissue of an inoculated sapling. The highest value of relative expression in wounded saplings was observed in parenchyma (approximately 2567). No gene expression was detected in four out of five control samples. The only exception was the parenchyma tissue sample from first control sapling but the detected expression for this sample is insignificant compared to the highest values.

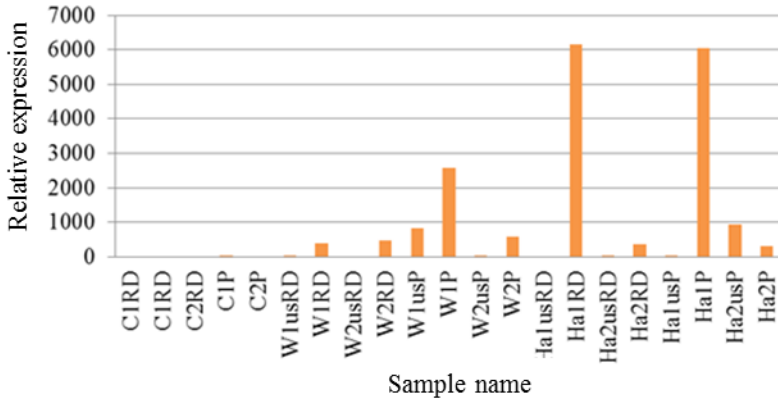


Figure 3.18. Expression of the *PsBBs* gene in different tissues with different treatments.

Sample names - first symbols: C – sample from control sapling, W – sample from wounded sapling, Ha – sample from inoculated sapling; the number which follows indicates number of control / wounded / inoculated sapling; for some samples the index “us” follows which indicates samples collected from untreated side of the stem; last symbols: RD – resin duct, P – parenchyma.

Variation between samples from wounded saplings was found (figure 3.19.).

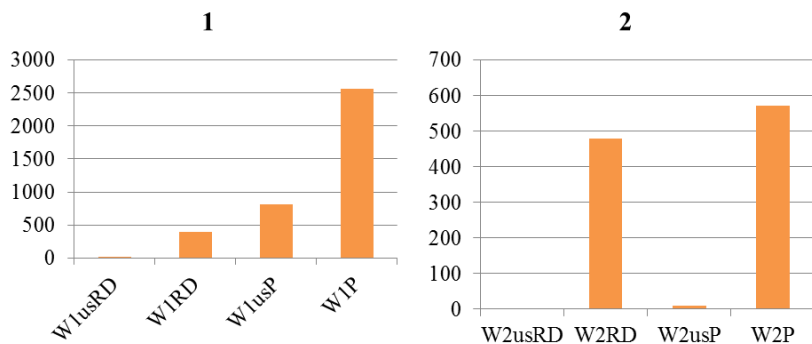


Figure 3.19. Variation in results of expression analyses of the *PsBBs* gene between samples from wounded saplings.

Sample names as in figure 3.18. Samples are distributed on X axis. Y axis – relative expression. 1 – results of analysis of samples from first wounded sapling. 2 – results of analysis of samples from second wounded sapling.

In samples obtained from both wounded seedlings, gene expression of the *PsBBs* gene is increased more in the wounded side of the stem. In samples from both saplings the difference between samples from the treated side of the stem and untreated side of the stem is at least 379. The largest difference is between parenchyma samples from the first wounded sapling (~1752). This difference exceeds the maximal value of samples from the second wounded sapling considerably.

Variations in expression levels of the *PsBBs* gene were found between samples from inoculated seedlings (figure 3.20).

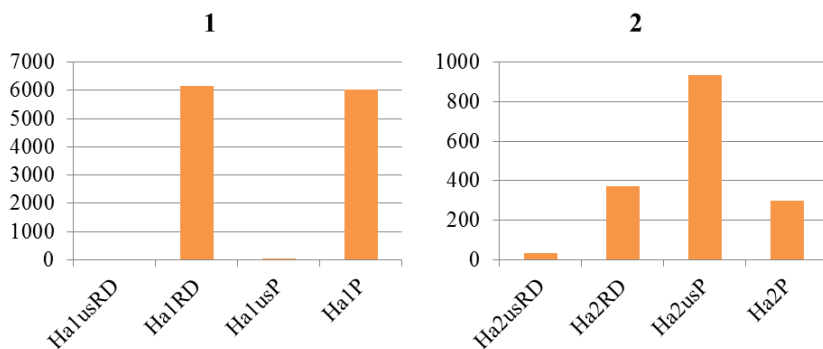


Figure 3.20. Variation in results of expression analyses of the *PsBBs* gene between samples from inoculated saplings.

