

Inducētās rezistences loma
parastās priedes *Pinus sylvestris* L.
stādu izturības veidošanā
pret *Lophodermium spp.*

Ilze Šņepste,
Dainis-Edgars Ruņģis
LVMI «Silava»
2017



Parastā priede un skujbire



- Parastā priede (*Pinus sylvestris*) aizņem 47% no AS „Latvijas Valsts meži” apsaimniekošanā esošajiem mežiem.
- Latvijas priežu audzēs sastopama brūnā skujbire, ko izraisa *Lophodermium seditiosum*. Nāvējoša tikai jauniem stādiem. Izplatību veicina silts, lietains rudens, siltas ziemas.
- Stādaudzētavās izmanto fungicīdus («Amistar»), tomēr miglošana nespēj pasargāt visus stādus no *L. seditiosum*, kā arī slimība var izraisīt stādu bojāeju pirmajos gados pēc to izstādīšanas mežā.
- Slimību apkarošanai jaunaudzēs nav atļauts lietot fungicīdus, tādēļ aktuālāka kļūst nepieciešamība meklēt jaunus ceļus augu aizsardzības nodrošināšanā.

Inducētā rezistence

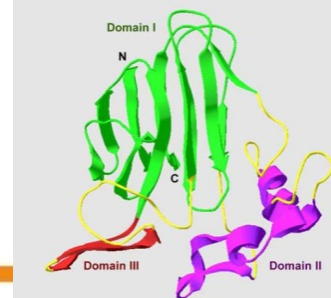


- Inducētā rezistence ir aktīvs process, kurā tiek izmantota auga dabīgā aizsardzība kā rezultātā palielinās auga izturība pret otrreizēju nelabvēlīgā faktora iedarbību.
- Inducētās rezistences noturīgums kokos joprojām nav zināms.
 - eglē (*Picea abies*), tā ir novērota vismaz vienu gadu,
 - savukārt pēc *Pinus radiata* inokulēšanas ar patogēnu *Fusarium circinatum*, inducētā rezistence tika novērota vēl 3 gadus.
- *L. seditiosum* gadījumā būtu svarīgi, lai inducētā rezistence stādos saglabātos tieši pirmajos 2 - 3 gados.
- Inducētā rezistence ir nespecifiska - inducējot rezistenci pret vienu patogēnu, augs var kļūt izturīgāks arī pret citiem biotiskiem vai abiotiskiem faktoriem.



- Inducēto rezistenci kokos var iedalīt vairākās grupās:
 - inducēta **ķīmiskā** aizsardzība (sekundārie metabolīti, piemēram, terpenoīdi, fenola savienojumi, alkaloīdi),
 - inducētas **anatomiskas** izmaiņas (šūnas sienīņu lignificēšanās, sveķu aiļu veidošanās),
 - inducēta **ekoloģiskā** vai netiešā aizsardzība (gaistoši savienojumi, kas piesaista koka patogēna dabīgos ienaidniekus vai brīdinot apkārtējos kokus par patogēnu),
 - inducēta proteīnu aizsardzība (ar patogēnēzi saistītie proteīni, kas ātri inducējas gan lokāli, gan sistēmiski). 17 grupas. Vairums 5 grupas proteīni tiek inducēti kā atbildes reakcija patogēnu infekcijām, biotiskiem, abiotiskiem stresiem, apstrādei ar augu hormoniem.

Taumatīnam līdzīgais proteīns



Liu and Sturrock, 2010

- Izolēti no dažādiem organismiem (nematodēm, kukaiņiem, sēnēm, kailsēkļiem un segsēkļiem).
- Izturīgi pret proteāzēm un ekstrēmiem temperatūras, pH apstākļiem.
- Visiem augu PR5 grupas proteīniem, kam piemīt pretsēnīšu aktivitāte, raksturīgas 5 augsti konservatīvas aminoskābes (arginīns, glutamīnskābe un 3 asparģīnskābes).
- TLP, iespējams, ietekmē sēņu šūnas sienīšu, saistoties ar (1,3)b-glikānu un noārdot to vai palielinot šūnas sienīšas caurlaidību, veidojot poras tajā.
- Pēc vītenauga *Cynanchum komarovii* apstrādes ar abscīzskābi, salicilskābi, metiljasmonātu, NaCl un sausumu, konstatēta palielināta *TLP* gēna ekspresija, kas liecina, ka šim proteīnam ir nozīmīga loma stresa atbildes reakcijā. Šis proteīns izrādīja spēcīgu pretsēnīšu aktivitāti.



Darba mērķis un uzdevumi



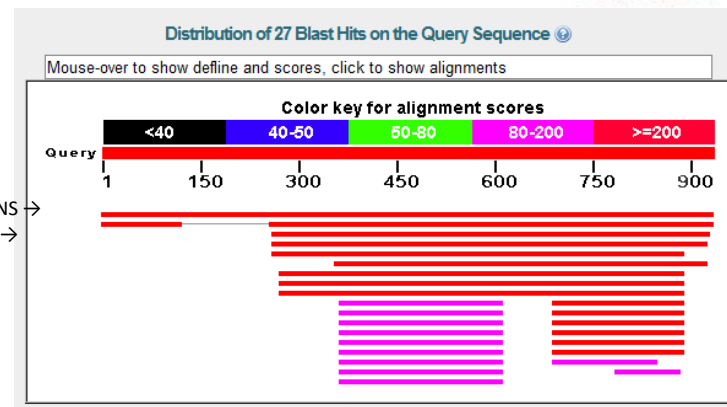
- Darba mērķis ir izpētīt inducētās rezistences iespējas parastās priedes *Pinus sylvestris* rezistences paaugstināšanā pret *L. seditiosum*.
- Darba uzdevumi:
 - *P. sylvestris* stādu apstrādes metožu apgūšana ar dažādiem inducētās rezistences regulējošiem faktoriem.
 - RNS izdalīšana no apstrādātajiem paraugiem, *TLP* gēnu ekspresijas analīzes, izmantojot reāla laika PCR.
 - *P. sylvestris* inducētās rezistences izraisītāju atlasīšana pēc gēnu ekspresijas rezultātiem un to izmantošana parastās priedes stādu apstrādē, lai vēlāk veiktu inokulāciju ar *L. seditiosum*.

Pinus sylvestris TLP gēna sekvences iegūšana

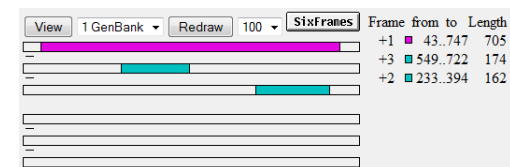


- Lai iegūtu gēna sekveni, tika izmantota *Pinus taeda* TLP mRNS, cds sekvence (GenBank Acc. No. EF532603) praimeru veidošanai.
- Genomiskais *P. sylvestris* DNS izolēts ar CTAB metodi (Murray and Thompson 1980).
- Analizējot ORF, *P. sylvestris* bija īsāka TLP proteīna sekvence nekā *P. taeda*.
- PCR and cDNA sekvenēšana tika izmantota lai noteiktu introna esamību un garumu, kā arī noteiktu tā atrašanās vietu.

