

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MOLEKULSKE IN FUNKCIONALNE BIOLOGIJE

Tamara PEZIĆ

**ŠTUDIJ DELOVANJA PROMOTORJEV GENOV
PR1b IN TGA2 IZ KROMPIRJA**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MOLEKULSKE IN FUNKCIONALNE BIOLOGIJE

Tamara PEZIĆ

**ŠTUDIJ DELOVANJA PROMOTORJEV GENOV PR1b IN TGA2 IZ
KROMPIRJA**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja

**STUDYING THE ACTIVITY OF PROMOTERS PR1b AND TGA2
GENES IN POTATOES**

M. SC. THESIS
Master Study Programmes

Ljubljana, 2016

Magistrsko delo je zaključek univerzitetnega študija 2. bolonjske stopnje Molekulska in funkcionalna biologija na Oddelku za biologijo na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo na Oddelku za biotehnologijo in sistemsko biologijo na Nacionalnem inštitutu za biologijo.

Senat Oddelka za biologijo je dne 20. 5. 2015 odobril temo magistrskega dela in za recenzenta imenoval prof. dr. Darjo Žgur Bertok.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: doc. dr. Matej BUTALA
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelke za biologijo

Mentor: prof. dr. Kristina GRUDEN
Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo

Recenzent: prof. dr. Darja ŽGUR BERTOK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelke za biologijo

Datum zagovora: 2. 9. 2016

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

Tamara Pezić

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du2
DK	UDK 577.218:633.491(043.2)=163.6
KG	PR1b/TGA2/krompir (<i>Solanum tuberosum</i> L.)/ <i>Nicotana benthamiana</i> / transformacija
AV	PEZIĆ, Tamara, diplomirana biologinja (UN)
SA	GRUDEN, Kristina (mentorica)/ŽGUR BERTOK, Darja (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij molekulske in funkcionalne biologije
LI	2016
IN	ŠTUDIJ DELOVANJA PROMOTOJEV GENOV PR1B IN TGA2 IZ KROMPIRJA
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja)
OP	XII, 93 str., 23 pregl., 37 sl., 1 pril., 89 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Ob okužbi krompirja s krompirjevim virusom Y (PVY) se na mestu okužbe in v preostalih delih rastline kopiči salicilna kislina, kar aktivira različne obrambne mehanizme. Ob tem se transkripcijski faktor TGA2 veže na promotor PR1b in s tem aktivira transkripcijo gena za protein PR1b, ki ga povezujejo z odgovorom rastline na okužbo s patogenom. V magistrski nalogi smo raziskovali aktivnost promotorjev genov PR1b in TGA2 iz krompirjevih genotipov PW363, Rywal in Désirée. Z analizami nukleotidnih promotorskih zaporedij PR1b v bioinformatičnih bazah smo dokazali raznolikost promotorjev znotraj enega genotipa, kot tudi med genotipi. Za preučevanje aktivnosti promotorjev <i>in vivo</i> smo pripravili fuzijo zaporedja promotora z zapisom za fluorescenčni protein in nato sledili izražanju fluorescenčnega proteina, ki je pogojeno z aktivnostjo promotora. Konstrukt smo v rastlino vnesli preko prehodne transformacije modelne rastline <i>N. benthamiana</i> . Glede na rezultate, pridobljene s konfokalnim mikroskopom, sklepamo, da se transkripcijski faktor TGA2 in protein PR1b inducirata tako s funkcionalnim analogom salicilne kisline (SA) 2,6-dikloroizonikotinska kislina (INA) in z rastlinskimi hormonometilenom (ET), ne pa tudi z metil-jasmonsko kislino (MeJA). S pomočjo stabilne transformacije kultivarjev Rywal in Désirée smo ugotovili, da so za transformacijo primerni tako listi kot stebela rastline, ter da je transformacija uspešnejša s plazmidi, ki nosijo odpornost proti kanamicinu, v primerjavi s plazmidi, ki nosijo odpornost proti higromicinu, saj so rastline nanj manj občutljive. Dobili smo transgene rastline, ki so imele v genom vnesen konstrukt promotora gena TGA2 ali PR1b v fuziji z fluorescenčnim proteinom.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Du2

DC UDC 577.218:633.491(043.2)=163.6

CX PR1b/TGA2/potato (*Solanum tuberosum* L.)/ *Nicotana benthamiana*/transformation

AU PEZIĆ, Tamara

AA GRUDEN, Kristina (supervisor)/ŽGUR BERTOK, Darja (co-advisor)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljani, Biotechnical faculty, Master Study Programmes in Molecular and functional biology

PY 2016

TI STUDYING THE ACTIVITY OF PROMOTERS PR1b AND TGA2 GENES IN POTATOES

DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)

NO XII, 93 p., 23 tab., 37 fig., 1 ann., 89 ref.

LA sl

AL sl/en

AB Following the infection of the potato with the potato virus Y (PVY), salicylic acid starts accumulating at the infection site, which activates different defence responses. The binding of the transcription factor TGA2 to the promoter of PR1b gene activates the transcription of PR1b gene, which is involved in plant defense against pathogen infection. In this master thesis, we were studying the activity of the promoters of PR1b and TGA2 genes from potato genotypes PW363, Rywal and Désirée. For *in vivo* analysis we fused promoter sequences with the sequences of fluorescent proteins and followed the expression of fluorescent proteins, which is controlled by the promoter activity. The constructs were inserted in the model plant *N. benthamiana* by transient transformation. According to the results obtained by confocal microscopy, we concluded that the transcription factor TGA2 and the protein PR1b are induced with 2,6-dichloroisonicotinic acid (INA) and with the plant hormones ethylene (ET), but not with methyl-jasmonic acid (MeJA). With the use of the stable transformation on cultivars Rywal and Désirée, we found out that both leaves and stems of the plant are suitable starting material. Moreover, transformation is more successful when the plasmids containing kanamycin resistance gene instead of hygromycin resistance gene are used, since plants are less affected by kanamycins concentration. At the end of experiment we had transgenic plants, which had promotor of gene TGA2 or PR1b fused with fluorescent protein inserted in plant's genome.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	X
KAZALO PRILOG	XIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XIV

1	UVOD.....	1
1.1	OPREDELITEV PROBLEMA.....	1
1.2	CILJ RAZISKOVANJA	1
1.3	HIPOTEZA.....	1
2	PREGLED OBJAV	2
2.1	KROMPIR	2
2.2	VIRUS PVY	3
2.2.1	Lastnosti virusa PVY.....	3
2.2.2	Virusna okužba krompirja	3
2.3	OBRAMBNI MEHANIZMI RASTLIN	4
2.3.1	Salicilna kislina	7
2.3.2	Protein NPR1	7
2.3.3	Transkripcijski faktorji TGA.....	9
2.3.3.1	Transkripcijski faktor TGA2	10
2.3.4	Proteini PR.....	10
2.3.4.1	Proteini PR1	12
2.3.4.1.1	Protein PR1b.....	13
3	MATERIAL IN METODE	14
3.1	MATERIAL.....	14
3.1.1	Gojišča	14
3.1.2	Laboratorijska oprema	16
3.1.3	Kompleti reagentov	17
3.1.4	Kemikalije	17
3.1.5	Plazmidi	17
3.1.6	Plazmid pENTR™/D-TOPO®	19
3.1.7	Ciljna plazmida pH7WG in pK7WG.....	20
3.1.8	Bakterijske kulture.....	21
3.1.8.1	Bakterija <i>Escherichia coli</i>	21

3.1.8.2	Bakterija <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	21
3.1.9	Rastlinski material	22
3.1.9.1	Rastni pogoji.....	22
3.1.9.2	<i>Nicotiana benthamiana</i>	22
3.1.9.3	<i>Solanum tuberosum</i> ssp.	22
3.1.10	Programska oprema	22
3.2	METODE.....	23
3.2.1	Priprava gojišč	23
3.2.2	Kloniranje promotorjev	23
3.2.2.1	Načrtovanje začetnih oligonukleotidov	23
3.2.2.2	Verižna reakcija s polimerazo	29
3.2.2.3	Agarozna gelska elektroforeza	30
3.2.2.4	Izolacija DNA iz gela	31
3.2.2.5	Merjenje koncentracije DNA.....	31
3.2.2.6	Fuzijska verižna reakcija s polimerazo.....	31
3.2.2.7	Kloniranje konstrukta v pENTR in transformacija v <i>E.coli</i>	32
3.2.2.8	Verižna reakcija s polimerazo iz bakterijskih kolonij	33
3.2.2.9	Prekonočne kulture	35
3.2.2.10	Trajne kulture.....	35
3.2.2.11	Izolacija plazmida iz bakterij.....	35
3.2.2.12	Sekvenciranje.....	35
3.2.2.13	LR-reakcija	36
3.2.2.14	Transformacija bakterije <i>E.coli</i>	36
3.2.2.15	Transformacija elektrokompetentnih bakterij <i>A. tumefaciens</i>	37
3.2.2.16	Verižna reakcija s polimerazo iz kolonij agrobakterij.....	37
3.2.3	Transformacija rastlin	38
3.2.3.1	Prehodna transformacija rastlin	38
3.2.3.1.1	Agroinfiltracija	38
3.2.3.1.2	Tretiranje s hormoni	39
3.2.3.1.3	Opazovanje pod konfokalno lupo	40
3.2.3.2	Stabilna transformacija rastlin	40
3.2.3.2.1	Stabilna transformacija kultivarja Rywal	40
3.2.3.2.2	Stabilna transformacija kultivarja Désirée.....	42
4	REZULTATI	45
4.1	BIOINFORMATSKE ANALIZE PROMOTORJA GENA PR1B	46
4.1.1	Poravnave nukleotidnih zaporedij izbranih promotorjev	46
4.1.2	Iskanje vezavnih mest za transkpcijske faktorje v promotorskih zaporedjih	51
4.1.3	Iskanje znanih cis regulatornih elementov v promotorskih zaporedjih	54
4.2	PRIPRAVA KONSTRUKTOV.....	56
4.2.1	Kloniranje konstruktov	56
4.2.2	Potrditev konstruktov v vstopnem plazmidu pENTR v transformiranih bakterijah <i>E. coli</i>	59

4.2.3	Potrditev konstruktov v ciljnem plazmidu v transformiranih bakterijah <i>E. coli</i>	60
4.2.4	Potrditev konstruktov v ciljnem plazmidu v transformiranih bakterijah <i>A. tumefaciens</i>	61
4.3	TRANSFORMACIJA RASTLIN	64
4.3.1	Prehodna transformacija modelne rastline / agroinfiltracija.....	64
4.3.1.1	Indukcija izražanja gena TGA2 po tretiranju z INA v modelni rastlini	64
4.3.1.2	Indukcija izražanja gena PR1b z INA v modelni rastlini	65
4.3.1.3	Indukcija izražanje promotorja gena PR1b z etilenom in MeJA v modelni rastlini	68
4.3.2	Stabilna transformacija.....	71
4.3.2.1	Transformacija sorte Rywal.....	71
4.3.2.1.1	Stabilna transformacija sorte Rywal s konstruktom PR1b(Desiree.1)::YFP	71
4.3.2.1.2	Stabilna transformacija sorte Rywal s konstruktom TGA2(Rywal.1)::YFP	73
4.3.2.2	Stabilna transformacija sorte Désirée	74
4.3.2.2.1	Stabilna transformacija sorte Désirée s konstruktom TGA2(Rywal.1)::YFP ..	74
4.3.2.2.2	Stabilna transformacija sorte Désirée s konstruktom TGA2(Rywal.1)::CFP...	75
4.3.2.2.3	Stabilna transformacija sorte Désirée s konstruktom PR1b(Desiree.1)::YFP ..	77
4.3.2.3	Prestavljanje transgenih poganjkov v banjice.....	78
5	RAZPRAVA	79
6	SKLEPI.....	85
7	POVZETEK	86
8	VIRI	87

ZAHVALA

PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Seznam družin proteinov PR, primer in biološke aktivnosti posameznih družin	11
Preglednica 2: Sestava gojišč	14
Preglednica 3: Načrtovani začetni oligonukleotidi.....	28
Preglednica 4: Reakcijska mešanica za pomnoževanje promotorja PR1b, fluorescenčnega proteina in konstrukta TGA2	29
Preglednica 5: Vzorec DNA in pripadajoča začetna oligonukleotida za pomnoževanje promotorja PR1b, fluorescenčnega proteina in konstrukta TGA2.....	30
Preglednica 6: Program PCR reakcije, s katero smo pomnožili promotor PR1b, fluorescenčni protein in konstrukt TGA2	30
Preglednica 7: Reakcijska mešanica za pomnoževanje in fuzijo promotorja PR1b in fluorescenčnega proteina.....	31
Preglednica 8: Vzorca DNA in pripadajoča začetna oligonukleotida za pomnoževanje in fuzijo promotorja PR1b in fluorescenčnega proteina.....	32
Preglednica 9: Program PCR reakcije za pomnoževanje in fuzijo promotorja PR1b in fluorescenčnega proteina.....	32
Preglednica 10: Reakcijska mešanica za kloniranje PCR produkta v plazmid pENTR.....	33
Preglednica 11: Reakcijska mešanica za PCR reakcijo za pomnoževanje iz plazmida pENTR	34
Preglednica 12: Program PCR reakcije za pomnoževanje iz plazmida pENTR	34
Preglednica 13: Reakcijska mešanica za pomnoževanje iz ciljnega plazmida pH7WG ali pK7WG s PCR reakcijo	36
Preglednica 14: Program PCR reakcije iz ciljnega plazmida pH7WG ali pK7WG.....	36
Preglednica 15: Reakcijska mešanica za reakcijo PCR iz agrobakterije.....	37
Preglednica 16: Program PCR reakcije za pomnoževanje iz agrobakterije	38
Preglednica 17: Konstrukti uporabljeni pri agroinfiltraciji	39

Preglednica 18: Poskusi agroinfiltracije	40
Preglednica 19: Pogoji za opazovanje markerjev s konfokalno lupo	40
Preglednica 20: Poskusi stabilne transformacije na sorti Rywal	42
Preglednica 21: Poskusi stabilne transformacije na sorti Désirée	44
Preglednica 22: Analiza nukleotidnih zaporedij promotorja PR1b iz genotipov PW363, Rywal in Désirée s pomočjo bioinformatične baze Transfac za iskanje vezavnih mest za transkripcijske faktorje v promotorskih zaporedjih.....	51
Preglednica 23: Analiza nukleotidnih zaporedij promotorja PR1b iz genotipov PW363, Rywal in Désirée s pomočjo bioinformatične baze PlantCARE za določanje cis-regulatornih elementov	54