Samples are distributed on X axis. Y axis – relative expression. 1 – results of analysis of samples from first inoculated sapling. 2 – results of analysis of samples from second inoculated sapling. Sample nomenclature as in figure 3.18.

The largest observed difference between samples from treated / untreated sides of the stem in samples from inoculated saplings was ~ 6146 which exceeds the maximal value of samples from the second inoculated sapling by more than 6.5 times. In three out of four samples the expression level is higher in the inoculated side of the stem.

The mean values of relative expression for samples from wounded and inoculated saplings, from both sides of the stems, are 1409.62 for parenchyma and 930.35 for resin ducts. If only samples from the treated side of the stems (wounded and inoculated plants) are analysed, the mean expression values are 2369.76 for parenchyma and 1847.92 for resin ducts. These data suggest that in wounded or inoculated plants expression of the *PsBBs* gene is higher in parenchyma cells one day after inoculation / wounding. If the average expression level in wounded or inoculated samples is calculated separately, the average expression level in resin duct tissues from the wounded side of stems is 435.73, for parenchyma samples from the wounded side of stems, the average expression level is 1569.75. In inoculated samples the average expression level in resin duct tissues from treated side of stems is 3259.09, for parenchyma tissue of the from the inoculated side of stems, the average expression level is 3169.75. Only in the resin ducts of inoculated saplings, expression of the *PsBBs* gene is stronger than in parenchyma, but the difference is small. Additional experiments should be performed to increase credibility of these data because the amount of samples analysed is too small to make well-grounded conclusions. The comparison of different data above suggests that expression of *PsBBs* gene is higher in inoculated samples than in wounded samples.

4. DISCUSSION

The chapter consists of 15 pages and 1 figure in the doctoral dissertation.

Experimental design

A common molecular genetics approach in research on plant resistance is to study gene expression changes and to compare gene expression between samples. A different approach, initially analysing copy number variation of candidate-genes, was chosen in order to achieve the aims of this doctoral research. The first reason for this choice was lack of plant material suitable for resistance analysis by gene expression only. It is difficult to perform gene expression experiments in controlled conditions using mature trees. For example, trees may be infected with the pathogen used for inoculation or with another plant pathogen before the inoculation for gene expression experiment. Such co-infection can influence the results. It has been proved that in spruce induced resistance exists (Krokene et al., 1999) – if the tree is inoculated with a pathogen and the inoculation is repeated after some time, the response reaction to the second inoculation is more effective. It is not clarified in detail how this process is characterised at the gene expression level and which genes are most important, however, gene expression is definitely involved. The second reason was the fact that expression of several of the chosen candidate-genes is also influenced by abiotic factors such as drought or heat. The micro-climate of the experimental plantation used in experiments may be not uniform. Based on this, the use of trees from forest stands in studies about resistance based primarily on gene expression is complicated. The third reason for the choice to initially research copy number variation is that for gene expression analyses RNA must be extracted of high quality and concentration from a very small amount of recalcitrant material – sapwood of Scots pine. For gene copy number variation analyses DNA is required, and isolation of DNA is less demanding. These factors indicate the advantages of use of CNV analyses in studies about resistance mechanisms of forest tree species, especially when mature trees are used. The choice to base the research on CNV data provides the chance to obtain results upon which further experiments could be planned. By complementing each other, the combined use of gene expression and CNV analyses provide a better insight into genetic aspects of Scots pine resistance mechanisms.

Molecular genetic analyses for detection of *H. annosum*

Several PCR methods for detection of *H. annosum* DNA exist. In this research a method previously tested for determination of presence of *H. annosum* in wood samples (Hantula & Vainio, 2003) was used. However, PCR methods have only been used to determine presence of *H. annosum* in wood but not for determination of infection level in individual trees. As

described in the section “Determination of *Heterobasidion annosum* in growing trees”, the results showed a heterogeneous distribution of *H. annosum* in pine, thus analyses using only one sample from a tree can only be used to obtain information about general condition of the tree stand in regard to incidence of *H. annosum*. Such analyses produce a high rate of false-negative results. Results about infection levels of individual trees obtained in this research cannot provide direct information about the condition of the root system of the tree.