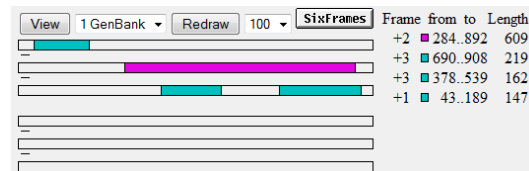
1. *P.sylvestris* gDNS →
2. *P.taeda* mRNS →



P. taeda TLP ORF



P. sylvestris TLP ORF



<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>



10 – 100 mM MJa (5 ml)

- Normālos apstākļos TLP tiek ekspresēts zemā līmenī, kā arī atsevišķās auga daļās un/vai attīstības stadijās.
- Metiljasmonāta (MJa) apstrāde palielina TLP gēna ekspresiju *Pinus moticola* (Piggott N. et al. 2004) un ietekmēja (samzināja) patogēnu augšanu, tādēļ, lai iegūtu TLP gēna sekvenci un noteiktu introna esamību, RNS un DNS tika izdalīti no MJa apstrādātiem stādiem.
- *P. sylvestris* stādi (1 gadu veci) tika apstrādāti ar:
 - 5, 10, 30, 50, 100 mM MJa + 0,1% Tween 80,
 - kontroles – H₂O; 0,1% Tween 80,
 - Katru stādu apsmidzināja ar 2,5 - 5 ml Mja šķīduma,
 - Skujas tika ievāktas pirms apstrādes un 2 – 4 nedēļas pēc apstrādes.
- Pārāk liela MJa deva izraisa fitotoksisku efektu.

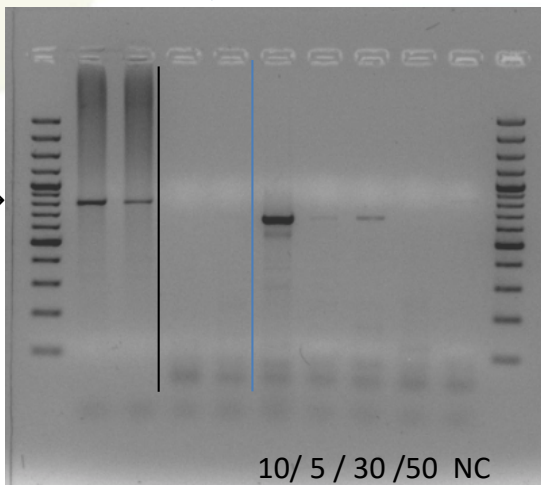
30 mM MJa (2.5 ml)



2 nedēļas 3 nedēļas



Pirms apstrādes



PCR
gDNA 818 bp →

← PCR
cDNA 673 bp

↑
gDNA

↑
Pēc apstrādes ar MJa
cDNA

Introna pārbaude *P. sylvestris* sēņos (pirms un pēc apstrādes).

PCR produkta garums no gDNS ir 818bp un no cDNA – 673bp.

1; 2 – gDNS, 3;4 – pirms apstrādes (cDNS); 5-8 – pēc apstrādes ar MJa,
9- NK (cDNA).

ORF - 850 bp, kurā atrodas 145bp introns.

PsTLP veido 234 aminoskābes.

```

1  GTGTTGAGTTATACTGTTTAACTGCTGCCTCGCCATTGCAATGGGGCGAAGAACATGC 60
   ----- M G R R T C
61  GCAGGGTCCCTTTGGATCAGCAAGTAGTAACCTTTATTAGCTCTTAATGTTTATCTGCAA 120
   A G S L W I T A I V T L L A L N V Y L Q
121 Ggtaacgtgcgcgtctctcaattactctacataatcactatactgattgctttgatcaat 180
   -----
181 aaatcatgaattatatagcaggcttatgtattcattgtcgaagtagaaatattaataga 240
   -----
241 tttgtttggtgaactataagtgcagGTATAGAAGGTGCGACAATGACCGTCAAAACCA 300
   ----- G I E G A T M T V K N Q
301 GTGCTCATACACAGTTTGGGCGGCTGGCAGTCCGGGCGGCGTAAGCACTGGGGCAGGG 360
   C S Y T V W A A G S P G G G K Q L G Q G
361 TGAGACATGGAGTTTGTATGTTCCAGCGGGAACAACAGGAGGAGAATCTGGGGGCGTAC 420
   E T W S F D V P A G T T G G R I W G R T
421 CGGTTGCTCCTTCGACGCTGGCAGTGGTACAGGTAGCTGTACCACTGGTGACTGTGGTG 480
   G C S F D A G S G T G S C T T G D C G G
481 GTTGCTCAATTGTCAAGGCTATGGAAGCGTCCCTGCAACGCTTTTGAATATGGTCTGAA 540
   L L N C Q G Y G S V P A T L F E Y G L N
541 TAAGTACCAGAATCAAGACTTCTATGATATCTCTTGTGCGATGGCTTCAATATCCCTCT 600
   K Y Q N Q D F Y D I S L V D G F N I P L
601 CTCTGTAACCTCCCTCAGACTCTTCGTGCAAAAGTAATAGGTTGCACCACCGACATAATGC 660
   S V T P S D S S C K V I G C T T D I N A
661 TGTGTGCCCTGCAGAACTGAAAGTGACCGATGGATGCAAGAGTGCTTGTGCGGAGTTCAA 720
   V C P A E L K V T D G C K S A C A E F N
721 TACCCCTCAATACTGCTGTACCGGAGACTATGAAACAACCTGCTCTCCACCAACTATTC 780
   T P Q Y C C T G D Y E N N C S P T N Y S
781 GCAATTCTCAAGGGGAGTGCCACAGGCATACAGCTATGCCAAGGACGATGCCACCAG 840
   Q F F K G Q C P Q A Y S Y A K D D A T S
841 CACCTTCACCTGCCCTTCTGGTGCTAATTACAACGTCGCTCTCTGTGGTTAGGAAGATAT 900
   T F T C P S G A N Y N V V F C G * -----
901 TTACGTAATATCTCTCTACTCATATAGTAACAATAG 936
  
```

P. sylvestris TLP gēna sekvenču publicēta NCBI datu bāzē (GenBank Acc. No. JX461338).



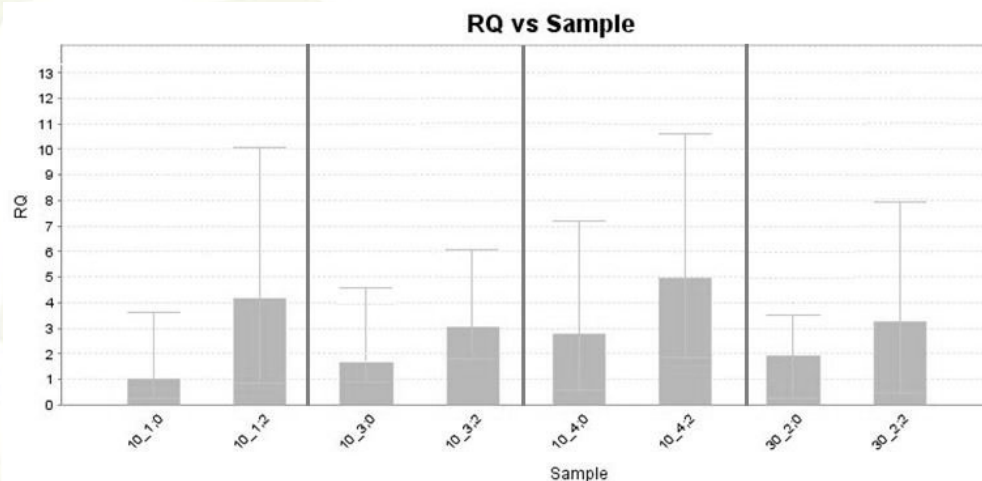
Analizējot iegūto *P. sylvestris* sekvenci, konstatēts:

- Proteīnu veido 234 aminoskābes, molekulmasa ir 24,6 kDa.
- Sekvence satur 5 konservatīvās aminoskābes, kas raksturīgas augu PR5 grupas proteīniem ar pretsēnīšu iedarbību (arginīns (R), glutamīnskābe (E) un trīs aspargīnskābes (D), kas atzīmētas ar *).
- Sekvence satur taumatīna dzimtas iezīmi (*thaumatin family signature*) (PS00316): G-x-[GF]-x-C-x-T-[GA]-D-C-x(1,2)-[GQ]-x(2,3)-c.
- Sekvence satur TLP Large (L-) type raksturīgos 16 konservatīvos cisteīnus (C).
- Pasvītota signālpeptīda sekvence.
- Salīdzinot ar *P. taeda*, sekvenē ir 7 aa izmaiņas. (99% līdzība ar TLP mRNS, cds no *Pinus taeda*).

```
43 atggggcggaagaacatgcgaggggtccctttggatcacagcaata
   M G R R T C A G S L W I T A I
88 gtaactttattagctcttaatgtttatctgcaaggatatagaagg
   V T L L A L N V Y L Q G I E G
133 ggcacaatgaccgtcaaaaaccagtgtcatcacagtttggggc
   A T M T V K N Q C S Y T V W A
178 gctggcagtcggggcggtgaagcaactgggcaggggtgagaca
   A G S P G G G K Q L G Q G E T
223 tggagttttgatgttccagcggaacaacaggaggcagaatctgg
   W S F D V P A G T T G G R* I W
268 gggcgtaccggttgtccttcgacgtggcagtggtacaggtagc
   G R T G C S F D A G C G T G S
313 tgtaccactggtgactgtggtgggttgcattgtcaaggctat
   C T T G D C G G L L N C Q G Y
358 ggaagcgtccctgcaacgctttttgaatatggtctgaataagtag
   G S V P A T L F E* Y G L N K Y
403 cagaatcaagacttctatgatattctcttgcgatggcttcaat
   Q N Q D F Y D* I S L V D* G F N
448 atccctctctctgtaactccctcagactcttcgtgcaaagtaata
   I P L S V T P S D S S C K V I
493 ggttgaccaccgacataaatgctgtgtgcccgtcagaactgaaa
   G C T T D I N A V C P A E L K
538 gtgaccgatggatgcaagagtgtgtgtgcggagtccaataccct
   V T D G C K S A C A E F N T P
583 caatactgctgtaccggagactatgaaaacaactgctctccacc
   Q Y C C T G D Y E N N C S P T
628 aactattcgcaattcttcaaggggcagtgccacaggcatacagc
   N Y S Q F F K G Q C P Q A Y S
673 tatgccaaaggacgatgccaccagcaccttcacctgcccttctggt
   Y A K D D* A T S T F T C P S G
718 gctaattacaacgtcgtcttctgtggttag 747
   A N Y N V V F C G *
```

TLP gēna ekspresijas izmaiņas sējeņos pirms un pēc MJa apstrādes

- TLP gēna ekspresija palielinājās pēc MJa apstrādes.
- Pārāk liela Mja deva bija nāvējoša stādiem un arī TLP ekspresijas līmenis bija zemāks nekā ar optimālu devu.

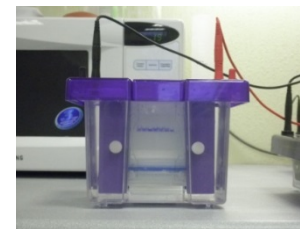


- 10 stādi katrā apstrādes grupā;
- Neapstrādāti stādi kā kontroles;
- Paraugi, kas ievākti 2 nedēļas pēc apstrādes, uzrādīja atšķirīgus rezultātus

TLP gēna ekspresijas izmaiņas. Parauga nosaukumā pirmais simbols nozīmē paraugu grupu (apstrāde ar 10mM MJa; 30 mM Mja); otrs – parauga numuru un simbolu pēc komata – apstrādes laiku, tas ir, 0 – pirms apstrādes, 2 – 2 nedēļas pēc apstrādes).

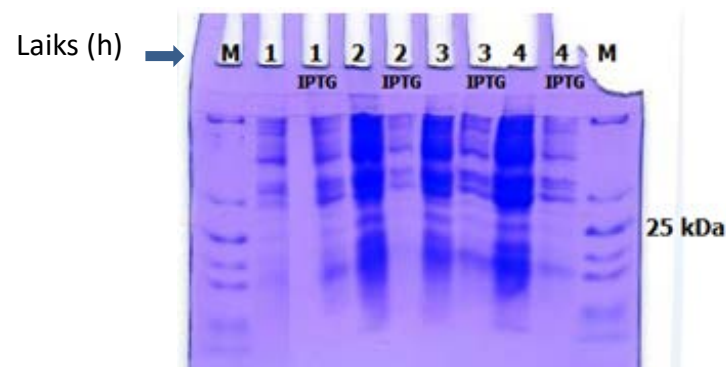
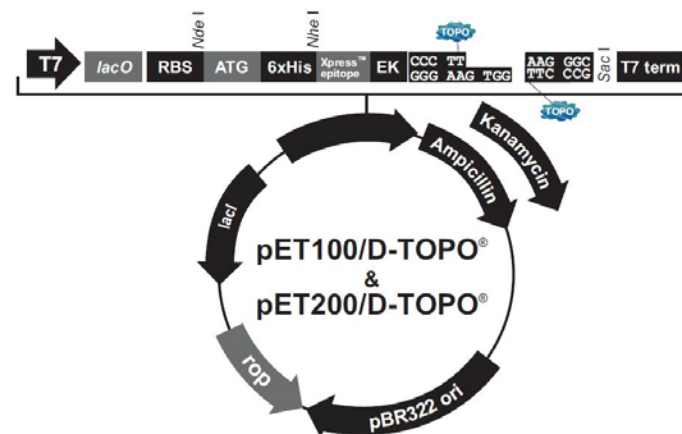


Taumatīnam līdzīgā proteīna sintēze



Champion pET Directional TOPO Expression Kit (Invitrogen)

- Izmantots ekspresijas vektors pET100 un BL21 Star šūnas.
- Vāja TLP ekspresija, proteīna klātbūtne pie nešķīstošajiem proteīniem un samazināta *E. coli* augšana, liecina, ka TLP ekspresija BL21 šūnās ir toksiska pašām baktērijām.