KAZALO SLIK

Slika 1: Krompir, okužen s PVY	4
Slika 2: Signalne poti SAR.....	6
Slika 3: Nukleotidno zaporedje fluorescenčnega proteina mCherry (711 bp)	18
Slika 4: Nukleotidno zaporedje fluorescenčnega proteina CFP (720 bp)	18
Slika 5: Nukleotidno zaporedje fluorescenčnega proteina YFP (720 bp)	18
Slika 6: Plazmidna karta vektorja pENTR TM /D-TOPO [®]	19
Slika 7: Plazmidna karta vektorja pH7WG	20
Slika 8: Plazmidna karta vektorja pK7WG	21
Slika 9: Shematski prikaz priprave plazmidov z našim konstruktom	24
Slika 10: Nukleotidna zaporedja promotorja PR1b za načrtovanje začetnega oligonukleotida A	25
Slika 11: Nukleotidna zaporedja promotorja PR1b za načrtovanje začetnega oligonukleotida B	25
Slika 12: Nukleotidna zaporedja promotorja TGA2 za načrtovanje začetnega oligonukleotida A	26
Slika 13: Izbira začetnega oligonukleotida PR1b_F1040_seq	26
Slika 14: Izbira začetnega oligonukleotida PR1b_R740_seq.....	27
Slika 15: Shema pomnoževanja z začetnima oligonukleotidoma M13.....	34
Slika 16: Shematski prikaz poteka dela.....	45
Slika 17: Poravnava nukleotidnih zaporedij promotorjev PR1b iz genotipov PW363, Rywal in Désirée.....	50
Slika 18: Analiza produktov PCR po pomnoževanju posameznih promotorjev in fluorescenčnih proteinov	57
Slika 19: Analiza produktov PCR po pomnoževanju konstrukta promotorja TGA2 v fuziji s fluorescenčnim proteinom	58

Slika 20: Analiza produktov PCR po fuziji promotorja PR1b iz različnih kultivarjev krompirja s fluorescenčnim proteinom.....	58
Slika 21: Analiza produktov PCR iz bakterijske kolonije <i>E. coli</i> za določanje prisotnosti konstrukta v plazmidu pENTR.....	59
Slika 22: Analiza produktov PCR iz bakterijske kolonije <i>E. coli</i> za določanje prisotnosti konstrukta PR1b v plazmidu pH7WG.....	60
Slika 23: Analiza produktov PCR iz bakterijske kolonije <i>E. coli</i> za določanje prisotnosti konstrukta TGA2 v plazmidu pK7WG.....	61
Slika 24: Analiza produktov PCR iz bakterijske kolonije <i>A. tumefaciens</i> za določanje prisotnosti konstrukta PR1b v plazmidu pH7WG.....	62
Slika 25: Analiza produktov PCR iz bakterijske kolonije bakterije <i>A. tumefaciens</i> za določanje prisotnosti konstrukta TGA2 v plazmidu pK7WG.....	63
Slika 26: Izražanje proteina YFP pod promotorjem gena TGA2(Rywal.1) po tretiranju z 0,3 mM INA	65
Slika 27: Izražanje proteina YFP pod promotorjem gena PR1b(Desiree.1) po tretiranju z 0,3 mM INA	66
Slika 28: Izražanje proteina YFP pod promotorjem gena PR1b(Desiree.1) po tretiranju z 1 mM INA	67
Slika 29: Izražanje proteina YFP pod promotorjem gena PR1b(Desiree.1) po tretiranju z etilenom.....	69
Slika 30: Izražanje proteina YFP pod promotorjem gena PR1b(Desiree.1) po tretiranju z MeJA	70
Slika 31: Izsečki na koncu poskusa stabilne transformacije krompirja sorte Rywal s konstruktom PR1b(Desiree.1)::YFP	72
Slika 32: Izsečki na koncu poskusa stabilne transformacije krompirja sorte Rywal s konstruktom PR1b(Desiree.1)::YFP	73
Slika 33: Izsečki na koncu poskusa stabilne transformacije krompirja sorte Rywal s konstruktom TGA2(Rywal.1)::YFP	74
Slika 34: Izsečki na koncu poskusa stabilne transformacije krompirja sorte Désirée s konstruktom TGA2(Rywal.1)::YFP.....	75
Slika 35: Izsečki na koncu poskusa stabilne transformacije krompirja sorte Désirée s konstruktom TGA2(Rywal.1)::CFP	76

Slika 36: Izsečki na koncu poskusa stabilne transformacije krompirja sorte Désirée s konstruktom PR1b(Desiree.1)::YFP	77
Slika 37: Primer banjice z gojiščem MS15 s porezanimi poganjki s plošč	78

KAZALO PRILOG

- Pril. A Nukleotidna zaporedja promotorja PR1b iz genotipov PW363, Rywal in Désirée na podlagi katerih smo načrtovali začetne oligonukleotide

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AGE	agarozno-gelska elektroforeza
att	mesto za rekombinacijo z rekombinacijskem kloniranjem Gateway
bp	bazni par
CACC	enoverižni konec potreben za vključitev v plazmid pENTR
CFP	modri fluorescenčni protein (cyan fluorescent protein)
ET	etilen
INA	2,6-dikloroizonikotinska kislina (2,6-dichloroisonicotinic acid)
JA	jasmonska kislina (jasmonic acid)
kDA	kilodalton
M13	začetni oligonukleotid, ki se nalega na plazmid pENTR
mCherry	češnjev fluorescenčni protein
MeJA	metil jasmonska kislina
NIB	Nacionalni inštitut za biologijo
OD	optična gostota (optical density)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (polymerase chain reaction)
PR	povezano s patogeni (pathogenesis-related)
PVY	virus krompirja Y (Potato virus Y)
RFP	rdeči fluorescenčni protein (red fluorescent protein)
SA	salicina kislina, 2-hidroksibenzojska kislina
SAR	pridobljena sistemska odpornost (systemic acquired resistance)
TAE	tris, acetat, EDTA
T _m	temperatura prileganja začetnih oligonukleotidov
vnm	vrtljaji na minuto
YFP	rumeni fluorescenčni protein (yellow fluorescent protein)

1 UVOD

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Krompir ima v človeški prehrani pomembno vlogo. Zaradi visoke hranilne vrednosti in nezahtevnega gojenja, je za pšenico, rižem in koruzo četrta najpogostejša poljščina na svetu (Scholthof in sod., 2011). Njegova pridelava iz leta v leto narašča, zato ni čudno, da je Organizacija Združenih narodov za prehrano in kmetijstvo leto 2008 označila kot mednarodno leto krompirja (FAO, 2008). Pridetek krompirja ogrožajo škodljivci. Po vsem svetu povzročajo veliko ekonomsko škodo virus krompirja Y (angl. Potato virus Y, PVY). Ko virus napade rastlino, se v njej aktivira obrambni odgovor. Eden takih je pridobljena sistemska odpornost (SAR), ki se širi iz mesta okužbe po celi rastlini. Sinteza salicilne kisline in njeno kopičenje povzroči pretvorbo oligomernega proteina NPR1 v aktiven monomer. Ta potuje v jedro rastlinske celice, kjer tvori kompleks s transkripcijskimi faktorji TGA. Kompleks se veže na promotorje genov, ki jih povezujejo z rastlinskim odgovorom na patogene (angl. pathogenesis-related, PR). Ekspresija teh genov aktivira obrambne mehanizme in s tem omogoči odpornost na patogene in bolezni, ki jih povzročajo.

1.2 CILJ RAZISKOVANJA

Namen magistrskega dela je preučevanje izražanja genov krompirja, ki so vpleteni v obrambni odgovor rastline. Izbrana gena sta TGA2 in PR1b oziroma njuna promotorja. Naša naloga je pripraviti transgene rastline, v katerih bo nukleotidnemu zaporedju izbranega promotorja sledilo nukleotidno zaporedje fluorescenčnega proteina. Pripravljen konstrukt bomo s pomočjo agrobakterije preko rastlinske transformacije vnesli v genom rastline. Po aktivaciji rastlinske obrambe bomo pod konfokalnim mikroskopom opazovali indukcijo promotorjev TGA2 in PR1b.

1.3 HIPOTEZA

Glede na delovanje TGA in PR1 v drugih rastlinskih vrstah predpostavljamo, da se izbrana promotorja inducirata v bližini mesta okužbe z virusom. Ker pa imajo rastlinski hormoni pomembno vlogo v aktiviranju rastlinske obrambe, predpostavljamo, da lahko tretiranje s hormonom povzroči indukcijo izbranih promotorjev tudi v neokuženi rastlini.

2 PREGLED OBJAV

2.1 KROMPIR

Krompir (*Solanum tuberosum*) spada v družino razhudnikov (angl. *Solanaceae*), kamor uvrščamo tudi paradižnik, papriko, tobak in številne druge (Kerlan & Moury, 2008). Rastlina izvira iz Južne Amerike, natančneje iz Andov, kjer ima vrsta *S. tuberosum* dve podvrsti. *S. tuberosum tuberosum* je v Evropo prišla s Špansko inkvizicijo v prvi polovici 16. stoletja. Do začetka 17. stoletja je bil krompir že svetovno razširjen (FAO, 2008). Danes je za pšenico, rižem in koruzo četrta najpogostejša poljščina na svetu (Scholthof in sod., 2011), zato je Organizacija Združenih narodov za prehrano in kmetijstvo leto 2008 označila kot mednarodno leto krompirja (FAO, 2008).

Krompir je trajnica, ki v rastni sezoni razvije zelen nadzemni del rastline, ki lahko zraste tudi do metra visoko. Ves škrob, ki ga pridela s fotosintezo, se shranjuje v podzemne gomolje. Ti so raznolikih oblik in velikosti, a v povprečju tehtajo okoli 300 g. Ob koncu rastne sezone zelen vegetativni del rastline propade, prezimi pa s škrobom bogat podzemni gomolj. Gomolj spomladi rastlini omogoča novo rast in vegetativno razmnoževanje. Vsak gomolj ima namreč nekaj spiralno razporejenih očesc, iz katerih požene nova rastlina, ko so v okolju ugodni pogoji (FAO, 2008).

Gojenje krompirja je dokaj nezahtevno. Pri tem je najbolj ključna temperatura, saj za nastanek gomoljev krompir potrebuje med 10 in 30 °C. Zato v zmernih podnebjih krompir sadimo spomladi, v tropskem podnebjem pa v najbolj hladnem delu leta in pridelek poberemo po 90-150 dneh. Pridelek vsakoletno ogrožajo številni škodljivci, kot so žuželke, glive, bakterije in virusi. Med ekonomsko najbolj pomembne spadajo krompirjeva plesen (*Phytophthora infestans*), koloradski hrošč (*Leptinotarsa decemlineata*) (FAO, 2008), ter virus krompirja Y (Potato virus Y – PVY), ki vsako leto po celem svetu povzroči ogromno ekonomsko škodo (Scholthof in sod., 2011).

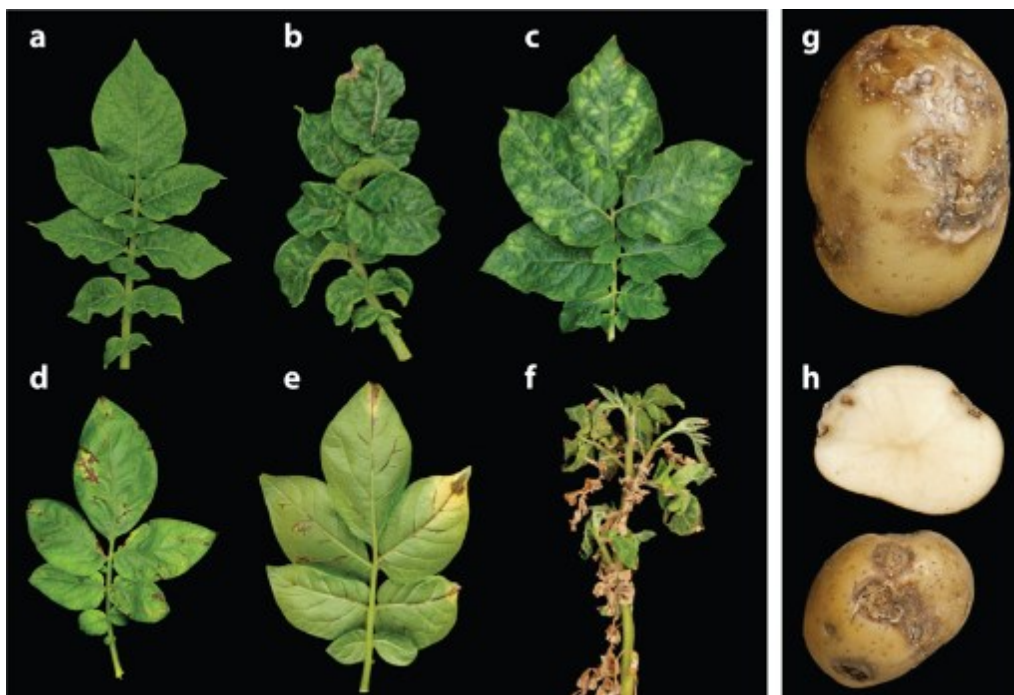
2.2 VIRUS PVY

2.2.1 Lastnosti virusa PVY

Virus PVY spada v družino *Potryviridae*, natančneje v rod *Potyvirus*. Zanj so značilni pozitivni enoveržni RNA virusi, s približno 10 kbp dolgim genomom (Berger in sod., 2005) in specifično zgradbo. Na 3' koncu ima poliA rep, na 5' koncu pa kovalentno vezan protein. Obe strukturi sta vključeni v regulacijo izražanja genov ter v zaščito in podvajanje genoma. V gostiteljski celici najprej nastane dolg poliprotein, ki ga proteaze razrežejo na deset zrelih proteinov in neodvidno iz alternativnega bralnega okvirja se krajši protein P3N-PIPO (Chung in sod., 2008). C-terminalni konec poli proteina nosi zapis za proteinsko ovojnico, ki obda virusno RNA v obliki podolgovatega heliksa, ki v dolžino meri 470 nm in ima premer 11 nm (Scholthof in sod., 2011). Virus je patogen rastlinskih vrst iz družine *Solanaceae*, kamor poleg krompirja spadajo tudi tobak, paradižnik in paprika (Kerlan & Moury, 2008).

2.2.2 Virusna okužba krompirja

Znake okuženega krompirja z virusom PVY opazimo na gomoljih, kot tudi na zelenem vegetativnem delu rastline. Simptomi so različni in so odvisni od sorte krompirja, pogojev v okolju, seva virusa in načina okužbe. Slednja je lahko primarna ali sekundarna. Do primarne okužbe pride v rastni sezoni, ko virus okuži vegetativni del rastline (Karasev & Gray, 2013). Na listih lahko opazimo mozaičnost, kar vodi v zmanjšan donos rastline. Pojavljajo se tudi raznolike nekroze, kot so lokalizirane nekroze na mestu okužbe listov ali nekroze žilnega sistema, kar povzroči rumenenje rastline ter povešanje srednjih listov. Nekateri vrste virusa PVY okužijo gomolje. Pri tem gre za tako imenovano sekundarno okužbo, kjer na površini gomolja nastane značilen obroč poškodovanega tkiva, ki se sčasoma spremeni v nekrotičnega (Beczner in sod., 1984; Karasev & Gray, 2013). Okužen krompir ima v primerjavi z zdravim 40-70 % manjši donos (Nolte in sod., 2004) in je v primeru bolezenskih znakov virusa na gomolju tržno neuporaben (Karasev & Gray, 2013).