Before the initiation of this experiment, the presence of *H. annosum* was determined in the plantation by detection of fruiting bodies of this fungus on several trees. Initial screening (300 trees, one sample per tree) confirmed a high infection level in the plantation, with almost 40 % of tested trees positive for *H. annosum* DNA. Surprising was the negative result for two of four samples on which fruiting bodies of *H. annosum* were found. These data suggested uneven distribution of *H. annosum* within infected trees. This was confirmed in detailed analysis of two excavated trunks with partial root systems. In some cases, PCR analyses from samples located adjacent to each other gave different results. Considering that excavation of roots is a labour-intensive activity and that distribution of *H. annosum* in roots can also be very uneven, it was decided to study the infection level of individual trees by analysing five samples from the very base of the stem. These detailed analyses showed that in fact the proportion of infected trees was considerably higher (approximately 86 %) compared to 40 % using one sample per tree for analysis. In the first infection level determination experiment, 16 samples had an infection level 0/5 to 2/5 and nine samples had an infection level of 3/5 to 5/5. One interpretation of these data could be that the samples with a lower infection level (0/5 – 2/5) may have become infected at a later time than the nine samples with higher infection levels. Spatial correlation with infection level was not found, and it was not possible to determine the direction of movement of *H. annosum* infection within the plantation. Another explanation of the distribution of infection levels may be that individuals with a low infection level make use of resistance factors slowing down the spread of *H. annosum* within the tree.

The experiment of infection level determination was repeated one year after the original experiment, and thus the natural spread of *H. annosum* may have had an effect on the results of repeated experiment. Growth rate of *H. annosum s.l.* in roots can reach two meters per year (Rishbeth, 1962). Comparison of results from both experiments shows that in the repeated experiment the proportion of individuals with higher infection levels increases. This could be explained by the natural spread of *H. annosum* during the 11 months between experiments. Comparison of results produced in analyses of the same individual in both experiments shows an increase or no change of the determined infection level in the repeated experiment for most samples. Only in two samples the determined infection level decreased in the repeated

experiment. This is probably a sampling artefact based on the uneven distribution of *H. annosum* in the base of the stem.

Considering the uneven distribution of *H. annosum*, in order to avoid false-negative data it is necessary to use multiple samples from a sample tree to detect infection and to characterise the infection level. Results obtained in this research show that use of five samples per tree provides an estimation of infection level; still this estimation cannot be absolutely exact as the distribution of the pathogen is uneven. The fact that in the repeated experiment determined infection level increases or stays stable suggests that use of five samples per tree indicates actual infection level of trees and that the determined infection level depicts the progress of disease over time. An important factor restricting the sample number for use in analysis from each sample tree is tree diameter. In the analysed plantation, increasing sample numbers per tree could be detrimental, due to the small circumference of the stems. In analysis of larger trees, the use of more than five samples per tree would be possible leading to increased precision of the results. Alternative sampling strategies are also possible, for example, vertical sampling or sampling in lateral roots only, but additional experiments are necessary to investigate the possibilities of the use of such sampling strategies for use in characterisation of infection level.

In this doctoral research a method for the evaluation of infection level of individual trees was developed. Use of this method allowed results to be obtained about differences in infection level between samples. Experimental results show that the distribution of *H. annosum* in the base of pine stem is heterogeneous. Use of this method in forest stands or plantations will allow the estimation of the phytosanitary condition of forest stands and to identify potential differences in resistance against *H. annosum* when comparing families or individuals. Such data can be used in further research about resistance or in selection programs.