M - marķieris; 1 – 4 – stundas pēc inducēšanas

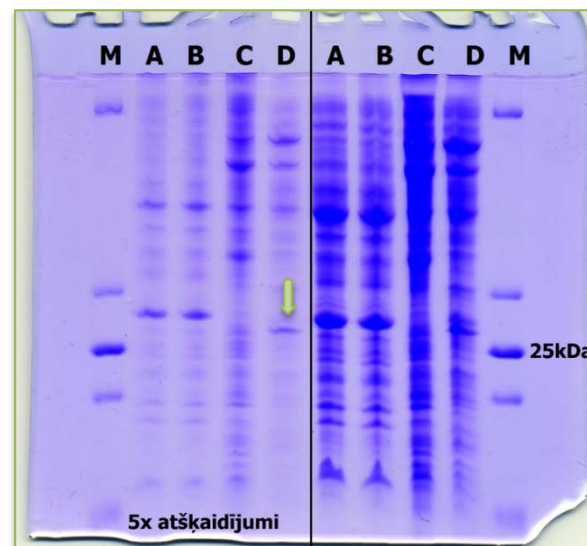


TLP ekspresijas optimizēšana



• Tika optimizēta proteīna ekspresija tā, lai baktērija šo proteīnu varētu ekspresēt noteiktā daudzumā, saglabājot dzīvotspēju un neveidotu ieslēguma ķermeņus (paliktu šķīstošā veidā):

- Samazinot IPTG koncentrācijas (0,05 – 1mM),
- Samazinot augšanas temperatūru (25°C),
- Pievienojot 1% glikozi, tā var palīdzēt novērst T7 RNS polimerāzes ekspresiju un palīdz stabilizēt vektoru.



M – marķieris

A – bez plazmīdas/bez IPTG

B – bez plazmīdas/ar IPTG

C – ar plazmīdu/bez IPTG

D – ar plazmīdu/ar IPTG (TLP)

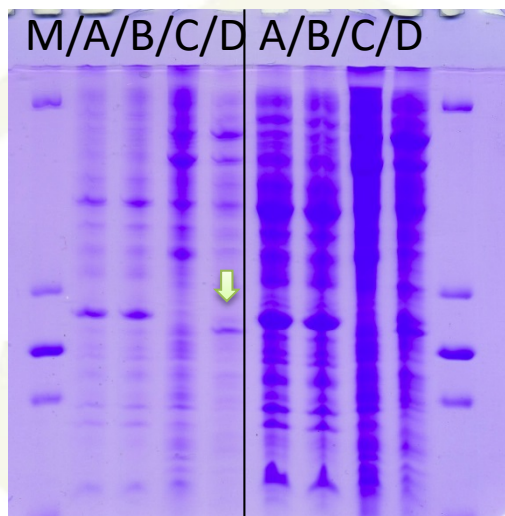
TLP (24,6 kDa) + N-terminal peptid (3 kDa) = **27,6 kDa**.

Atšķirīgi inducēšanas laiki



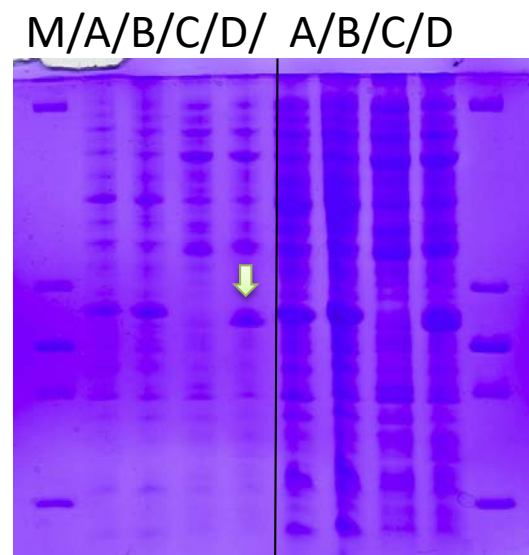
Sākotnēji šūnas tika inducētas ar 1mM IPTG
37°C OD₆₀₀ = **0.5**.

Pēc optimizēšanas, indukcija tika veikta
pie lielāka šūnu daudzuma (OD₆₀₀ = **1,5**).



5x atšķaidījums

M – marķieris
A – bez plazmīdas/bez IPTG
B – bez plazmīdas/ar IPTG
C – ar plasmid/bez IPTG
D – ar **plazmīdu/ar IPTG (TLP)**

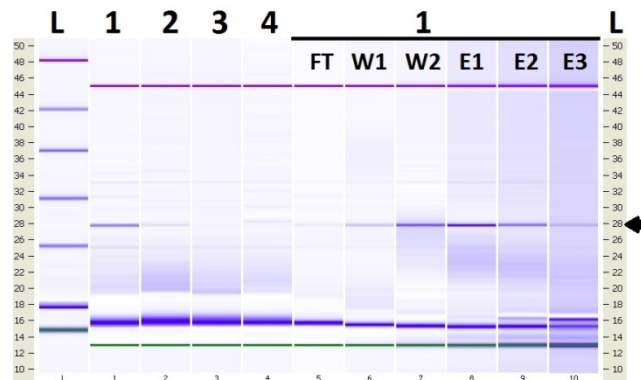
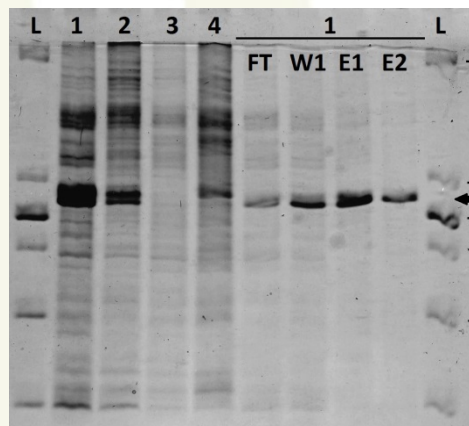


5x atšķaidījums

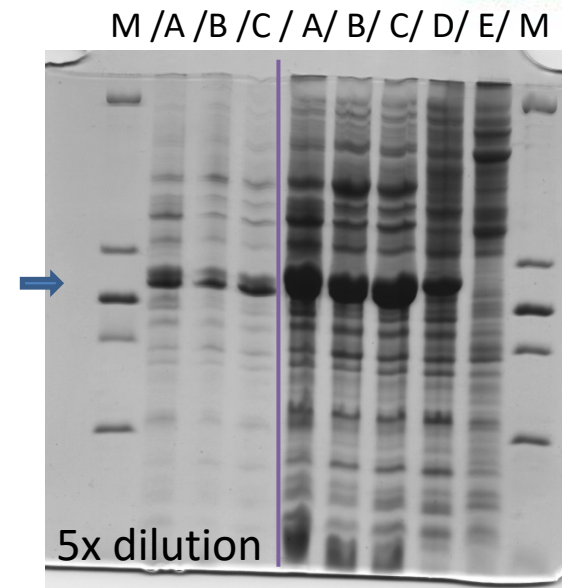
IPTG koncentrāciju efekts

- Šūnas inducētas pie 25°C pa nakti, izmantojot dažādas IPTG koncentrācijas, bez glikozes (0.05, 0.1, 0.5 mM).
- Dažādās IPTG koncentrācijās īpaši neietekmēja ekspresētā proteīna daudzumu.

Attīrīšana ar Ni-NTA



Protein doublets



Audzēts 25°C ~ 60h ar atšķirīgām IPTG konc.