Slika 1: Krompir, okužen s PVY (Povzeto po Karasev and Gray, 2013)

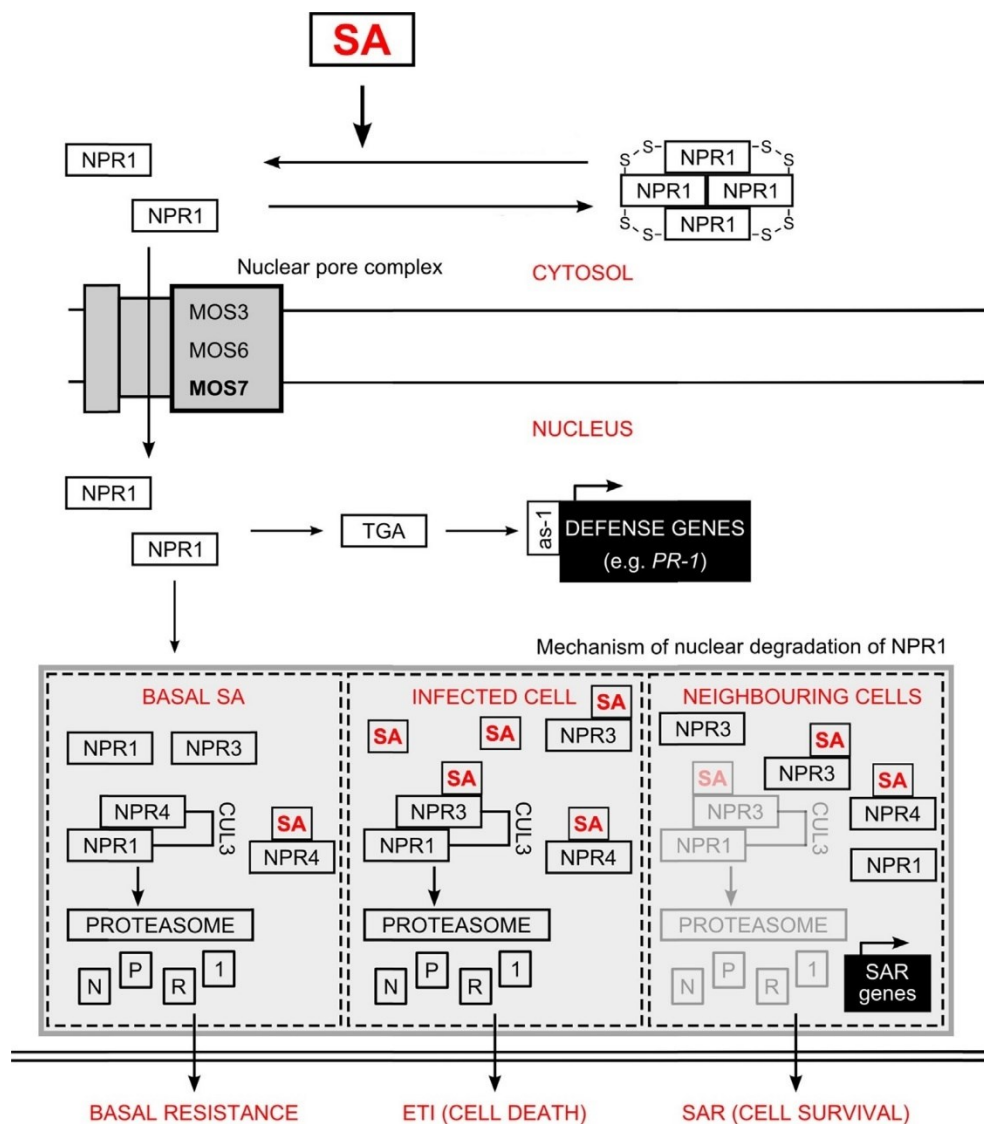
Okužba s PVY povzroči nastanek različnih simptomov. Na listih označenih z a, b in c opazimo različne oblike mozaične okužbe z virusom: rahlo gubanje listov (a), močno gubanje listov (b) ali točkaste kloroze (c). Okužba se lahko razširi po celotni rastlino, kar prepoznamo po sistemskih nekrotičnih lezijah in propadu ven (d, e) oziroma po odmrlih spodnjih listih rastline. Virus PVY povzroči škodo tudi na gomoljih. Na sliki g je prikazana prva stopnja okužbe, pri kateri se na površini gomolja oblikuje obroč nekrotičnega tkiva, ki se sčasoma pomakne tudi v notranjost gomolja (h).

2.3 OBRAMBNI MEHANIZMI RASTLIN

Rastline se vsakodnevno soočajo z biološkim ali okoljskim stresom, zato so tekom evolucije razvile številne načine lokalne in sistemske obrambe (Hammond-Kosack & Jones, 1996). Rastline so lahko dovzetne za patogene ali pa odporne nanje. V obeh primerih pride do aktivacije različnih ali enakih obrambnih genov, ki se razlikujejo v hitrosti izražanja po okužbi (Hammerschmidt, 2009). Vsaka rastlina ima v svojem genomu zapis za obrambne gene, ki ob okužbi s patogenom omogočajo osnovno odpornost na bolezen (Dangl & Jones, 2001).

Ob lokalni okužbi rastline s patogenom se v neokuženih delih rastline aktivirajo obrambni mehanizmi (Ryals in sod., 1996). Pri tem je pogosto nastane nekroza, ki je lahko simptom bolezni, ki jo povzroči patogen, ali posledica hipersenzitivnega odziva (Kuc, 1982). Hipersenzitivni odziv nastane, ko rastlina patogen ob okužbi prepozna in celice na mestu infekcije vodi v hitro celično smrt (Hammond-Kosack & Jones, 1996).

Pri obrambnem odgovoru rastline je pomembna salicilna kislina (SA). Ta deluje kot signalna molekula za ekspresijo genov, ki rastlini omogočijo obrambo in odpornost proti patogenom (War in sod., 2011). V signalna pot obrambnega odgovora rastline z SA se prepleta s signalnimi potmi drugih rastlinskih hormonov kot so jasmonska kislina (JA), etilen, abscizinska kislina, kar omogoča rastlini ojačanje obrambnega odgovora (Lu, 2009).



Slika 2: Signalne poti SAR (Povzeto po Janda in Ruelland, 2014)

Model signalizacije SA. Povečanja koncentracija SA povzroči monomerizacijo proteina NPR1, ki gre skozi jedrne pore (sestavljene iz proteinov MOS) v jedro celice, kjer tvori kompleks z transkripcijskimi faktorji TGA in tako sproži transkripcijo obrambnih genov PR1. Proteina NPR3 in NPR4 regulirata razgradnjo proteina NPR1. V neokuženi celici je koncentracija SA zelo nizka, zato se nanjo veže protein NPR4. Kompleks SA-NPR4 se veže na protein NPR1 in protein NPR1 označi za razgradnjo na proteosomu. V okuženi celici se zaradi povečanje koncentracije SA nastane kompleks SA-NPR3, ki se veže na protein NPR1 in tega označi za razgradnjo. V sosednjih celicah je zaradi manjše koncentracije SA vezava kompleksa SA-NPR3 z proteinom NPR1 šibkejša in prosti protein NPR1 povzroči aktivacijo SAR.

2.3.1 Salicilna kislina

Salicilna kislina (SA), kemijsko 2-hidroksibenzojska kislina, je pomemben rastlinski hormon, ki rastlini omogoča razvoj, rast in preživetje (Vlot in sod., 2009). V celici sodeluje v številnih celičnih procesih, kot so razvoj in kaljenje semen, senescenca, delovanje listnih rež, celična rast, dihanje in omogoča temperaturno uravnavanje (Boatwright & Pajerowska-Mukhtar, 2013; Vlot in sod., 2009). Hkrati ima tudi pomembno obrambno funkcijo pri abiotskem stresu. Rastlino brani pred temperaturnimi ekstremi, sušo, osmotskim stresom in težkim kovinami (Horvath in sod., 2007). Prav tako pa omogoča obrambo rastline pred patogeni (Van Loon, 1999).

SA se sintetizira v kloroplastu (Garcion in sod., 2008) po dveh deloma poznanih poteh. Prva, prevladujoča, je korizmatna pot, kjer encim izokorizmat sintaza (angl. isochorismate synthase, ICS) katalizira pretvorbo korizmata v izokorizmat. Pretvorbo iz izokorizmata v SA katalizira piruvat liaza 1 (angl. isochorismate pyruvate lyase, IPL1) (Mauch in sod., 2001). Pri rastlini *Arabidopsis thaliana* sta poznana dva encima ICS: ICS1 in ICS2. Pri okužbi z patogenom po tej poti lahko nastane tudi do 90 % SA, kjer ima glavno vlogo ICS1 pot (Wildermuth in sod., 2001). K povečani koncentraciji SA pa prispeva tudi druga sintezna pot, kjer fenilalanin amonijeva liaza (angl. phenylalanine ammonia lyase, PAL) katalizira nastanek cimetove kisline, ki se kasneje z neznanim mehanizmom pretvori v SA (Vlot in sod., 2009).

Transkripcijski faktor EDS5 omogoča transport SA iz kloroplasta v citosol (Serrano in sod., 2013), kjer se SA pretvori v številne konjugate z metilacijo, aminokislinsko konjugacijo, glukozilacijo, sulfonacijo ali hidroksilacijo. Večji delež teh konjugant predstavlja neaktivno obliko in se shranjuje v vakuoli (Janda in Ruelland, 2014).

Večina SA se sintetizira in kopiči na mestih okužbe in se od tam transportira po rastlini (Shulaev in sod., 1995), nekaj pa se je sintetizira tudi v neokuženih delih rastline (Meuwly in sod., 1995). Nakopičena SA v citoplazmi spremeni redoks stanje celice (Mou in sod., 2003).

2.3.2 Protein NPR1

Protein NPR1/NIM1 (angl. *non-expresser of pr genes 1, noninducible immunity 1*) oziroma njegove homologe so našli v številnih rastlinskih vrstah, kar kaže na to, da gre za evolucijsko ohranjen protein (Chern in sod., 2001). V rastlini je vključen v obe obliki inducirane odpornosti, ISR in SAR (Pieterse in sod., 1996). Ker povezuje različne signalne poti, kot so salicilna, etilenska in jasmonska, omogoča rastlini še boljšo obrambo (Spoel in sod., 2003).

Hkrati je vpleten tudi v fiziološke vloge, kot je regulacija celičnih delitev (Vanacker in sod., 2001).

Izražanje gena NPR1 je pod kontrolo transkripcijskega faktorja WRKY, ki se veže na W-box elementa promotorja NPR1 (Yu in sod., 2001). Protein je v celici stalno izražen v zelo majhni koncentraciji. Ob tretiranju s SA ali okužbi s patogenom pa njegova koncentracija naraste do trikrat (Cao in sod., 1997).

NPR1 je majhen protein z molekularno maso 65-kDa (Ryals in sod., 1997), ki je sestavljen iz dveh domen. Prva domena ponavljajočih se ankirinov leži v sredini proteina, druga pa je BTB/POZ (angl. *Broad-Complex, Tramtrack, Bric-a-brac/Poxvirus, Zinc finger*) domena. Domeni omogočata protein – protein interakcijo. Protein ima tudi mesta za fosforilacijo in jedrni lokalizacijski signal (Cao in sod., 1997; Ryals in sod., 1997), nima pa DNA – vezavne domene, zato pri regulaciji transkripcije deluje kot kofaktor (Després in sod., 2003).

Protein NPR1 se nahaja v citosolu celice. Cistena Cys82 in Cys216 omogočata oligomerno obliko NPR1. Ob prisotnosti SA se v celici spremeni redoks stanje, zato pride do redukcije disulfidnih mostičkov in protein NPR1 preide iz oligomerne v monomerno obliko. Monomerni protein NPR1 je aktivna oblika proteina NPR1, ki potuje v celično jedro (Mou in sod., 2003). Pri tem sodelujejo nukleoproteini MOS (angl. *modifiers of SNC1*) (Vlot in sod., 2009). V jedru se monomerni protein NPR1 kopiči (Kinkema in sod., 2000) in veže na transkripcijski faktor TGA (Després in sod., 2000).

Nedavne raziskave kažejo, da lahko protein NPR1 celo veže SA. Pri tem verjetno pride do konformacijske spremembe proteina NPR1, kar aktivira njegovo transkripcijsko aktivnost. Hkrati je lahko vezava SA nujno potrebna za razpad oligomernega proteina NPR1 v monomerno obliko v reducirajočih pogojih. Protein NPR1 je torej receptor SA, kot tudi efektor izražanja genov PR (Wu in sod., 2012). SA se veže tudi z dvema paralogoma proteina NPR1: protein NPR3 in protein NPR4. Ker se na SA vežeta z različno afiniteto, delujeta na mestu okužbe in na oddaljenih delih okužene rastline. Protein NPR3 se na SA veže z manjšo afiniteto kot protein NPR4. Ob okužbi je na mestu okužbe povečana koncentracija SA, zato se nanjo veže poleg proteina NPR4 tudi protein NPR3. Kompleks se poveže z proteinom NPR1 in ga označi za razgradnjo. Posledično se protein NPR1 ne more vezati na transkripcijski faktor TGA in ni izražanja proteinov PR1, pride pa do lokalizirane celične smrti. V preostalih delih rastline, kjer je koncentracija SA nižja kot na mestu okužbe, interakcija med kompleksom SA-NPR3 in proteinom NPR1 ni tako močna, zato se nekaj proteina NPR1 veže na transkripcijski faktor TGA in pride do izražanja proteinov PR1 ter nastanka SAR. Protein NPR4 se na SA veže v veliko večjo afiniteto kot protein NPR3. Na SA se veže v neokuženi rastlini, ko je koncentracija SA zelo nizka. Kompleks SA-NPR4 se prav tako veže z proteinom NPR1, ki ga označi za razgradnjo. Nekaj proteina NPR1 vseeno

ostane nevezanega, zato pride do transkripcije genov PR1, kar povzroči osnovno odpornost rastline (Fu in sod., 2012).

2.3.3 Transkripcijski faktorji TGA

Transkripcijske faktorje TGA uvrščamo v skupino transkripcijskih faktorjev z osnovno obliko levcinske zadrge (bZip) (Zhang in sod., 1999). Transkripcijski faktor TGA se veže na regulatorne elemente as-1 (aktivatorska sekvenca-1) promotorja genov PR ali temu podobne elemente. V rastlini *A. thaliana* se transkripcijski faktor TGA lahko veže na pozitivne ali negativne cis-regulatorne elemente promotorja PR1. LS7 je pozitiven regulatorni element. Če se nanj veže transkripcijski faktor TGA, ta deluje kot aktivator transkripcije promotorja. Če pa se transkripcijski faktor TGA veže na negativni regulatorni element LS5, je transkripcija inhibirana (Lebel in sod., 1998).