Copy number variation analysis of the *TLP* and *Def2* genes

The correlation between copy number variation analysis and gene expression analysis data of the *TLP* gene supports the copy number variation analysis data. Increased copy number of a specific gene can lead to changes in phenotype. Correlation between increased copy number and increased gene expression has been reported in the human genome (Chen et al., 2006). The results of CNV detection experiments indicate that in case the protein encoded by the analysed candidate-gene is effective against *H. annosum*, individuals with increased copy number of this gene could possess increased resistance against *H. annosum*. It is necessary to conduct an experiment about the effects of *TLP* on *H. annosum*. Information about differences in gene copy number of genes encoding antimicrobial proteins and the effect of these variations on resistance capabilities of Scots pine could be included in selection criteria for pine breeding programs. However, protein expression does not always correlate

with gene expression because protein expression is subject to additional regulation. In cases where the gene with increased copy number is expressed in plant continuously and correlation between gene expression and increased gene copy number exists, the antimicrobial protein of this gene could be accumulated in plant cells in a higher concentration than in trees with a normal copy number of this gene. If the protein would be effective against *H. annosum*, this may make it more difficult for the pathogen to colonise this individual and, even if colonisation was successful, the growth of pathogen could be influenced negatively. Symptoms of the disease may be delayed, possibly until after felling age. In cases where the gene with an increased copy number is expressed at higher levels in response to pathogen invasion it could lead to faster accumulation of the antimicrobial protein and to a higher final concentration, slowing down the progress of the disease.

It is theoretically possible that the concentration of antimicrobial protein in plant cells before infection is so high that the plant cannot be infected; however, a relatively higher resistance is also useful. Increased copy number of an antimicrobial protein gene could have side-effects also, for example, slower growth of the tree. The reason for reduced growth could be the negative effect of increased antimicrobial gene copy number on mycorrhizal formation. Another reason for reduced growth could be a shift of plant cell resources towards production of the antimicrobial protein instead of synthesis of cell wall structural elements. This could influence wood structure and density too. The effect of increased copy number of genes encoding antimicrobial proteins on these aspects of the biology of pines has not been studied. The efficiency of each antifungal protein against *H. annosum* may be different, thus individuals with increased copy number of a particular antifungal gene may not show increased resistance against *H. annosum* compared to other individuals. Attention should be paid to selection of individuals which have several resistance-related genes in higher copy number in their genomes. Still, it must be remembered that the pathogen, *H. annosum* in this case, is constantly evolving and could adapt for infection of “improved” genotypes over time.

This is the first research where gene copy number variation in Scots pine has been described. Additional studies are necessary to evaluate the effect of gene copy number variations on phenotype. Gene expression studies are only one aspect of the research required, studies of a broader range of phenotype features are also needed.

Copy number analysis of the *PsBBs* and *PsR* genes

Although data from gene copy number variation analyses of the *PsBBs* and *PsR* genes suggest that copy number variation is unlikely, these results are still useful because they show that not all genes have copy number variation. This adds to credibility of the results. The *PsR* gene is part of a gene family in pine, of which seven have been reported (Li & Asiegbu, 2004b) but only one

PsR gene sequence is available in the NCBI database. In the case that the primers used to analyse the *PsR* gene were not specific, and amplified other members of this gene family, the determination of copy number variation would be made more complicated. A family of pinosylvin synthase genes also has been described in Scots pine (Preisig-Müller et al., 1999) but, presumably, these genes are different at DNA sequence level because the amino acid sequence similarity of these genes is approximately 95 %. As in the case with the *PsR* gene, the existence of pinosylvin synthase genes with high DNA sequence similarity of is known, but no copy number variation analyses have been performed (Preisig-Müller et al., 1999).

Expression analyses of the *TLP* gene

Some of the more interesting gene expression data for practical use are the data about expression of the *TLP* gene as these data clearly show correlation between gene expression and increase of expression after inoculation of the trees. Results suggest that in trees with more than two copies of the *TLP* gene, the increase in expression of this gene after inoculation is larger than in trees with two copies of the *TLP* gene in their genomes. Potential effects and side-effects of this phenomenon are discussed in the section “Copy number analysis of *TLP* and *Def2* genes”. This is the first study showing correlation between gene copy number and gene expression in Scots pine. Expression of *TLP* gene after inoculation does not increase as strongly as expression of the *PsBBs* gene. This conclusion can be made based upon *PsBBs* gene expression analyses which show that in almost all control samples the expression of *PsBBs* gene is minimal or not detectable. Relative quantitation was used for gene expression analysis. This means that for individuals with undetectable expression in control samples the increase in gene expression in the inoculated samples cannot be determined. In the case of the *TLP* gene, expression is detected in all control samples which indicates that this gene is expressed continuously at a low level and may be one of the primary weapons against pathogen invasion. Expression of this gene in control samples may also indicate that expression regulation mechanisms of this gene are more sensitive to abiotic stress factors than those of the *PsBBs* gene. Increase of expression of the *TLP* gene corresponds to previously published research about gene expression in Scots pine seedlings after inoculation with *H. annosum* (Asiegbu et al., 2005b).