M – protein MW marker

A – 0,1mM IPTG

B – 0,5mM IPTG

C – 0,05mM IPTG

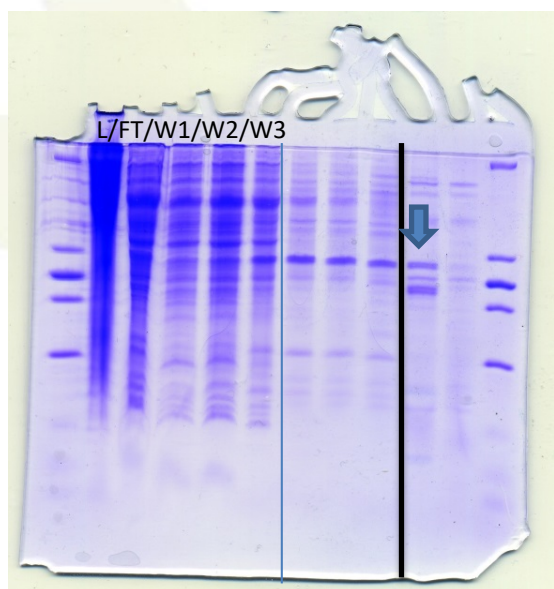
D – ar plazmīdu/bez IPTG

E – bez plazmidas

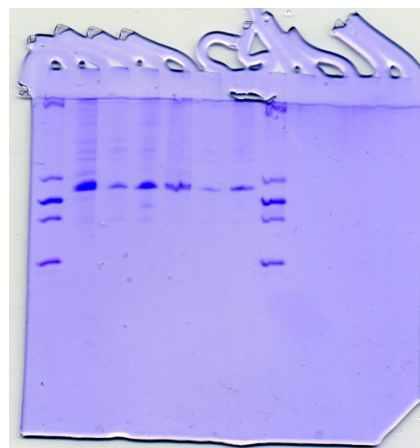
Analizēts uz SDS-PAAG un izmantojot 2100 Bioanalyzer. 1 –lizāts no IPTG inducētām *E. coli* ar TLP konstruktū (ar 1% glikozi); 2 –lizāts no IPTG inducētām *E. coli* ar TLP konstruktū (bez 1% glikozes); 3 –lizāts no neinducētām *E. coli* ar TLP konstruktū (ar 1% glikozi); 4 –lizāts no neinducētām *E. coli* ar TLP konstruktū (bez 1% glikozes); L – marķieris. Ni-NTA attīrīšana: 1: FT – flow - through; W 1-2 – mazgāšana; E 1-3 – eluāti.

His-tag astes nošķelšana

- TLP tika ekspresēts ar 6x His asti, lai varētu veikt proteīnu attīrīšanu,
- Proteīnu attīrīšana dabīgos (native) apstākļos veic ar imidazolu,
- Imidazols inhibē enterokināzes aktivitāti,
- Imidazola aizvākšana ar Sephadex G-50,
- Antimikrobiālās aktivitātes testos izmantoja TLP ar 6x His asti.

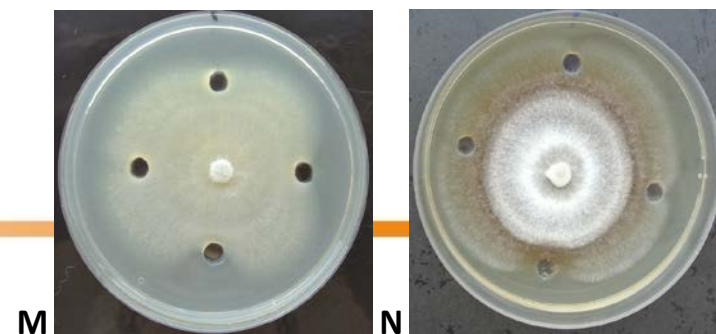
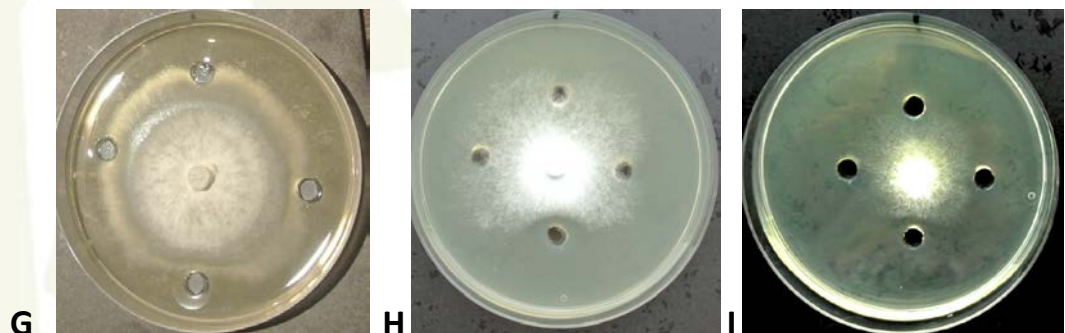
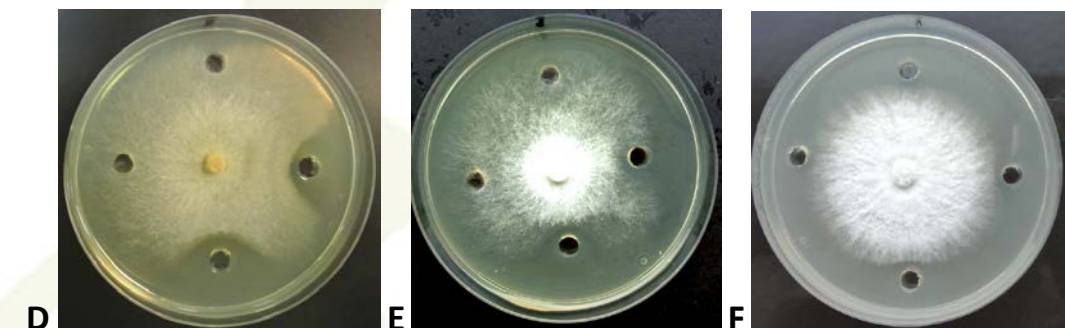
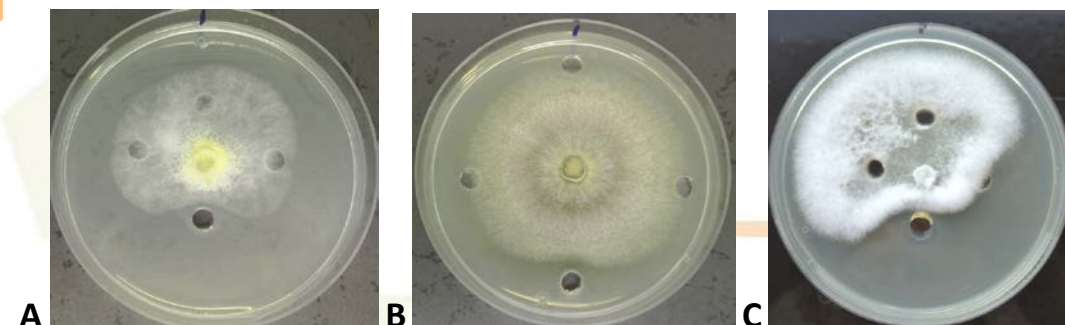


E1/E2/E3/+enterokināze



Eluāti + enterokināze pēc inkubēšanas

L - lizāts
FT- flow-through
W- wash
E- eluate



Proteīna antimikrobiālās aktivitātes pārbaude ar *L. seditiosum* un 11 citām sēņu sugām.