Do danes so v genomu rastline *A. thaliana* identificirali deset transkripcijskih faktorjev TGA (Jakoby in sod., 2002). Zaenkrat je preučenih le sedem transkripcijskih faktorjev TGA, ki jih glede na njihove interakcije z proteini NPR1 delimo v tri podskupine: proteina TGA1 in TGA4 predstavljata podskupino I, proteini TGA2, TGA5 in TGA6 podskupino II, proteina TGA3 in TGA7 pa predstavljata podskupino III (Xiang in sod., 1997). Molekularne študije predvidevajo raznolike vloge posameznih transkripcijskih faktorjev TGA v regulaciji izražanja genov PR, vendar pa je zaradi pomanjkanja mutant s posameznimi izbitimi geni TGA težko določiti njihove funkcije (Kesarwani in sod., 2007). Nekateri transkripcijski faktorji TGA se v celici stalno izražajo in vežejo na regulatorne elemente, vendar je njihova vezava zelo šibka (Després in sod., 2000).

Podskupina 1, ki ji pripadata transkripcijska faktorja TGA1 in TGA4, regulira osnovno odpornost rastline (Kesarwani in sod., 2007). Transkripcijska faktorja se vežeta z proteinom NPR1 le ob prisotnosti SA. V primerjavi z ostalimi TGA transkripcijskimi faktorji imata namreč drugačno molekularno strukturo. Proteina imata dva cisteinska ostanka, ki se šele ob prisotnosti SA reducirata, kar omogoči njuno vezavo na protein NPR1 (Després in sod., 2003).

Transkripcijski faktor TGA3 je aktivator osnovnega in inducirane izražanja genov PR. Izmed vseh transkripcijskih faktorjev TGA tvori najmočnejše interakcije z proteinom NPR1 (Zhou et al., 2000). Mutante z izbitim genom za transkripcijski faktor TGA7 ne kažejo specifičnega fenotipa, vseeno pa sklepajo, da ima transkripcijski faktor TGA7 podobno vlogo kot transkripcijski faktor TGA3, saj pripada isti podskupini (Kesarwani in sod., 2007).

Druga podskupina TGA transkripcijskih faktorjev je najštevilčnejša in po delovanju najbolj raznolika. Prisotnost posameznega transkripcijskega faktorja iz skupine II je dovolj, da z INA induciramo izražanje genov PR. Vsi so torej pozitivni regulatorji SAR. Ob odsotnosti transkripcijskih faktorjev TGA5 in TGA6, transkripcijski faktor TGA2 postane glavni transkripcijski aktivator (Zhang in sod., 2003). Podobno lahko ob nedelujočem transkripcijskem faktorju TGA2, transkripcijski faktor TGA6 nadomesti njegovo funkcijo, vendar je to pogojeno z aktivnostjo transkripcijskega faktorja TGA3 (Kesarwani in sod., 2007).

2.3.3.1 Transkripcijski faktor TGA2

Protein TGA2 je transkripcijski faktor, ki lahko deluje kot aktivator, kot je opisano zgoraj. Lahko pa deluje tudi kot represor transkripcije. Transkripcijski faktor TGA2 se v celici stalno izraža in veže na promotor genov PR, s čimer zavira izražanje genov PR pred indukcijo. Ni znano, ali se pri tem veže na pozitivno LS7 ali negativno LS5 vezavno mesto promotorja. Pri vezavi transkripcijskega faktorja na promotor naj bi bil udeležen protein SNI1. SNI1 je jedrni protein, ki je po strukturi podoben regulatornim proteinom. Kadar je v celici odsoten, na mestu promotorja pride do kromatinskih modifikacij (Mosher in sod., 2006). Fizičnih interakcij med transkripcijskim faktorju TGA2 in proteinom SNI1 sicer niso dokazali, ugotovili pa so, da na stopnji kromatinske modifikacije pride do medsebojnih genskih interakcij. Vzrok za njegovo dvojno naravo bi lahko bila zmožnost vezave na različna nukleotidna zaporedja promotorja PR1, povezovanje z drugimi transkripcijskimi faktorji, posttranslacijske modifikacije ali fosforilacija (Kesarwani in sod., 2007).

V neinduciranem stanju se lahko na pozitivne elemente sočasno vežejo tudi transkripcijski faktorji TGA1, TGA3 in TGA6, kar pa ob prisotnosti proteina SNI1 in transkripcijskega faktorja TGA2 ne povzroči izražanja genov PR. Ob indukciji SAR transkripcijski faktor TGA2 in protein SNI1 preko neznanega mehanizma prenehata z zaviranjem izražanja genov PR. V jedro vstopi protein NPR1, ki rekrutira aktivatorske transkripcijske faktorje TGA1, TGA2, TGA3, TGA5 in TGA6, kar povzroči transkripcijo genov PR (Kesarwani in sod., 2007).

2.3.4 Proteini PR

Prve proteine, ki jih povezujejo z obrambo pred patogenom (angl. pathogenesis-related, PR), so našli leta 1970 v tobaku (van Loon and van Kammen, 1970). Od odkritja pa do danes so jih našli še v mnogih enokaličnicah ali dvokaličnicah. Sklepajo, da gre za vrstno specifične evolucijsko ohranjene proteine, in jih uporabljajo kot genski marker za preučevanje evolucije, taksonomije in filogenije (Ahl in sod., 1982). Na podlagi podobne biološke

oziroma encimske aktivnosti in aminokislinskega zaporedja (van Loon & van Strien, 1999) jih trenutno delimo v 17 družin (van Loon in sod., 2006).

Preglednica 1: Seznam družin proteinov PR, primer in biološke aktivnosti posameznih družin (Povzeto po van Loon in sod., 2006)

Družina	Primer	Biološka/encimska aktivnost proteina
PR1	PR1a iz tobaka	neznana
PR2	PR2 iz tobaka	β -1,3-glukanaza
PR3	P, Q iz tobaka	Hitinaza tip I,II, IV,V,VI,VII
PR4	'R' iz tobaka	Hitinaza tip I,II
PR5	S iz tobaka	traumatinu podoben protein
PR6	Inhibitor I iz paradižnika	inhibitor proteinaze
PR7	P69 iz paradižnika	endoproteinaza
PR8	hitinaza iz kumare	hitinaza tip III
	Peroksidaza, ki katalizira nastanek	
PR9	Lignina iz tobaka	peroksidaza
PR10	'PR1' iz peteršilja	ribonukleazi podoben protein
PR11	Hitinaze 'razreda V' iz tobaka	hitinaza tip I
PR12	Rs-AFP3 iz redkvice	defenzin
PR13	THI2.1 iz repnjakovca	tionin
PR14	LTP4 iz ječmena	lipidni transporter
PR15	OxOa iz ječmena	oksalat oksidaza
PR16	OxOLP iz ječmena	oksalat oksidazi podoben protein
PR17	PRp27 iz tobaka	neznana

Najbolj znani induktorji proteinov PR so patogeni in rastlinojede žuželke (van Loon, 1999). Večino proteinov PR in njim podobnih proteinov lahko inducirajo tudi z rastlinskimi hormoni, kot so etilen (ET), jasmonska kislina (JA) in SA. V rastlini proteini PR opravljajo številne funkcije. Nekateri proteini so tkivno specifični in regulirani na stopnji razvoja, kot so senescenca, razvoj semena, cveta in peloda. Prisotni so tudi v plodovih in lahko sprožijo alergijsko reakcijo pri ljudeh. Spet drugi se inducirajo pri poškodbah in nizkih temperaturah. Števili pa imajo obrambno funkcijo, saj poškodujejo celično steno mikrobov ali delujejo toksično na njihov metabolizem. Raznoliki proteini PR rastlini omogočajo rast, razvoj ter obrambo in so torej ključni za preživetje rastline (van Loon in sod., 2006).

Signal za transkripcijo genov PR se širi z mesta okužbe v neokužene dele rastline preko žilnega sistema, medtem ko sintetizirani proteini PR niso mobilni (Gianinazzi in sod., 1982).

Njihovo izražanje je uravnava na ravni transkripcije (Zhou, 1999). Ne glede na raznolike funkcije pa imajo dokaj specifične biokemijske lastnosti. Imajo nizko molekularno maso (6-43 kDa), so neobčutljivi za proteaze in so temperaturno obstojni. Najbolj stabilni so pri nizkem pH ($\text{pH} < 3$) (van Loon, 1999), protein PR pa ima v odvisnosti od njegove izoelektrične točke lahko kisel ali bazičen značaj (Buchel in Linthorst, 1999). V celici se nahajajo v apoplastu, ki je glavno mesto njihove akumulacije, ali v vakuoli (van Loon, 1999).

Prisotni so v vseh delih rastline, od korenin do cvetov oziroma semen (van Loon, 1999). Največji delež zastopajo v listih, kjer lahko predstavljajo 5-10 % vseh proteinov. Nahajajo se v listnem mezofilu, epidermalnem tkivu, žilah in območju abscizije (Eyal in sod., 1993).

Sorodna nukleotidna zaporedja proteinov PR najdemo tudi v ostalih živalskih kraljestvih. Za razliko od rastlin se v drugih organizmih stalno izražajo (van Loon & van Strien, 1999).

2.3.4.1 Proteini PR1

Primerjave proteinov kažejo med 30 % in 50 % identičnost s podobnimi sekvencami v glivah, vretenčarjih in žuželkah. Ti proteini so v osah in mravljah strupi, ki jih živali uporabljajo za obrambo (van Loon & van Strien, 1999). Razširjenost proteinov PR1 kaže na skupen evolucijski izvor in opravljanje pomembne funkcije v preživetju organizma (van Loon, 2001).

Z magnetno resonanco so uspeli določiti strukturo proteina PR1 iz paradižnika. Vsi proteini PR1 so strukturno podobni in sestavljeni iz štirih α -vijačnic in štirih β -ploskev. Sredinsko ležeče štiri antiparalelno razporejene β -ploskve obdajata dve α -vijačnici. Oblika α - β - α sendviča je stabilizirana s hidrofobnimi interakcijami in številnimi vodikovimi vezmi (Fernández in sod., 1997). Za razliko od ostalih družin, pri katerih lokacija ni točno določena, se kisli proteini PR1 nahajajo v apoplastu, bazični pa v vakuoli (Bol in sod., 1990).

Znotraj rastline se lahko protein nahaja v različicah. V tobaku najdemo vsaj 17 proteinov PR1 (van Loon in sod., 2006), ki jih označujemo s črko (npr. PR1a) (van Loon in sod., 1994). Iz gena PR1 nastane peptid, ki je signalna molekula za indukcijo obrambe v oddaljenih delih rastline (Chen in sod., 2014). Pomembno vlogo imajo tudi pri obrambi rastline pred oomicetami (Broekaert in sod., 2000). Kljub temu pa se protein sintetizira tudi pri okužbi z drugimi patogeni, zato ne morejo potrditi njegove specifične vloge v obrambi pred oomicetami (van Loon in sod., 2006).

2.3.4.1.1 Protein PR1b

Pri okužbi krompirja s patogenom med izoliranimi proteini PR1 prevladuje protein PR1b. Protein in njegova mRNA se kopičita na mestu okužbe. Povečane koncentracije so tudi v neokuženih listih krompirja. Protein PR1b so našli v zapiralkah listnih rež, epidermalnih celicah, kristalnih ideoblastih, žleznih laskih in žilnem sistemu (Hoegen in sod., 2002).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

3.1.1 Gojišča

Preglednica 2: Sestava gojišč

Gojišče	Sestavine	Koncentracija	pH
LB	Tripton (Bacto)	10 g/l	7,5
	Kvasni ekstrakt (Bacto)	5 g/l	
	NaCl (Merck)	5 g/l	
	*Agar (Bacto)	8 g/l	
YM	Kvasni ekstrakt (Bacto)	0,4 g/l	7,0
	Manitol (Kemika)	10 g/l	
	MgSO ₄ x 7H ₂ O (Merck)	0,2 g/l	
	K ₂ HPO ₄ x 3H ₂ O (Kemika)	0,5 g/l	
	NaCl (Merck)	0,1 g/l	
	*Agar (Bacto)	15 g/l	
MS30	Murashige in Skoog medij (MS) z vitamini (Duchefa)	5 g/L	5,8
	Saharoza (Kemika)	30 g/l	
	Agar (Bacto)	8 g/l	
R3B	MS z vitamini (Duchefa)	5 g/L	5,8
	Saharoza (Kemika)	30 g/l	
	Agar (Bacto)	8 g/l	
	1-naftalenocetna kislina (NAA) (Sigma)	2 ml/L	
	6-benzilampinopurin (BAP) (Sigma)	1 mg/l	
PACM	MS z vitamini (Duchefa)	5 g/L	6,5
	Saharoza (Kemika)	30 g/l	
	Kazein hidrolizat (Sigma)	2 g/l	
	2,4-dikloroocetna kislina (2,4-D) (Fluka)	1 mg/l	
	Kinetin (Sigma)	0,5 mg/l	
Zcv	MS z vitamini (Duchefa)	5 g/L	5,8
	Saharoza (Kemika)	20 g/l	
	Agar (Bacto)	8 g/l	
	Cefotaksim (Krka)	200 mg/l	
	Zeatin ribozid (Duchefa)	1 ml/l	
	Vankomicin (Lek)	200 mg/l	
	Antibiotik		

Se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 2: Sestava gojišč

Gojišče	Sestavine	Koncentracija	pH
MCI	MS z vitamini (Duchefa)	5 g/L	5,8
	Glukoza monohidrat (Merck)	17,6 g/l	
	NAA (Sigma)	5 ml/L	
	BAP (Sigma)	0,1 mg/l	
	Agar (Bacto)	8 g/l	
	Cefotaksim (Krka)	500 mg/l	
	Antibiotik		
GR2	MS z vitamini (Duchefa)	5 g/L	5,8
	Glukoza monohidrat (Merck)	17,6 g/l	
	Giberlinska kislina (Sigma)	0,02 mg/l	
	NAA (Sigma)	0,02 ml/L	
	Agar (Bacto)	8 g/l	
	Cefotaksim (Krka)	500 mg/l	
	Zeatin ribozid (Duchefa)	2 ml/l	
Antibiotik			
MS15	MS z vitamini (Duchefa)	5 g/L	5,8
	Saharoza (Kemika)	15 g/L	
	Giberlinska kislina (Sigma)	0,02 mg/l	
	NAA (Sigma)	0,02 ml/L	
	Agar (Bacto)	6 g/l	
	Antibiotik		
YEB	Goveji ekstrakt (Difco)	5 g/l	7,2
	Kvasni ekstrakt (Bacto)	1 g/l	
	Pepton (bacto)	5 g/l	
	Saharoza (Kemika)	5 g/L	
	MgSO ₄ x 7H ₂ O (Merck)	0,5 g/L	
S.O.C.	Trypton (Bacto)	20 g/l	7,0
	Kvasni ekstrakt (Bacto)	5 g/l	
	NaCl (Merck)	580 mg/l	
	KCl (Merck)	186 mg/l	
	MgCl ₂ (Sigma)	952 mg/l	
	Glukoza	3,603 g/l	
MMA	Saharoza (Kemika)	20 g/l	5,6
	MS (Duchefa)	5g/l	
	MES	1,95 g/l	
	Acetosiringon (Aldrich)	1 ml/l	

* Za pripravo trdega gojišča smo dodali agar.