Expression analyses of the *Def2* gene

Data about expression of the *Def2* gene indicate that the expression of this antimicrobial protein, which has been demonstrated to be active against *H. annosum* (Kovalyova & Gout, 2008), gene decreases after inoculation. In contrast to this, it has been reported that in seedlings of Scots pine expression of genes belonging to the defensin gene group increases (Asiegbu et al., 2005b). However, in the published report, other defensin group genes were

studied, not the one analysed in this doctoral research. It is also possible that the *Def2* gene is expressed differently in seedlings compared to mature trees.

The pattern of *Def2* gene expression may indicate the role of this gene in the primary defence reaction. The expression data obtained showed that the expression decreases after inoculation, and initially the expression of the *Def2* gene is comparatively high (maximal decrease is 33.73 times the value of control sample). In contrast to the *TLP* gene which may be involved in primary defence reaction as well as in an induced response, *Def2*, on the basis of the findings of this research, is mainly active in the primary defence reaction, at least in mature trees. Data obtained in the experiments performed could indicate that high levels of defensin 2 are present in the tree before inoculation, compared to *TLP*, and after inoculation, once induced defence mechanisms are activated, the role of *TLP* and pinosylvin synthase are more important.

Expression analyses of the *PsBBs* gene

Expression of the *PsBBs* gene increases after inoculation of mature trees. This increase after inoculation is significant but cannot be quantified because in several control samples the expression of this gene was undetectable. It is possible that the increase in *PsBBs* gene expression after inoculation of mature trees is comparable to increase in one year old seedlings where an increase of 6040 times the control sample value was observed. Large standard deviations were observed for analysed samples and conclusions other than that the expression of the *PsBBs* gene increases after inoculation cannot be made from these results. Increase of the expression level of this gene after inoculation suggests that pinosylvin, which is the product of a biochemical reaction catalysed by pinosylvin synthase, has an important role in the induced resistance response. Pinosylvin possesses broad spectrum antimicrobial properties; and it could be expected that the induction of *PsBBs* gene expression is not specific to one particular pathogen.

Increase of expression could be expected based on information from publications on the actions of pinosylvin synthases in pine (Preisig-Müller et al., 1999). However, the results obtained about expression of this and other genes within the doctoral research are unique because they provide information about gene expression in mature trees, while the majority of published data about gene expression is based on seedlings infected with *H. annosum* under controlled conditions. The data in the doctoral research are unique also because the majority of data about the expression of *P. sylvestris* genes have been acquired by use of DNA microarray technologies which is a high throughput method but not considered to be as exact as the real-time PCR method used here. Furthermore, no DNA microarrays are available for Scot's pine; instead microarrays based on sequences from related species have been used. As a result, data obtained with these microarray methods are based on DNA

sequences with a comparatively high similarity, but not an exact match with the analysed genes.

Gene expression analyses of LCM samples

In the one year old saplings utilised in this experiment, the resin ducts are already morphologically well differentiated from parenchyma as can be judged by fluorescent microscopy data (figure 4.1.).

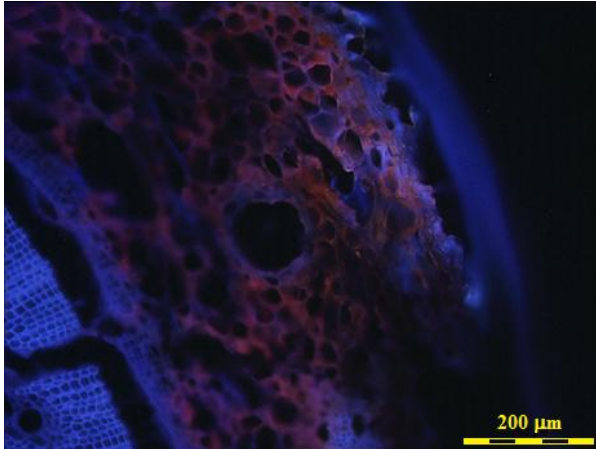


Figure 4.1. Cross-section of one year old Scots pine sapling stem, magnification 200 x. Fluorescent microscopy image.