(A) *Trichoderma* sp.,

(B) *A. aerolatum*,

(C) *B. adusta*,

(D) *H. parviporum* 17,

(E) *H. parviporum* 162,

(F) *C. borealis*,

(G) *G.sepiarium*,

(H) *H.annosum* 50,

(I) *H. annosum* V Ma15,

(J) *L.seditiosum*,

(K) *L. conigenum*,

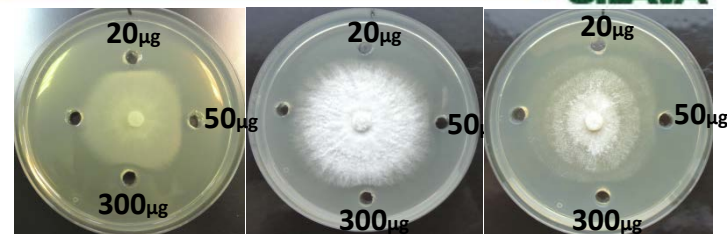
(L) *R.bicolor*,

(M) *S.brinkmannii*,

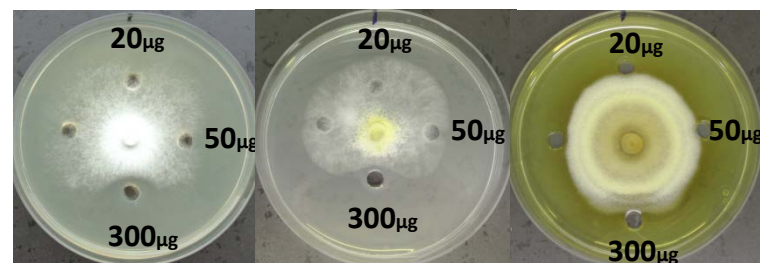
(N) *S.sanguinolentum*.

Pulksteņrādītāja virzienā no augšas: 1 - 20μg; 2 - 50 μg; 3 - 300 μg proteīna; 4 - kontrole (Ni - NTA eluēšanas buferis).

- *S. brinkmanni*, *C. borealis* un *R. bicolor* bija visjūtīgākie pret TLP, sēnes augšana tika inhibēta jau pie 20 µg TLP.
- *H. annosum* 50, *Trichoderma sp.* un *L. seditiosum* tika inhibēti tikai pie 100 µg TLP.
- Ilgākais inhibēšanas laika tika novērots *R. bicolor* (14 dienas), *G. sepiarium* (14 dienas), *H. parviporum* (10 dienas), *H. annosum* (10 dienas) un *L. seditiosum* (14 dienas).
- Mazāka ietekme bija uz ātri augošajām sēnēm *B. adusta* un *Trichoderma sp.*.



S. brinkmanni, *C. borealis*, *R. bicolor*



H. annosum, *Trichoderma sp.*, *L. seditiosum*

Daļa no šīm sēnēm ir nozīmīgi egļu patogēni Latvijā. Arhipova N. et al. 2011 pētījums rāda, ka aptuveni 1/5 no eglēm (*Picea abies*) Latvijas mežos ir inficētas ar trapes izraisošām sēnēm un biežāk sastopamā bija *H. parviporum*, kas tika izolēta no celmiem (11.1%) un stumbriem (55,3%). *S. sanguinolentum* bija otra biežāk sastopamā sēne. Abu šo sēņu augšanu relatīvi stipri ietekmēja TLP un salīdzinoši ilgi saglabākās inhibēšanas efekts.



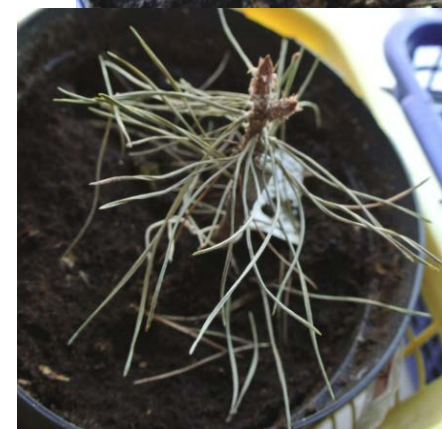
Lai novērtētu inducētās rezistences efektu, apgūta *L. seditiosum* audzēšana šķidrā barotnē un veiksmīga sēnes inokulēšanas metode uz *P. sylvestris* stādiem.



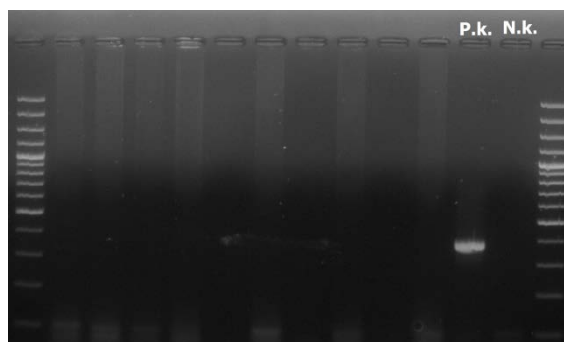
Pirms apstrādes



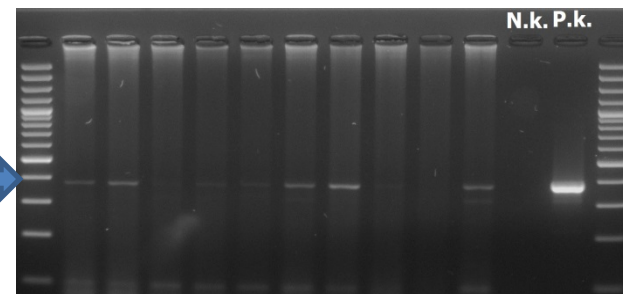
**3 nedēļas pēc
inokulēšanas ar
*L. sed.***



**3 mēneši pēc
inokulēšanas ar *L.*
*sed.***



Ar *L. sed.* specifiskiem praimeriem
produktam jābūt **382 bp**



Inducētā rezistence (MJa)

Sagatavošanas darbi jonu plūsmas sekvenēšanai Norvēģijā (Norvēģijas ainavu un mežu izpētes institūtā Ås)



- Izmēģinātas dažādas RNS izdalīšanas metodes, lai iegūtu atbilstošas kvalitātes RNS izmantošanai darbā ar jonu plūsmas sekvenātoru (paraugi analizēti ar Agilent bioanalizātoru).
- Veikts eksperiments ar *P. sylvestris* klona rametiem:
 - 3 rameti apstrādāti ar 10mM MJa (pa 5ml), 6 rameti nepastrādāti (kontroles),
 - 2 nedēļas pēc apstrādes ar MJa ievāktas skujas no visiem rametiem (arī kontrolēm). Veikta *TLP* gēna ekspresija ar qPCR un rametu pārbaude ar stresa marķieriem. Atlasīti piemērotākie rameti darbā ar jonu plūsmas sekvenātoru.
- Norvēģijas ainavu un mežu izpētes institūtā Ås veikta jonu plūsmas sekvenēšana kontrolēm un rametiem, kas apstrādāti ar MJa, lai varētu atlasīt kandidātģēnus, kas saistīti ar inducēto rezistenci.