3.1.2 Laboratorijska oprema

- Avtoklav (Kambič)
- Centrifuga (Eppendorf)
- Elektroforezna banjica (Biorad)
- Elektroporator (Eppendorf)
- GeneAmp PCR System 9700 (Applied biosystems)
- Hladilnik in skrinja -20°C (Liebherr)
- Inkubator (Kambič)
- Kivete (Eppendorf)
- Komora za delo z bakterijami, plazmidi in PCR produkti (Biosafe 2-130) (Ehret)
- Komora za pripravo PCR miksov (BIOSAN)
- Komora za delo z rastlinskimi tkivnimi kulturami (Aurah-130) (Ehret)
- Konfokala lupa (Leica)
- Mikrovalovna pečica (DeLonghi)
- Napajalnik za elektroforezo (Biorad)
- Naprava za PCR GeneAmp® PCR System 9700 (Applied biosystems)
- OD meter (Amersham Biosciences)
- pH-meter (Mettler Toledo)
- Pipete (Eppendorf)
- Rastna komora (Kambič)
- Skrinja -80°C (Sanyo)
- Spektrofotometer (NanoDrop Technologies)
- Stresalnik (Kambič)
- Tehnica (Sartorius)
- Termoblok (Kambič)
- Transiluminator Safe Imager (Invitrogen)
- UV-transiluminator (UviPRO)
- Vodna kopel (Kambič)
- Vibracijski mešalnik Vibromix 10 (Tehnica Železniki)

3.1.3 Kompleti reagentov

- Komplet za izolacijo DNA iz agaroznega gela: Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)
- Komplet za izolacijo plazmidov: GenElute[™] Plasmid Miniprep Kit (Sigma)
- Komplet za kloniranje Gateway[®]: pENTR[™] Directional TOPO[®] Cloning Kit (Invitrogen)
- Komplet za kloniranje Gateway[®]: pCR8[™]/GW/TOPO[®] TA Cloning Kit (Invitrogen)
- Komplet za reakcijo PCR: Phusion[®] High-Fidelity PCR Kit (Biolabs)
- Komplet za reakcijo PCR: KAPA2GTM Robust HotStart Colony PCR (Kapa biosystems)

3.1.4 Kemikalije

- Voda brez nukleaz (Ambion)
- 100 % glicerol (Kemika)
- 1x pufer TAE (Milipore)
- 1x modificiran pufer TAE za elektroforezo (Milipore)
- Nanašalni pufer 6x Loading Dye (Fermentas)
- Velikostna lestvica Mass Ruler[™] DNA Ladder Mix, ready-to-use (Fermentas)
- Etidijev bromid (Sigma)
- 200 mM acetosiringon (Aldrich)

3.1.5 Plazmidi

Na Nacionalnem inštitutu za biologijo (NIB) so na podlagi znanega genoma divjega krompirja *Solanum tuberosum* iz skupine Phureja načrtovali začetne oligonukleotide za pomnoževanje promotorjev PR1b in TGA2 izbranih dolžin iz genoma *Solanum tuberosum* L. genotipov PW363, Rywal in Désirée. Dobljene PCR produkte so vstavili v plazmid pJET, plazmid transformirali v *E. coli* ter sekvencirali po tri kolonije, ki so vsebovale promotorje iz vsakega genotipa krompirja. Dobljena nukleotidna zaporedja promotorjev so različice promotorjev genov PR1b in TGA2, ki so jih označili s števili 1, 2 in 3. Nukleotidna zaporedja posameznih promotorjev so v Prilogi 1.

Na NIB-u so imeli v plazmidu pCR8 konstrukt sestavljen iz promotorja TGA2 (iz genotipa PW363 in Rywal) združenega s fluorescenčnim proteinom, in sicer TGA2(PW363.1)::CFP, TGA2(PW363.1)::YFP, TGA2(Rywal.1)::CFP ter TGA2(Rywal.1)::YFP.

Prav tako so imeli v plazmide je vnešeno nukleotidno zaporedje rumenega fluorescenčnega proteina (angl. Yellow Fluorescent Protein – YFP) (Sl. 5), češnjevega fluorescenčnega proteina (angl. mCherry) (Sl. 3) in modrega fluorescenčnega proteina (angl. Cyan Fluorescent Protein – CFP) (Sl. 4).

```
ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGGATAACATGGCCATCATCAAGGAGTTCATGCGCTTCAAGGTGCACATGGAGGGCTCCGT
GAACGGCCACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGGCCGCCCTACGAGGGCACCCAGACCCGCAAGCTGAAGGTG
ACCAAGGGTGGCCCCCTGCCCTTCGCCTGGGACATCCTGTCCCCTCAGTTCATGTACGGCTCCAAGGCCCTACGTGAAGCACC
CCGCCGACATCCCCGACTACTTGAAGCTGTCTTCCCCGAGGGCTTCAAGTGGGAGCGCGTGATGAAGTTCGAGGACGGCG
GCGTGGTGACCGTGACCCAGGACTCCTCCCTGCAAGACGGCGAGTTCATCTACAAGGTGAAGCTGCGCGGCACCAACTTCC
CCTCCGACGGCCCCGTAATGCAGAAGAAGACCATGGGCTGGGAGGGCTCCTCCGAGCGGATGTACCCCGAGGACGGCGCC
CTGAAGGGCGAGATCAAGCAGAGGGCTGAAGCTGAAGGACGGCGGCCACTACGACGCTGAGGTCAAGACCACCTACAAGG
CCAAGAAGCCCGTGACGCTGCCCGGCGCCTACAACGTCAACATCAAGTTGGACATCACCTCCACAACGAGGACTACCCA
TCGTGGAACAGTACGAACGCGCCGAGGGGCCCACTCCACCGCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA
```

Slika 3: Nukleotidno zaporedje fluorescenčnega proteina mCherry (711 bp)

```
ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGGCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACA
AGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAG
CTGCCCGTGCCCTGGCCACCCCTCGTGACCACCTGACCTGGGGCGTGAGTGTCTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAG
CAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTAC
AAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGG
ACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACATACATCAGCCACAACGTCTATATCACCGCCGACAAGCAGAAGAACG
GCATCAAGGCCAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCC
CCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGA
AGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA
```

Slika 4: Nukleotidno zaporedje fluorescenčnega proteina CFP (720 bp)

```
ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGGCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACA
AGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAG
CTGCCCGTGCCCTGGCCACCCCTCGTGACCACCTTCGGCTACGGCCTGCAGTGTCTCGCCCGCTACCCCGACCACATGAAGC
AGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACA
AGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGA
CGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACATACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACG
GCATCAAGGTGAACCTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCC
CCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCTACCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGA
AGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA
```

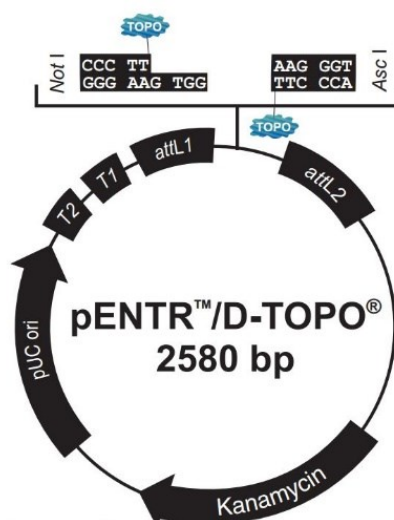
Slika 5: Nukleotidno zaporedje fluorescenčnega proteina YFP (720 bp)

3.1.6 Plazmid pENTRTM/D-TOPO[®]

Tehnologija Gateway[®] predstavlja visoko učinkovito in hitro metodo za kloniranje tarčnega gena v bakterijo *A. tumefaciens* brez uporabe postopkov po PCR reakciji, ligaze ali restrikcijskih encimov.

Sistem obsega dva koraka. Najprej je potrebno s kloniranjem vključka (PCR produkta) pripraviti vstopni klon (angl. entry clone) in ga transformirati v vstopni vektor. Vektor mora vsebovati zaporedja za rekombinacijo attL, ki so kompatibilna z Gateway[®] rekombinacijskim kloniranjem v ciljni vektor (angl. destination binary vector). V naslednji stopnji se vključek s t.i. LR-reakcijo subklonira v ciljni vektor (LR Clonase II Enzyme Mix, Invitrogen). Encim LR Clonase II katalizira rekombinacijo med vstopnim klonom, ki leži med mestoma attL1 in 2attL, ter fragmentom na ciljnem vektorjem, ki da obdajata mesti attR1 in attR2.

Plazmidni vektor pENTR (Invitrogen) smo uporabili kot vstopni vektor za Gateway[®] kompatibilno rekombinacijsko kloniranje. Na plazmidni karti (Sl. 6) je označeno poliklonsko mesto, ki ga obdajata attL1 in att2 mesti, ključni za rekombinacijo. Zahteva za koloniranje našega konstrukta v plazmid je CACC enoverižni 5' konec, dodan insertu. Plazmid je velik 2580 bp in nosi zapis za odpornost proti kanamicinu.



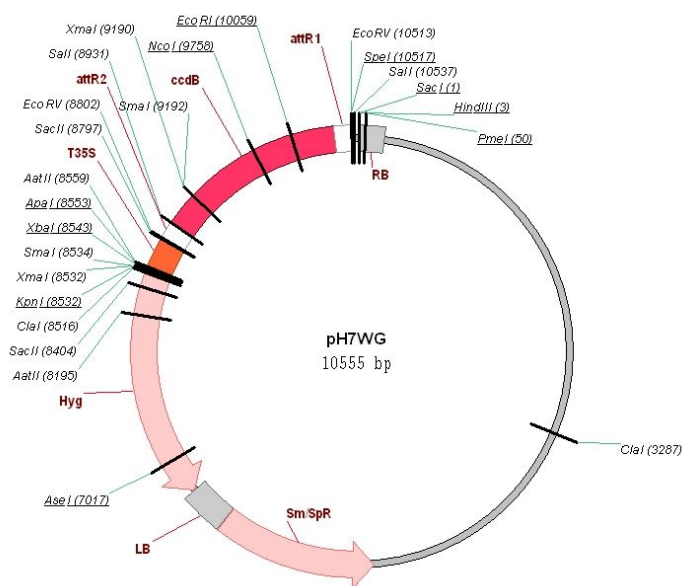
Slika 6: Plazmidna karta vektorja pENTRTM/D-TOPO[®]

3.1.7 Ciljna plazmida pH7WG in pK7WG

Ciljne binarne vektorje, ki se podvojujejo v *E. coli* in *A. tumefaciens*, uporabljamo za produkcijo željenih proteinov v rastlinah. Plazmid zunaj regije T-DNA nosi zapis za selekcijo, ki se izraža v bakterijah. Ob okužbi rastline *A. tumefaciens* v rastlino posreduje T-DNA, ki jo omejujeta zaporedji RB (angl. right border) in LB (angl. left border). V tem delu plazmida je zapis za selekcijo, regulatorni elementi in mesti za rekombinacijo (att).

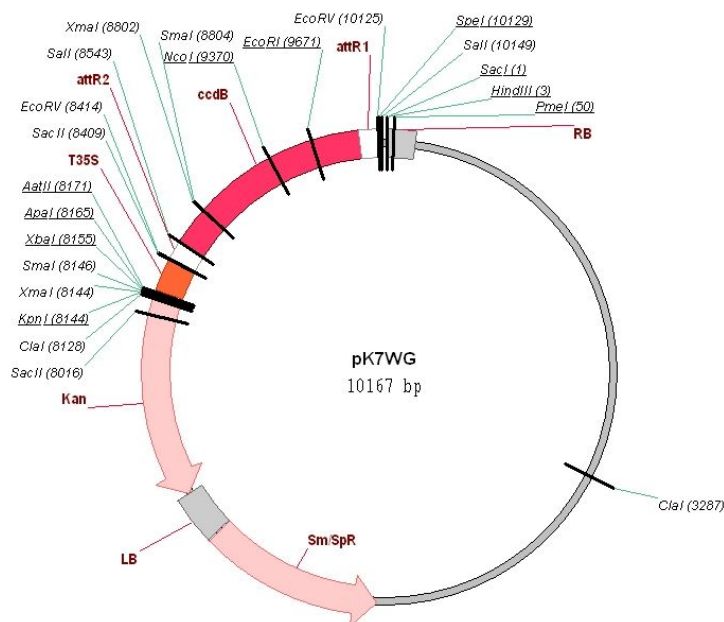
Mesti Gateway® kompatibilnega rekombinacijskega kloniranja genov v ciljnem vektorju sta attR1 in attR2. Med njima se nahaja gen *ccdB*, ki je letalen za večino sevov *E. coli*. Ob rekombinaciji se vključek vstavi na mesto *ccdB* in tako zamenja gen *ccdB*. Dodatno selekcijo zagotovimo z genom za odpornost proti antibiotiku.

Ciljni binarni vektor pH7WG (VIB) nosi zapis za odpornost proti spektinomycinu, ki se izraža v bakterijah *E. coli* in zapis za odpornost proti higromycinu, ki se izraža v *A. tumefaciens* (Sl. 7).



Slika 7: Plazmidna karta vektorja pH7WG

Ciljni binarni vektor pK7WG (VIB) nosi zapis za odpornost proti spektinomycinu, ki se izraža v bakterijah *E. coli*, in zapis za odpornost proti kanamicinu, ki se izraža v *A. tumefaciens* (Sl. 8).



Slika 8: Plazmidna karta vektorja pK7WG

3.1.8 Bakterijske kulture

3.1.8.1 Bakterija *Escherichia coli*

Pri poskusih kloniranja in transformacije smo uporabili One Shot® TOP10 (Invitrogen) kemijsko kompetentne celice *E.coli*.

3.1.8.2 Bakterija *Agrobacterium tumefaciens*

Za rastlinsko transformacijo smo uporabili bakterijo *A. tumefaciens* sevov LBA 4404 in GV3101. Seva imata v genomu zapis za odpornost proti rifampicinu, vsebujeta pa tudi oslavljen Ti plazmid. Plazmid ima vir gene, ki omogočajo prenos T-DNA, vendar nima svoje funkcionalne regije T-DNA.

Sev LBA 4404 smo uporabili za stabilno transformacijo krompirja, sev GV3101 pa za prehodno transformacijo rastline *Nicotiana benthamiana*.

3.1.9 Rastlinski material

3.1.9.1 Rastni pogoji

Rastline so ves čas poskusa rasle v rastni komori, pod stalnimi pogoji: 16 ur osvetlitve pri 21°C, 8 ur teme pri 19°C in relativno zračno vlago 94±2 %. Rastline v zemlji smo zalivali z vodovodno vodo.

3.1.9.2 *Nicotiana benthamiana*

Za prehodno transformacijo smo uporabili sorodnico krompirja *Nicotiana benthamiana*. Semena iz semenske zbirke na NIB-u smo posadili v zemljo in po dveh tednih mlade poganjke presadili v lončke. Za poskus smo uporabili štiri tedne stare rastline.