In figure 4.1., blue fluorescence is emitted by lignin but red fluorescence is emitted by suberin and chlorophyll. The round structure in the centre of image is a resin duct. The cells forming the resin duct (one layer of cells surrounding the duct) appear bluish. This allows to presume that structure and composition of these cells is different from structure of parenchyma tissue surrounding them, i.e. these cells are differentiated.

Expression of the *TLP* and *PsBBs* genes increases after wounding and inoculation. Increase in *PsBBs* gene expression is larger than the increase of expression of the *TLP* gene. Inoculation induces a larger increase in expression of the *PsBBs* gene than wounding. Expression of the *PsBBs* gene is mostly undetectable in control samples. These results are similar to those obtained in analysis of gene expression in mature trees. Results suggest that the *PsBBs* gene is subject to strong suppressing control prior to both wounding and infection, in saplings and in mature trees. Data about gene expression of the *TLP* gene also indicates low expression of this gene in control samples, but in mature trees the expression of this gene, while at a low level, was detected in all control samples. This could be explained either by differing expression

patterns of this gene at different ages of pine or by the fact that the saplings were grown in a controlled environment, thus they were exposed to less stress factors than mature trees in a forest stand.

In expression analyses of the *TLP* and *PsBBs* genes, significant differences between samples from different saplings were observed. However, the conclusion that expression of both genes does change as a reaction to wounding can be made. In wounded and inoculated samples, changes in gene expression can also be detected in samples collected from the side of the stem opposite to the wounding or inoculation site. This means that wounding or inoculation of sapling stems affects expression of the *TLP* and *PsBBs* genes at least at a distance equal to the diameter of the stem. This shows the effect of the plant signal transfer system on expression of these genes in distant tissues. Nevertheless, expression analyses of the *PsBBs* gene did show, except in one sample, a stronger reaction of the expression of this gene in the manipulated side of the stem, and that, predominantly, changes in gene expression are localised in the wounding / inoculation area. Comparison of gene expression in parenchyma and resin duct tissue indicates that expression of the *TLP* gene increases more in parenchyma after wounding / inoculation but expression of the *PsBBs* gene in samples from inoculated saplings increases more in the resin ducts although the difference is not large. When comparing other samples from wounded and inoculated saplings, expression of *PsBBs* is increased more in parenchyma, similar to the expression pattern of *TLP*. The function of resin ducts is to concentrate and transport resin and the metabolites it contains, including pinosylvin. Experiments with one year old saplings indicate that the expression of the *PsBBs* gene is not elevated within these resin ducts, indicating that the biosynthesis of pinosylvin may occur in another location.

CONCLUSIONS

- Copy number polymorphism of the thaumatin-like protein (*TLP*) gene and defensin 2 (*Def2*) gene was detected in the genome of *Pinus sylvestris*. This is the first report of gene copy number variation analyses in conifers.
- Changes of gene expression of the thaumatin-like protein (*TLP*), *Pinus sylvestris* pinosylvin synthase (*PsBBs*) and defensin 2 (*Def2*) genes after inoculation of *P. sylvestris* with *Heterobasidion annosum* were determined. It was clarified that changes in expression patterns of these genes are different indicating differing roles of these genes in pine resistance mechanisms.
- Correlation between copy number of thaumatin-like protein (*TLP*) gene and increase of expression of this gene after inoculation was detected.

- Laser capture microdissection (LCM) in combination with gene expression analysis was used to study changes in gene expression in resin duct and parenchyma tissues of saplings, which is the first report of the use of this technique in *Pinus sylvestris*.
- In parenchyma and resin duct tissue of *Pinus sylvestris* systemic, not only local, reaction of gene expression of the *TLP* and *PsBBs* genes after wounding and inoculation with *H. annosum* was detected.
- No correlation between copy number of the thaumatin-like protein (*TLP*) and the defensin 2 (*Def2*) genes with length of pine wood pigmentation caused by *H. annosum* was detected.
- A PCR based method for determination of infection level of individual *P. sylvestris* trees with *H. annosum* was developed. It was found that *H. annosum* is distributed heterogeneously in the base of stems of Scots pine. Analysis of five samples from the stem base of growing Scots pine trees is sufficient for characterisation of infection level and its dynamics.