Inducētā rezistence (MJa)

Eksperimenti ar *P. sylvestris* klonu rametiem:



1. Klonu rameti:

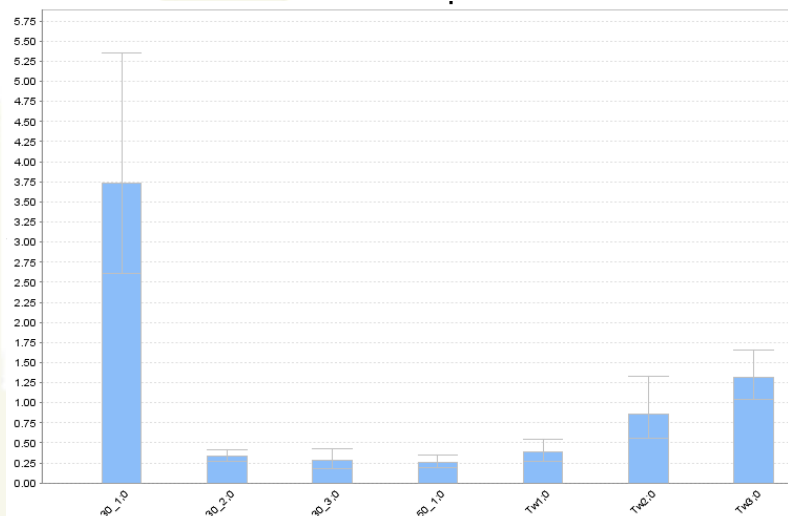
- pārbaudīti ar SSR marķieriem,
- rametu skuju pārbaude (lai izslēgtu citu patogēnu sēņu ietekmi uz šo eksperimentu),

2. Apstrāde ar metiljasmonātu:

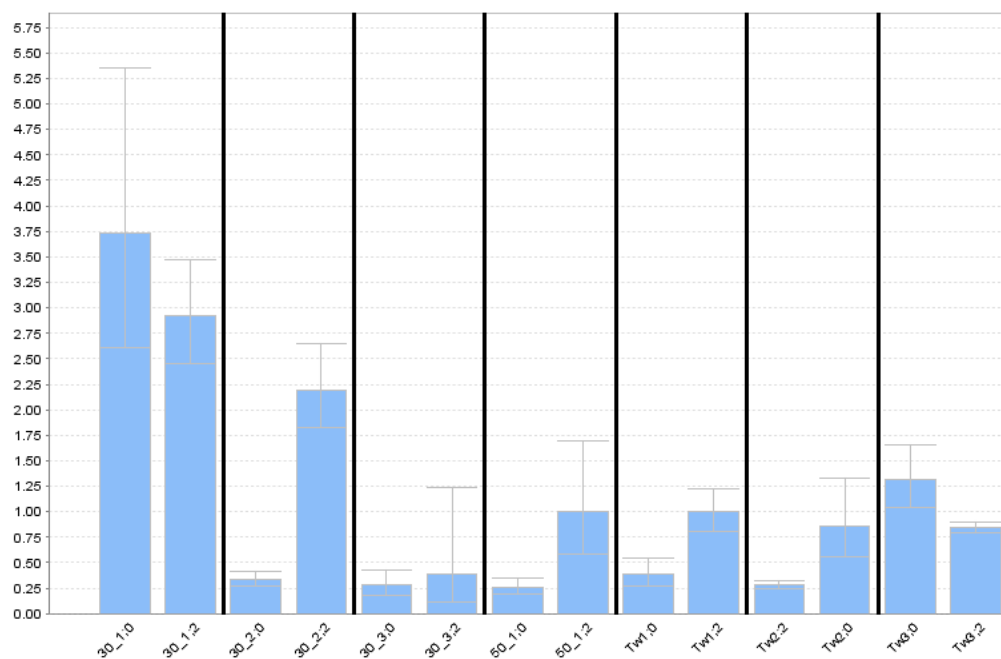
- 1x apstrādāti ar 0, 5, 10, 30, 50 mM MJa pa 5ml,
- Pēc 2 nedēļām inokulēti ar *L. seditiosum*,
- Pēc 3 nedēļām un pēc 3 mēnešiem veikta *L. seditiosum* pārbaude skujās,
- 2 nedēļas pēc apstrādes ar MJa un 3 nedēļas pēc stādu inokulēšanas ar *L. seditiosum* veikta *TLP* gēna ekspresija, izmantojot qPCR un stresa gēnu marķieru pārbaude (izmantoti dhN 3, Lea, ABA, P5SC2 marķieri).



Pirms apstrādes



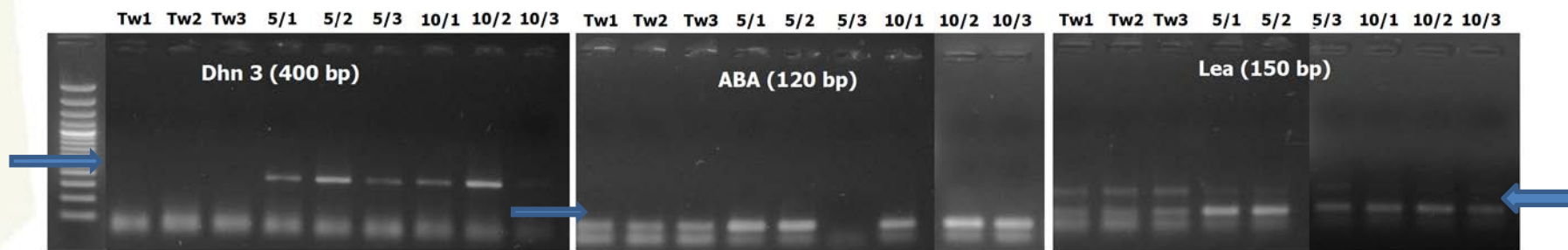
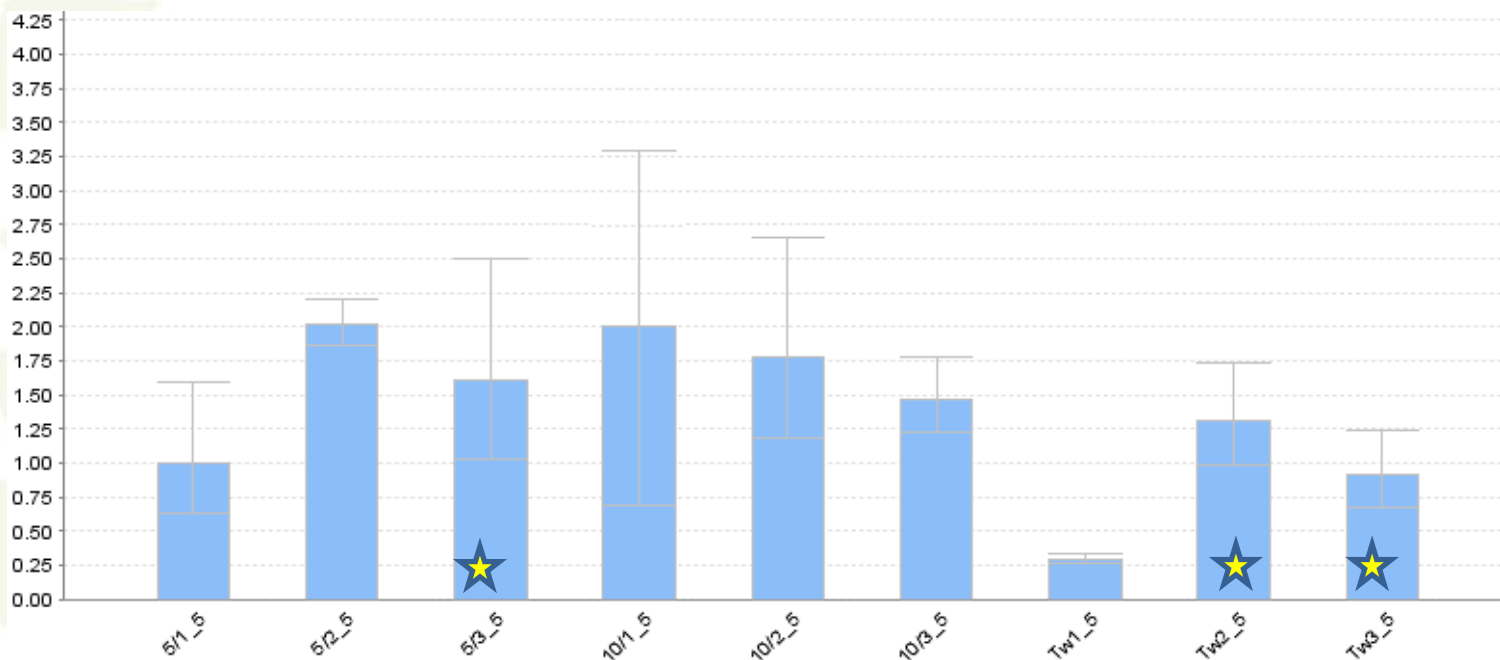
10_3; 0 – pirms apstrādes
10_3; 2 – 2 nedēļas pēc apstrādes