3.1.9.3 *Solanum tuberosum* ssp.

Za stabilno transformacijo krompirja smo uporabili krompir *Solanum tuberosum* L. kultivarjev Rywal in Désirée. Rastline so bile del rastlinske zbirke NIB-a, kjer jih gojijo v *in vitro* pogojih. Za poskus smo uporabili štiri tedne stare rastline, ki so v višino merile približno 10 cm.

3.1.10 Programska oprema

- Program za poravnavo nukleotidnih zaporedij: Vector NTI verzija 9 – AlignX (Invitrogen)
- Določanje dolžine promotorja: PCR Primer Stats
http://www.bioinformatics.org/sms2/pcr_primer_stats.html
- Program za slikanje agaroznih gelov: UVI Photo MW (Biosystematica).
- Računanje molarnih razmerij: In-Fusion Molar Ratio Calculator
<http://bioinfo.clontech.com/infusion/molarRatio.do>
- Določanje regulatornih elementov v promotorskih zaporedjih: bioinformacijska baza podatkov PlantCARE:
<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>
- Določanje regulatornih elementov v promotorskih zaporedjih: bioinformacijska baza podatkov Transfac:
<http://www.biobase-international.com/product/transcription-factor-binding-sites>
- Program za delo s konfokalno lupo: Leica LAS X (Leica Microsystems)

3.2 METODE

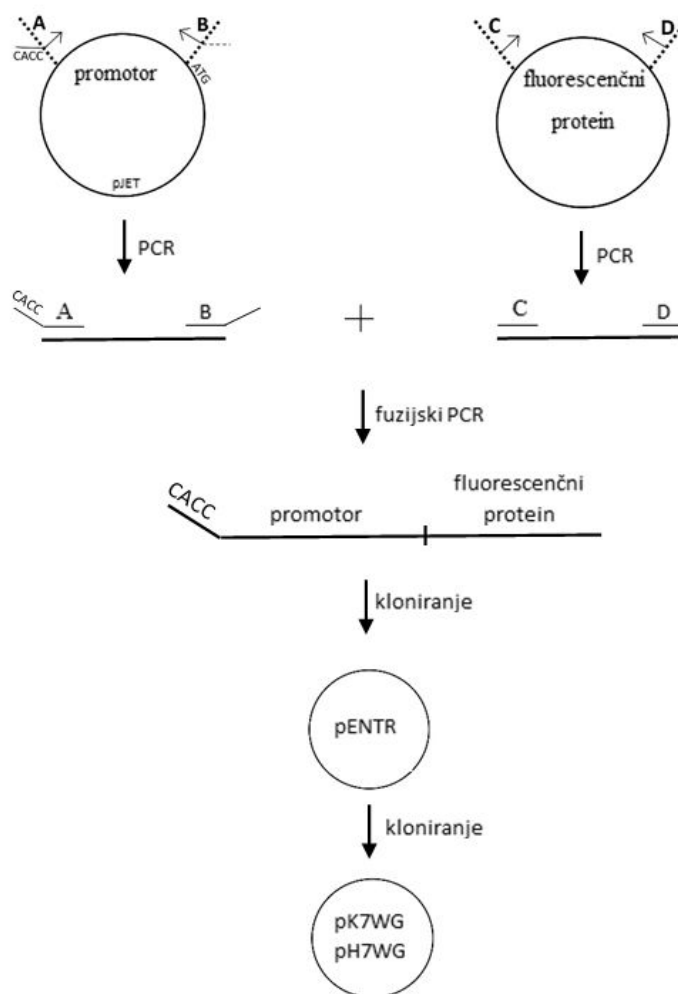
3.2.1 Priprava gojišč

V merilni valj smo natočili polovico končnega volumna bidestilirane vode in dodali zatehtane sestavine. Raztopini smo izmerili pH in natočili vodo do končnega volumna. Gojišče smo prelili v steklenice in ga avtoklavirali 15 min pri 121 °C. Kadar gojišča nismo takoj uporabili, smo ga shranili v hladilnik in ga pred uporabo raztopili v mikrovalovni pečici. Gojišče smo ohladili na 60 °C, mu dodali potrebne antibiotike in ga razlili v petrijevke oziroma banjice.

3.2.2 Kloniranje promotorjev

3.2.2.1 Načrtovanje začetnih oligonukleotidov

Na podlagi znanega nukleotidnega zaporedja promotorjev in fluorescenčnih proteinov smo s pomočjo programa AlignX načrtali začetne oligonukleotide. Pri tem smo upoštevali zahteve za nadaljnje delo.



Slika 9: Shematski prikaz priprave plazmidov z našim konstruktom

Dolžino promotorja smo določili z internetnim programom PCR Primer Stats, ki nam glede na stabilnost in dolžino določi tudi temperaturo prileganja začetnih oligonukleotidov (T_m), ki se je med dvema začetnima oligonukleotidoma razlikovala za največ $1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Začetni oligonukleotid A (Sl. 10) je bil komplementaren 5' koncu promotorja. Ker smo promotorja klonirali v plazmid pENTR, smo pred komplementarno zaporedje dodali CACC nukleotidno zaporedje.

Začetni oligonukleotid B je bil sestavljen iz dveh delov. Prvi del promotorja B je bil komplementaren 3' koncu promotorja PR1b (Sl. 11) in je imel približno enako T_m kot ostali začetni oligonukleotidi. Drugi del promotorja B pa je bil komplementaren 5' koncu fluorescenčnega proteina (Sl. 3,4,5) in je imel v primerjavi z nalegajočim delom začetnega oligonukleotida B 10°C višjo T_m . Začetni oligonukleotid B nam je v prvi PCR reakciji

omogočil pomnoževanje promotorja, hkrati pa je na 3' konec dodal zaporedje, ki je komplementarno fluorescenčnemu proteinu, kar je v drugi PCR reakciji omogočilo združitve promotorja s fluorescenčnim proteinom.

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	16
PR1b_gDNA	1	-----	AAATAGAGTCAAG-AAAAA	CTCTCC	CAATTACGTGATGGAACAGAAATCCACGACGSGTGACTGTGGCAGACCATTGTTTAAATAG-9GGTTC	AAAAATCCGAGGAGTAACATAGAACTAGTCGAAGGGGG--TTCC											
PR1b_(PW.1)_R	1	-----	AAATAGAGTCAAG-AAAAA	CTCTCC	CAATTACGTGATGGAACAGAAATCCACGACGSGTGACTGTGGCAGACCATTGTTTAAATAG-9GGTTC	AAAAATCCGAGGAGTAACATAGAACTAGTCGAAGGGGG--TTCC											
PR1b_(PW.1)_F	1	-----	AAATAGAGTCAAG-AAAAA	CTCTCC	CAATTACGTGATGGAACAGAAATCCACGACGSGTGACTGTGGCAGACCATTGTTTAAATAG-9GGTTC	AAAAATCCGAGGAGTAACATAGAACTAGTCGAAGGGGG--TTCC											
PR1b_(PW.2)_R	1	-----	AAATAGAGTCAAG-AAAAA	CTCTCC	CAATTACGTGATGGAACAGAAATCCACGACGSGTGACTGTGGCAGACCATTGTTTAAATAG-9GGTTC	AAAAATCCGAGGAGTAACATAGAACTAGTCGAAGGGGG--TTCC											
PR1b_(PW.2)_F	1	-----	AAATAGAGTCAAG-AAAAA	CTCTCC	CAATTACGTGATGGAACAGAAATCCACGACGSGTGACTGTGGCAGACCATTGTTTAAATAG-9GGTTC	AAAAATCCGAGGAGTAACATAGAACTAGTCGAAGGGGG--TTCC											
PR1b_(PW.3)_R	1	-----	AAATAGAGTCAAG-AAAAA	CTCTCC	CAATTACGTGATGGAACAGAAATCCACGACGSGTGACTGTGGCAGACCATTGTTTAAATAG-9GGTTC	AAAAATCCGAGGAGTAACATAGAACTAGTCGAAGGGGG--TTCC											
PR1b_(PW.3)_F	1	-----	AAATAGAGTCAAG-AAAAA	CTCTCC	CAATTACGTGATGGAACAGAAATCCACGACGSGTGACTGTGGCAGACCATTGTTTAAATAG-9GGTTC	AAAAATCCGAGGAGTAACATAGAACTAGTCGAAGGGGG--TTCC											
PR1b_(Rywal.1)_R	1	-----	AAATAGAGTCAAG-AAAAA	CTCTCC	CAATTACGTGATGGAACAGAAATCCACGACGSGTGACTGTGGCAGACCATTGTTTAAATAG-9GGTTC	AAAAATCCGAGGAGTAACATAGAACTAGTCGAAGGGGG--TTCC											
PR1b_(Rywal.1)_F	1	-----	AAATAGAGTCAAG-AAAAA	CTCTCC	CAATTACGTGATGGAACAGAAATCCACGACGSGTGACTGTGGCAGACCATTGTTTAAATAG-9GGTTC	AAAAATCCGAGGAGTAACATAGAACTAGTCGAAGGGGG--TTCC											
PR1b_(Rywal.2)_R	1	-----	AAATAGAGTCAAG-AAAAA	CTCTCC	CAATTACGTGATGGAACAGAAATCCACGACGSGTGACTGTGGCAGACCATTGTTTAAATAG-9GGTTC	AAAAATCCGAGGAGTAACATAGAACTAGTCGAAGGGGG--TTCC											
PR1b_(Rywal.2)_F	1	-----	AAATAGAGTCAAG-AAAAA	CTCTCC	CAATTACGTGATGGAACAGAAATCCACGACGSGTGACTGTGGCAGACCATTGTTTAAATAG-9GGTTC	AAAAATCCGAGGAGTAACATAGAACTAGTCGAAGGGGG--TTCC											
PR1b_(Rywal.3)_R	1	-----	AAATAGAGTCAAG-AAAAA	CTCTCC	CAATTACGTGATGGAACAGAAATCCACGACGSGTGACTGTGGCAGACCATTGTTTAAATAG-9GGTTC	AAAAATCCGAGGAGTAACATAGAACTAGTCGAAGGGGG--TTCC											
PR1b_(Rywal.3)_F	1	-----	AAATAGAGTCAAG-AAAAA	CTCTCC	CAATTACGTGATGGAACAGAAATCCACGACGSGTGACTGTGGCAGACCATTGTTTAAATAG-9GGTTC	AAAAATCCGAGGAGTAACATAGAACTAGTCGAAGGGGG--TTCC											
PR1b_(Désirée.1)_R	1	-----	AAATAGAGTCAAG-AAAAA	CTCTCC	CAATTACGTGATGGAACAGAAATCCACGACGSGTGACTGTGGCAGACCATTGTTTAAATAG-9GGTTC	AAAAATCCGAGGAGTAACATAGAACTAGTCGAAGGGGG--TTCC											
PR1b_(Désirée.1)_F	1	-----	AAATAGAGTCAAG-AAAAA	CTCTCC	CAATTACGTGATGGAACAGAAATCCACGACGSGTGACTGTGGCAGACCATTGTTTAAATAG-9GGTTC	AAAAATCCGAGGAGTAACATAGAACTAGTCGAAGGGGG--TTCC											
PR1b_(Désirée.2)_R	1	-----	AAATAGAGTCAAG-AAAAA	CTCTCC	CAATTACGTGATGGAACAGAAATCCACGACGSGTGACTGTGGCAGACCATTGTTTAAATAG-9GGTTC	AAAAATCCGAGGAGTAACATAGAACTAGTCGAAGGGGG--TTCC											
PR1b_(Désirée.2)_F	1	-----	AAATAGAGTCAAG-AAAAA	CTCTCC	CAATTACGTGATGGAACAGAAATCCACGACGSGTGACTGTGGCAGACCATTGTTTAAATAG-9GGTTC	AAAAATCCGAGGAGTAACATAGAACTAGTCGAAGGGGG--TTCC											
PR1b_(Désirée.3)_R	1	-----	AAATAGAGTCAAG-AAAAA	CTCTCC	CAATTACGTGATGGAACAGAAATCCACGACGSGTGACTGTGGCAGACCATTGTTTAAATAG-9GGTTC	AAAAATCCGAGGAGTAACATAGAACTAGTCGAAGGGGG--TTCC											
PR1b_(Désirée.3)_F	1	-----	AAATAGAGTCAAG-AAAAA	CTCTCC	CAATTACGTGATGGAACAGAAATCCACGACGSGTGACTGTGGCAGACCATTGTTTAAATAG-9GGTTC	AAAAATCCGAGGAGTAACATAGAACTAGTCGAAGGGGG--TTCC											

Slika 10: Nukleotidna zaporedja promotorja PR1b za načrtovanje začetnega oligonukleotida A

Vsaka različica promotorjev iz genotipov PW363, Rywal in Désirée je bila sekvencirana s 5' (F) in 3' (R) konca. Sivo označeni deli predstavljajo ujemaajoče nukleotidno zaporedje. S črno je označeno nukleotidno zaporedje, na podlagi katerega smo določili začetni oligonukleotid A za promotor PR1b.