2 nedēļas pēc apstrādes ar MJa

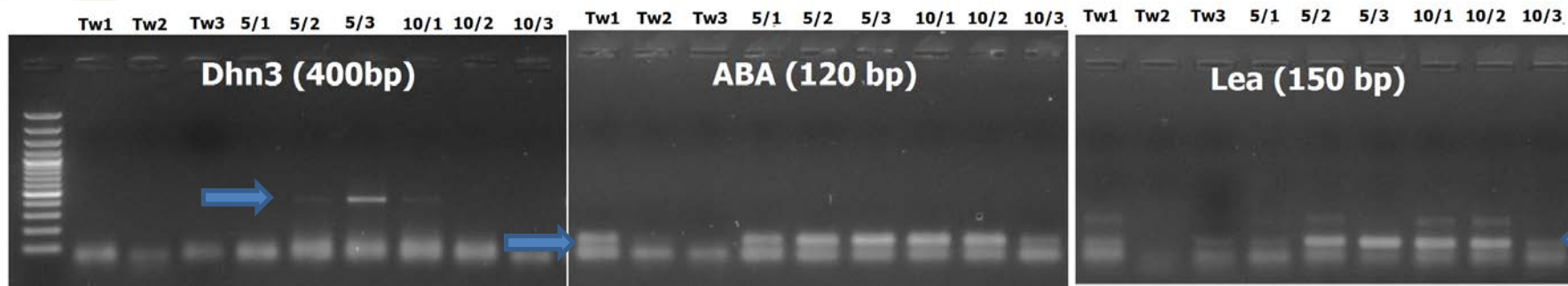
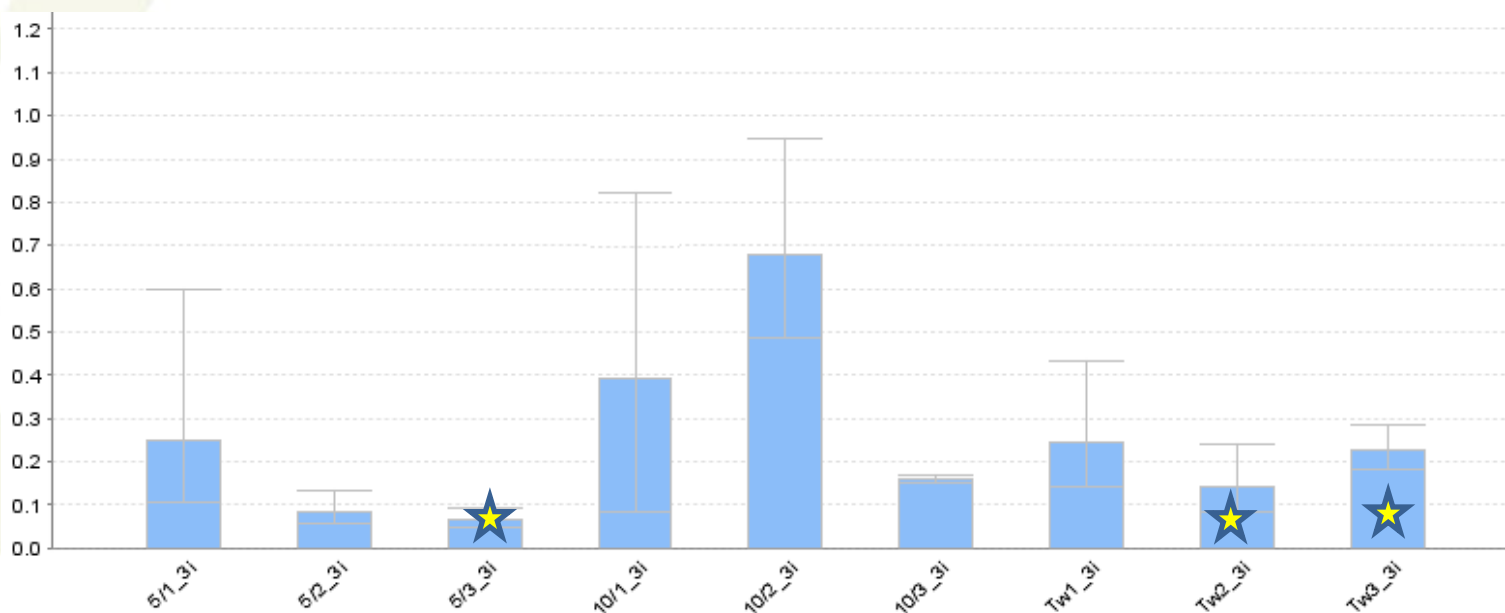


★ - nav nokaltuši



3 nedēļas pēc inokulēšanas

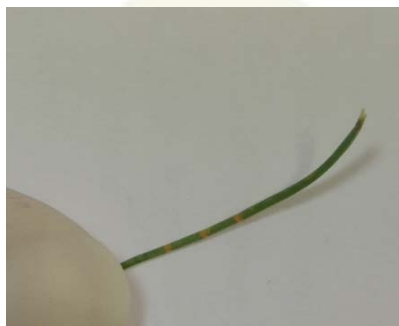
★ - nav nokaltuši



Inducētās rezistences pārbaude sējeņos

Problēmas:

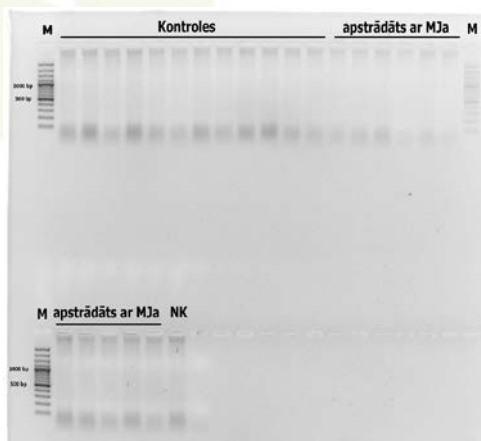
- sakņu iekalšana,
- trūdodiņa klātbūtne,
- citu patogēno sēņu klātbūtne augsnē.



kontroles



MJa



L. seditiosum pārbaude kontroles un MJa apstrādātās skuļās pēc 6 mēnešiem. Sēnes klātbūtnes gadījumā jābūt 382 bp garam PCR produktam. M – garuma marķieris.

Darbi šobrīd:

- Hitināžu aktivitātes pārbaude,
- TLP un hitināžu gēnu ekspresijas pārbaude dažādos laika periodos.

Vasarā:

- Inducētās rezistences atkārtota pārbaude sējeņos un klona rametos.



Paldies!

This research was funded by European Regional Development
Fund project No 2DP/2.1.1.2.0/10/APIA/VIAA/021.