	1502	1510	1520	1530	1540	1550	1560	1570	1580	1590	1600	1610	1620	1630	1640	1650	166
PR1b_gDNA	1486	AGACCATTTTTATCATTTCCTCTACTAAATTCCTTTAAATTTTCTTCACACATGCTAAACAAAATCCCAAAATTAATTTACTATAAATACACTACTTATCTCACATTTATAATCACAACTAGTAGATTTATTTCTTCCACTAGACTAAAGCAAAT															
PR1b_(PW.1)_R	1131	AGACCATTTTTATCATTTCCTCTACTAAATTCCTTTAAATTTTCTTCACACATGCTAAACAAAATCCCAAAATTAATTTACTATAAATACACTACTTATCTCACATTTATAATCACAACTAGTAGATTTATTTCTTCCACTAGACTAAAGCAAAT															
PR1b_(PW.1)_F	916	AGACCATTTTTATCATTTCCTCTACTAAATTCCTTTAAATTTTCTTCACACATGCTAAACAAAATCCCAAAATTAATTTACTATAAATACACTACTTATCTCACATTTATAATCACAACTAGTAGATTTATTTCTTCCACTAGACTAAAGCAAAT															
PR1b_(PW.2)_R	1132	AGACCATTTTTATCATTTCCTCTACTAAATTCCTTTAAATTTTCTTCACACATGCTAAACAAAATCCCAAAATTAATTTACTATAAATACACTACTTATCTCACATTTATAATCACAACTAGTAGATTTATTTCTTCCACTAGACTAAAGCAAAT															
PR1b_(PW.2)_F	381	AGACCATTTTTATCATTTCCTCTACTAAATTCCTTTAAATTTTCTTCACACATGCTAAACAAAATCCCAAAATTAATTTACTATAAATACACTACTTATCTCACATTTATAATCACAACTAGTAGATTTATTTCTTCCACTAGACTAAAGCAAAT															
PR1b_(PW.3)_R	1136	AGACCATTTTTATCATTTCCTCTACTAAATTCCTTTAAATTTTCTTCACACATGCTAAACAAAATCCCAAAATTAATTTACTATAAATACACTACTTATCTCACATTTATAATCACAACTAGTAGATTTATTTCTTCCACTAGACTAAAGCAAAT															
PR1b_(PW.3)_F	898	AGACCATTTTTATCATTTCCTCTACTAAATTCCTTTAAATTTTCTTCACACATGCTAAACAAAATCCCAAAATTAATTTACTATAAATACACTACTTATCTCACATTTATAATCACAACTAGTAGATTTATTTCTTCCACTAGACTAAAGCAAAT															
PR1b_(Rywal.1)_R	1133	AGACCATTTTTATCATTTCCTCTACTAAATTCCTTTAAATTTTCTTCACACATGCTAAACAAAATCCCAAAATTAATTTACTATAAATACACTACTTATCTCACATTTATAATCACAACTAGTAGATTTATTTCTTCCACTAGACTAAAGCAAAT															
PR1b_(Rywal.1)_F	899	AGACCATTTTTATCATTTCCTCTACTAAATTCCTTTAAATTTTCTTCACACATGCTAAACAAAATCCCAAAATTAATTTACTATAAATACACTACTTATCTCACATTTATAATCACAACTAGTAGATTTATTTCTTCCACTAGACTAAAGCAAAT															
PR1b_(Rywal.2)_R	1152	AGACCATTTTTATCATTTCCTCTACTAAATTCCTTTAAATTTTCTTCACACATGCTAAACAAAATCCCAAAATTAATTTACTATAAATACACTACTTATCTCACATTTATAATCACAACTAGTAGATTTATTTCTTCCACTAGACTAAAGCAAAT															
PR1b_(Rywal.2)_F	899	AGACCATTTTTATCATTTCCTCTACTAAATTCCTTTAAATTTTCTTCACACATGCTAAACAAAATCCCAAAATTAATTTACTATAAATACACTACTTATCTCACATTTATAATCACAACTAGTAGATTTATTTCTTCCACTAGACTAAAGCAAAT															
PR1b_(Rywal.3)_R	1142	AGACCATTTTTATCATTTCCTCTACTAAATTCCTTTAAATTTTCTTCACACATGCTAAACAAAATCCCAAAATTAATTTACTATAAATACACTACTTATCTCACATTTATAATCACAACTAGTAGATTTATTTCTTCCACTAGACTAAAGCAAAT															
PR1b_(Rywal.3)_F	898	AGACCATTTTTATCATTTCCTCTACTAAATTCCTTTAAATTTTCTTCACACATGCTAAACAAAATCCCAAAATTAATTTACTATAAATACACTACTTATCTCACATTTATAATCACAACTAGTAGATTTATTTCTTCCACTAGACTAAAGCAAAT															
PR1b_(Désirée.1)_R	1158	AGACCATTTTTATCATTTCCTCTACTAAATTCCTTTAAATTTTCTTCACACATGCTAAACAAAATCCCAAAATTAATTTACTATAAATACACTACTTATCTCACATTTATAATCACAACTAGTAGATTTATTTCTTCCACTAGACTAAAGCAAAT															
PR1b_(Désirée.1)_F	895	AGACCATTTTTATCATTTCCTCTACTAAATTCCTTTAAATTTTCTTCACACATGCTAAACAAAATCCCAAAATTAATTTACTATAAATACACTACTTATCTCACATTTATAATCACAACTAGTAGATTTATTTCTTCCACTAGACTAAAGCAAAT															
PR1b_(Désirée.2)_R	1143	AGACCATTTTTATCATTTCCTCTACTAAATTCCTTTAAATTTTCTTCACACATGCTAAACAAAATCCCAAAATTAATTTACTATAAATACACTACTTATCTCACATTTATAATCACAACTAGTAGATTTATTTCTTCCACTAGACTAAAGCAAAT															
PR1b_(Désirée.2)_F	939	AGACCATTTTTATCATTTCCTCTACTAAATTCCTTTAAATTTTCTTCACACATGCTAAACAAAATCCCAAAATTAATTTACTATAAATACACTACTTATCTCACATTTATAATCACAACTAGTAGATTTATTTCTTCCACTAGACTAAAGCAAAT															
PR1b_(Désirée.3)_R	1144	AGACCATTTTTATCATTTCCTCTACTAAATTCCTTTAAATTTTCTTCACACATGCTAAACAAAATCCCAAAATTAATTTACTATAAATACACTACTTATCTCACATTTATAATCACAACTAGTAGATTTATTTCTTCCACTAGACTAAAGCAAAT															
PR1b_(Désirée.3)_F	896	AGACCATTTTTATCATTTCCTCTACTAAATTCCTTTAAATTTTCTTCACACATGCTAAACAAAATCCCAAAATTAATTTACTATAAATACACTACTTATCTCACATTTATAATCACAACTAGTAGATTTATTTCTTCCACTAGACTAAAGCAAAT															

Slika 11: Nukleotidna zaporedja promotorja PR1b za načrtovanje začetnega oligonukleotida B

Vsaka različica promotorjev iz genotipov PW363, Rywal in Désirée je bila sekvencirana s 5' (F) in 3' (R) konca. Sivo označeni deli predstavljajo ujemaajoče nukleotidno zaporedje. S črno je označena lega nukleotidnega zaporedja, na podlagi katerega smo določili prvi del začetnega oligonukleotida B za promotor PR1b. Zaporedja se med seboj razlikujejo, zato smo določili tri različne začetne oligonukleotide, ki smo jih poimenovali s nukleotidi, ki se v zaporedju razlikujejo: PR1b_R_CACC_Fus_mcherry_P_D iz PR1b(Désirée.1)_F, PR1b_R_CACC_Fus_mcherry_R_TC iz PR1b(Rywal.1)_R in PR1b_R_CACC_Fus_mcherry_R_AT iz PR1b(Rywal.2)_R (Preg. 3).

	6	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160	
TGA2_gDNA	1	-----	TCGTTACAAATAATGATTGAAGCGAGATTGAGCTGATTCATCATGTATAGAAAAGGTTGTGGAGCATTAAATGAATGTATGAAGTTTAACTATAACGAGTTGTAAAGAAAGTAAATAATCCAAAGAGATCATCAAAAA															
TGA2 [PW.1]_F	1	-----	TCGTTACAAATAATGATTGAAGCGAGATTGAGCTGATTCATCATGTATAGAAAAGGTTGTGGAGCATTAAATGAATGTATGAAGTTTAACTATAACGAGTTGTAAAGAAAGTAAATAATCCAAAGAGATCATCAAAAA															
TGA2 [PW.1]_R	1	-----	TCTAGAAAGATCCGTTN-NRATAAATGATTGAAGCGAGATTGAGCTAATTCATCATGTATAGAAAAGGTTGTGGAGCATTAAATGAATGTATGAAGTTTAACTATAACGAGTTGTAAAGAAAGTAAATAATCCAAAGAGATCATCAAAAA															
TGA2 [PW.2]_F	1	-----	TCTAGAAAGATCCGTTN-NRATAAATGATTGAAGCGAGATTGAGCTAATTCATCATGTATAGAAAAGGTTGTGGAGCATTAAATGAATGTATGAAGTTTAACTATAACGAGTTGTAAAGAAAGTAAATAATCCAAAGAGATCATCAAAAA															
TGA2 [PW.2]_R	5	-----	TTTNCAGCAGATCCGTTA-CRATAAATGATTGAAGCGAGATTGAGCTAATTCATCATGTATAGAAAAGGTTGTGGAGCATTAAATGAATGTATGAAGTTTAACTATAACGAGTTGTAAAGAAAGTAAATAATCCAAAGAGATCATCAAAAA															
TGA2 [PW.3]_F	1	-----	TCTAGAAAGATCCGTTN-NRATAAATGATTGAAGCGAGATTGAGCTAATTCATCATGTATAGAAAAGGTTGTGGAGCATTAAATGAATGTATGAAGTTTAACTATAACGAGTTGTAAAGAAAGTAAATAATCCAAAGAGATCATCAAAAA															
TGA2 [PW.3]_R	1	-----	TCTAGAAAGATCCGTTN-NRATAAATGATTGAAGCGAGATTGAGCTAATTCATCATGTATAGAAAAGGTTGTGGAGCATTAAATGAATGTATGAAGTTTAACTATAACGAGTTGTAAAGAAAGTAAATAATCCAAAGAGATCATCAAAAA															
TGA2 [Rywal.1]_F	1	-----	AAAGATCCGTTN-NRATAAATGATTGAAGCGAGATTGAGCTAATTCATCATGTATAGAAAAGGTTGTGGAGCATTAAATGAATGTATGAAGTTTAACTATAACGAGTTGTAAAGAAAGTAAATAATCCAAAGAGATCATCAAAAA															
TGA2 [Rywal.1]_R	1	-----	AAAGATCCGTTN-NRATAAATGATTGAAGCGAGATTGAGCTAATTCATCATGTATAGAAAAGGTTGTGGAGCATTAAATGAATGTATGAAGTTTAACTATAACGAGTTGTAAAGAAAGTAAATAATCCAAAGAGATCATCAAAAA															
TGA2 [Rywal.2]_F	1	-----	TTTNCAGCAGATCCGTTA-CRATAAATGATTGAAGCGAGATTGAGCTAATTCATCATGTATAGAAAAGGTTGTGGAGCATTAAATGAATGTATGAAGTTTAACTATAACGAGTTGTAAAGAAAGTAAATAATCCAAAGAGATCATCAAAAA															
TGA2 [Rywal.2]_R	6	-----	TTTNCAGCAGATCCGTTA-CRATAAATGATTGAAGCGAGATTGAGCTAATTCATCATGTATAGAAAAGGTTGTGGAGCATTAAATGAATGTATGAAGTTTAACTATAACGAGTTGTAAAGAAAGTAAATAATCCAAAGAGATCATCAAAAA															
TGA2 [Rywal.3]_F	1	-----	TAGAAAGATCCGTTN-NRATAAATGATTGAAGCGAGATTGAGCTAATTCATCATGTATAGAAAAGGTTGTGGAGCATTAAATGAATGTATGAAGTTTAACTATAACGAGTTGTAAAGAAAGTAAATAATCCAAAGAGATCATCAAAAA															
TGA2 [Rywal.3]_R	1	-----	TAGAAAGATCCGTTN-NRATAAATGATTGAAGCGAGATTGAGCTAATTCATCATGTATAGAAAAGGTTGTGGAGCATTAAATGAATGTATGAAGTTTAACTATAACGAGTTGTAAAGAAAGTAAATAATCCAAAGAGATCATCAAAAA															
TGA2 [Desiree.1]_F	1	-----	AGCAGATCCGTTN-NRATAAATGATTGAAGCGAGATTGAGCTAATTCATCATGTATAGAAAAGGTTGTGGAGCATTAAATGAATGTATGAAGTTTAACTATAACGAGTTGTAAAGAAAGTAAATAATCCAAAGAGATCATCAAAAA															
TGA2 [Desiree.1]_R	1	-----	AGCAGATCCGTTN-NRATAAATGATTGAAGCGAGATTGAGCTAATTCATCATGTATAGAAAAGGTTGTGGAGCATTAAATGAATGTATGAAGTTTAACTATAACGAGTTGTAAAGAAAGTAAATAATCCAAAGAGATCATCAAAAA															
TGA2 [Desiree.2]_F	1	-----	TTTNCAGCAGATCCGTTA-CRATAAATGATTGAAGCGAGATTGAGCTAATTCATCATGTATAGAAAAGGTTGTGGAGCATTAAATGAATGTATGAAGTTTAACTATAACGAGTTGTAAAGAAAGTAAATAATCCAAAGAGATCATCAAAAA															
TGA2 [Desiree.2]_R	2	-----	TTTNCAGCAGATCCGTTA-CRATAAATGATTGAAGCGAGATTGAGCTAATTCATCATGTATAGAAAAGGTTGTGGAGCATTAAATGAATGTATGAAGTTTAACTATAACGAGTTGTAAAGAAAGTAAATAATCCAAAGAGATCATCAAAAA															
TGA2 [Desiree.3]_F	1	-----	TTTNCAGCAGATCCGTTA-CRATAAATGATTGAAGCGAGATTGAGCTAATTCATCATGTATAGAAAAGGTTGTGGAGCATTAAATGAATGTATGAAGTTTAACTATAACGAGTTGTAAAGAAAGTAAATAATCCAAAGAGATCATCAAAAA															
TGA2 [Desiree.3]_R	5	-----	TTTNCAGCAGATCCGTTA-CRATAAATGATTGAAGCGAGATTGAGCTAATTCATCATGTATAGAAAAGGTTGTGGAGCATTAAATGAATGTATGAAGTTTAACTATAACGAGTTGTAAAGAAAGTAAATAATCCAAAGAGATCATCAAAAA															

Slika 12: Nukleotidna zaporedja promotorja TGA2 za načrtovanje začetnega oligonukleotida A

Vsaka različica promotorjev iz genotipov PW363, Rywal in Désirée je bila sekvencirana iz 5' (F) in 3' (R) konca. Sivo označeni deli predstavljajo ujemaajoče nukleotidno zaporedje. S črno je označena lega nukleotidnega zaporedja, na podlagi katerega smo določili začetni oligonukleotid A za konstrukt TGA2:fluorescenčni protein.

Pri pomnoževanju fluorescenčnih proteinov smo uporabili začetni oligonukleotid C, ki je komplementaren 5' koncu, in začetni oligonukleotid D, ki je komplementaren 3' koncu fluorescenčnega proteina.

Za natančno določanje nukleotidnega zaporedja promotorja smo potrebovali dodatne reakcije sekvenciranja. S tem smo si zagotovili, da je bilo nukleotidno zaporedje, ki nas je zanimalo, vsaj dvakrat sekvencirano in smo lahko določili pravilno nukleotidno zaporedje. Prvi začetni oligonukleotidi, ki smo jih načrtovali, so omogočili sekvenciranje s 5' konca proti 3' koncu zaporedja in obratno. Načrtovali smo še začetne oligonukleotide za PR1b, ki so omogočili sekvenciranje iz sredine proti koncema zaporedja (Pregl. 3, označeni z **, Sl. 13, 14).

	987	990	1000	1010	1020	1030	1040	1050	1060	1070	1080	1090
PR1b_gDNA	957	AACATGTGTGAGCC-CCATCTAATGGAA	AAAAAATATACATCTTTATGCTTCACGAGTTGTAGAACATGTGTGAGC	CCCCATCTAATAGAAAAA-TATATATCTTTTT								
PR1b_4.3_R_23DH17	969	AACATGTGTGAGCC-CCATCTAATGGAA	AAAAA-TATACATCTTTATGCTTCACGAGTTGTAGAACATGTGTGAGC	CCCCATCTAATAGAAAAA-TATACATCTTTTT								
PR1b_4.3_F_23D699_RC	413	AACATGTGTGAGCC-CCATCTAATGGAA	AAAAA-TATACATCTTTATGCTTCACGAGTTGTAGAACATGTGTGAGC	CCCCATCTAATAGAAAAA-TATACATCTTTTT								
PR1b_4.4_F_23DH00	966	AACATGTGTGAGCC-CCATCTAATGGAA	AAAAA-TATACATCTTTATGCTTCACGAGTTGTAGAACATGTGTGAGC	CCCCATCTAATAGAAAAA-TATACATCTTTTT								
PR1b_4.4_R_23DH18_RC	478	AACATGTGTGAGCC-CCATCTAATGGAA	AAAAA-TATACATCTTTATGCTTCACGAGTTGTAGAACATGTGTGAGC	CCCCATCTAATAGAAAAA-TATACATCTTTTT								
PR1b_4.4_F_23DH01	971	AACATGTGTGAGCC-CCATCTAATGGAA	AAAAA-TATACATCTTTATGCTTCACGAGTTGTAGAACATGTGTGAGC	CCCCATCTAATAGAAAAA-TATACATCTTTTT								
PR1b_4.5_R_23DH19_RC	393	AACATGTGTGAGCC-CCATCTAATGGAA	AAAAA-TATACATCTTTATGCTTCACGAGTTGTAGAACATGTGTGAGC	CCCCATCTAATAGAAAAA-TATACATCTTTTT								
PR1b_5.3_F_23DH02	858	AACATGTGTGAGCC-CCATCTAATGGAA	AAAAA-TATACATCTTTATGCTTCACGAGTTGTAGAACATGTGTGAGC	CCCCATCTAATAGAAAAA-TATACATCTTTTT								
PR1b_5.3_R_23DH20_RC	394	AACATGTGTGAGCC-CCATCTAATGGAA	AAAAA-TATACATCTTTATGCTTCACGAGTTGTAGAACATGTGTGAGC	CCCCATCTAATAGAAAAA-TATACATCTTTTT								
PR1b_5.4_F_23DH03	848	AACATGTGTGAGCC-CCATCTAATGGAA	AAAAA-TATACATCTTTATGCTTCACGAGTTGTAGAACATGTGTGAGC	CCCCATCTAATAGAAAAA-TATACATCTTTTT								
PR1b_5.4_R_23DH21_RC	388	AACATGTGTGAGCC-CCATCTAATGGAA	AAAAA-TATACATCTTTATGCTTCACGAGTTGTAGAACATGTGTGAGC	CCCCATCTAATAGAAAAA-TATACATCTTTTT								
PR1b_5.5_F_23DH04	971	AACATGTGTGAGCC-CCATCTAATGGAA	AAAAA-TATACATCTTTATGCTTCACGAGTTGTAGAACATGTGTGAGC	CCCCATCTAATAGAAAAA-TATACATCTTTTT								
PR1b_5.5_R_23DH22_RC	349	AACATGTGTGAGCC-CCATCTAATGGAA	AAAAA-TATACATCTTTATGCTTCACGAGTTGTAGAACATGTGTGAGC	CCCCATCTAATAGAAAAA-TATACATCTTTTT								
PR1b_6.3_R_23DH23	970	AACATGTGTGAGCC-CCATCTAATGGAA	AAAAA-TATACATCTTTATGCTTCACGAGTTGTAGAACATGTGTGAGC	CCCCATCTAATAGAAAAA-TATACATCTTTTT								
PR1b_6.3_F_23DH05_RC	352	AACATGTGTGAGCC-CCATCTAATGGAA	AAAAA-TATACATCTTTATGCTTCACGAGTTGTAGAACATGTGTGAGC	CCCCATCTAATAGAAAAA-TATACATCTTTTT								
PR1b_6.4_F_23DH06	969	AACATGTGTGAGCC-CCATCTAATGGAA	AAAAA-TATACATCTTTATGCTTCACGAGTTGTAGAACATGTGTGAGC	CCCCATCTAATAGAAAAA-TATACATCTTTTT								
PR1b_6.4_R_23DH24_RC	436	AACATGTGTGAGCC-CCATCTAATGGAA	AAAAA-TATACATCTTTATGCTTCACGAGTTGTAGAACATGTGTGAGC	CCCCATCTAATAGAAAAA-TATACATCTTTTT								
PR1b_6.5_F_23DH07	971	AACATGTGTGAGCC-CCATCTAATGGAA	AAAAA-TATACATCTTTATGCTTCACGAGTTGTAGAACATGTGTGAGC	CCCCATCTAATAGAAAAA-TATACATCTTTTT								
PR1b_6.5_R_23DH25	383	AACATGTGTGAGCC-CCATCTAATGGAA	AAAAA-TATACATCTTTATGCTTCACGAGTTGTAGAACATGTGTGAGC	CCCCATCTAATAGAAAAA-TATACATCTTTTT								

Slika 13: Izbira začetnega oligonukleotida PR1b_F1040_seq

Vsaka različica promotorjev iz genotipov PW363, Rywal in Désirée je bila sekvencirana s 5' (F) in 3' (R) konca, zaporedji v sredini nalegata. Svetlo sivo označeni deli predstavljajo ujemaajoče nukleotidno zaporedje, temno sivi pa večinsko ujemanje. S črno označeno nukleotidno zaporedje, ki smo ga izbrali za promotor, ki nam je omogočil dodatno sekvenciranje.

PR1b_gDNA	629	630	640	650	660	670	680	690	700	710	720	730	740	750	760
PR1b_4.3_R_23DH17	607	CTTCTCT	-CTCGTACAATAA	TTTCT	-CCCAATAGATT	TAGGCGGCTCA	-AT	-AATATCGATGGC	TAAATCATT	TTCCATGA	AAATA	TTTAC	AGTAAACACT	GAATCGCAT	TCTCTTGATCGGATGTTCC
PR1b_4.3_F_23D699_RC	618	CTTCTCT	-CTCGTACAATAA	TTTCT	-CCCAATAGATT	TAGGCGGCTCA	AAAT	-AATATCGATGGC	TAAATCATT	TTCCATGA	AAATA	TTTAAAGTAAACACT	GAATCGCAT	TCTCTTGATCGGATGTTCC	
PR1b_4.4_F_23DH00	618	NNNNNT	-TNGTACAATAA	TTTCT	-CCCAATAGATT	TAGGCGGCTCA	AAAT	-AATATCGATGGC	TAAATCATT	TTCCATGA	AAATA	TTTAAAGTAAACACT	GAATCGCAT	TCTCTTGATCGGATGTTCC	
PR1b_4.4_R_23DH18_RC	618	CTTCTCT	-CTCGTACAATAA	TTTCT	-CCCAATAGATT	TAGGCGGCTCA	AAAT	-AATATCGATGGC	TAAATCATT	TTCCATGA	AAATA	TTTAAAGTAAACACT	GAATCGCAT	TCTCTTGATCGGATGTTCC	
PR1b_4.5_F_23DH01	623	CTTCTCT	-CTCGTACAATAA	TTTCT	-CCCAATAGATT	TAGGCGGCTCA	AAAT	-AATATCGATGGC	TAAATCATT	TTCCATGA	AAATA	TTTAAAGTAAACACT	GAATCGCAT	TCTCTTGATCGGATGTTCC	
PR1b_4.5_R_23DH19_RC	42	TTNNNT	-TNGTACAATAA	TTTCT	-CCCAATAGATT	TAGGCGGCTCA	AAAT	-AATATCGATGGC	TAAATCATT	TTCCATGA	AAATA	TTTAAAGTAAACACT	GAATCGCAT	TCTCTTGATCGGATGTTCC	
PR1b_5.3_F_23DH02	508	CTTCTCT	-CTCGTACAATAA	TTTCT	-CCCAATAGATT	TAGGCGGCTCA	AAAT	-AATATCGATGGC	TAAATCATT	TTCCATGA	AAATA	TTTAAAGTAAACACT	GAATCGCAT	TCTCTTGATCGGATGTTCC	
PR1b_5.3_R_23DH20_RC	32	CTTCTCT	-CTCGTACAATAA	TTTCT	-CCCAATAGATT	TAGGCGGCTCA	AAAT	-AATATCGATGGC	TAAATCATT	TTCCATGA	AAATA	TTTAAAGTAAACACT	GAATCGCAT	TCTCTTGATCGGATGTTCC	
PR1b_5.4_F_23DH03	498	CTTCTCT	-CTCGTACAATAA	TTTCT	-CCCAATAGATT	TAGGCGGCTCA	AAAT	-AATATCGATGGC	TAAATCATT	TTCCATGA	AAATA	TTTAAAGTAAACACT	GAATCGCAT	TCTCTTGATCGGATGTTCC	
PR1b_5.4_R_23DH21_RC	37	TTNNNT	-TNGTACAATAA	TTTCT	-CCCAATAGATT	TAGGCGGCTCA	AAAT	-AATATCGATGGC	TAAATCATT	TTCCATGA	AAATA	TTTAAAGTAAACACT	GAATCGCAT	TCTCTTGATCGGATGTTCC	
PR1b_5.5_F_23DH04	618	CTTCTCT	-CTCGTACAATAA	TTTCT	-CCCAATAGATT	TAGGCGGCTCA	AAAT	-AATATCGATGGC	TAAATCATT	TTCCATGA	AAATA	TTTAAAGTAAACACT	GAATCGCAT	TCTCTTGATCGGATGTTCC	
PR1b_5.5_R_23DH22_RC	1	-----	TNGTACAATAA	TTTCT	-CCCAATAGATT	TAGGCGGCTCA	AAAT	-AATATCGATGGC	TAAATCATT	TTCCATGA	AAATA	TTTAAAGTAAACACT	GAATCGCAT	TCTCTTGATCGGATGTTCC	
PR1b_6.3_R_23DH23	619	CTTCTCT	-CTCGTACAATAA	TTTCT	-CCCAATAGATT	TAGGCGGCTCA	AAAT	-AATATCGATGGC	TAAATCATT	TTCCATGA	AAATA	TTTAAAGTAAACACT	GAATCGCAT	TCTCTTGATCGGATGTTCC	
PR1b_6.3_F_23DH05_RC	1	-----	TNGTACAATAA	TTTCT	-CCCAATAGATT	TAGGCGGCTCA	AAAT	-AATATCGATGGC	TAAATCATT	TTCCATGA	AAATA	TTTAAAGTAAACACT	GAATCGCAT	TCTCTTGATCGGATGTTCC	
PR1b_6.4_R_23DH06	618	CTTCTCT	-CTCGTACAATAA	TTTCT	-CCCAATAGATT	TAGGCGGCTCA	AAAT	-AATATCGATGGC	TAAATCATT	TTCCATGA	AAATA	TTTAAAGTAAACACT	GAATCGCAT	TCTCTTGATCGGATGTTCC	
PR1b_6.4_R_23DH24_RC	84	NNNNNT	-TNGTACAATAA	TTTCT	-CCCAATAGATT	TAGGCGGCTCA	AAAT	-AATATCGATGGC	TAAATCATT	TTCCATGA	AAATA	TTTAAAGTAAACACT	GAATCGCAT	TCTCTTGATCGGATGTTCC	
PR1b_6.5_F_23DH07	623	CTTCTCT	-CTCGTACAATAA	TTTCT	-CCCAATAGATT	TAGGCGGCTCA	AAAT	-AATATCGATGGC	TAAATCATT	TTCCATGA	AAATA	TTTAAAGTAAACACT	GAATCGCAT	TCTCTTGATCGGATGTTCC	
PR1b_6.5_R_23DH25	31	TTNNNT	-TNGTACAATAA	TTTCT	-CCCAATAGATT	TAGGCGGCTCA	AAAT	-AATATCGATGGC	TAAATCATT	TTCCATGA	AAATA	TTTAAAGTAAACACT	GAATCGCAT	TCTCTTGATCGGATGTTCC	

Slika 14: Izbira začetnega oligonukleotida PR1b_R740_seq

Vsaka različica promotorjev iz genotipov PW363, Rywal in Désirée je bila sekvencirana iz 5' (F) in 3' (R) konca, zaporedji v sredini nalegata. Svetlo sivo označeni deli predstavljajo ujemačo nukleotidno zaporedje, temno sivi pa večinsko ujemanje. S črno označeno nukleotidno zaporedje smo ga izbrali za promotor, ki nam je omogočil dodatno sekvenciranje.

Preglednica 3: Načrtovani začetni oligonukleotidi

Oznaka začetnega oligonukleotida	Nukleotidno zaporedje začetnega oligonukleotida	T _m (°C)
Promotor PR1b	A = PR1b_F_CACC	64,4
	PR1b_R_CACC_Fus_mCherry_P_D	64,3
	B = PR1b_R_CACC_Fus_mCherry_R_TC	64,3
	B = PR1b_R_CACC_Fus_mCherry_R_AT	64,3
	B = PR1b_R_CACC_YFP	64,8
Promotor TGA2	A = TGA_F_CACC	64,8
	C = mCherryF=YFP_F = CFP_F	65,3
Fluoro-scenčni protein	D = mCherryR=YFP_R = CFP_R	64,7
	PR1b_F1040_seq	54,4
	PR1b_R740_seq	58,2

3.2.2.2 Verižna reakcija s polimerazo

Nukleotidna zaporedja promotorjev PR1b, fluorescenčnih proteinov mCherry in YFP ter konstrukte TGA2::fluorescenčni protein smo pomnožili z verižno reakcijo s polimerazo (PCR reakcija). Pri tem smo uporabili Phusion® High-Fidelity PCR Kit (Biolabs).

Za delo smo uporabili plazmide s promotorskimi zaporedji PR1b(Desiree.1), PR1b(Rywal.1), PR1b(Rywal.2), PR1b(Rywal.3), fluorescenčnimi proteini mCherry in YFP ter plazmide s konstrukti TGA2(PW363.1)::YFP, TGA2(PW363.1)::CFP, TGA2(Rywal.1):YFP in TGA2(Rywal.1):CFP. Kot matrično DNA smo uporabili 1 μ l ustrezno redčenega plazmida.

Za pomnoževanje določenega fragmenta smo potrebovali ustrezna začetna oligonukleotida (Pregl. 5). Vsakemu vzorcu plazmidne DNA smo dodali 49 μ l ustrezne reakcijske mešanice (Pregl. 4). Kot kontrolo smo uporabili reakcijsko mešanico brez DNA vzorca. Program reakcije smo nastavili glede na temperaturo prileganja začetnih oligonuklotidov (Pregl. 6).

Preglednica 4: Reakcijska mešanica za pomnoževanje promotorja PR1b, fluorescenčnega proteina in konstrukta TGA2

Reagent	Založna koncentracija	Končna koncentracija	μ l na reakcijo
Voda			32,5
5x Phusion HF pufer	5 X	1 X	10
dNTP mešanica	10 mM vsak	200 μ M vsak	1
5' PCR začetni oligonukleotid	10 μ M	500 nM	2,5
3' PCR začetni oligonukleotid	10 μ M	500 nM	2,5
Phusion DNA polimeraza	2 U/ μ l	1 U/ 50 μ l	0,5
Matrična DNA	10 ng/ μ l		1
Končni volumen			50

Preglednica 5: Vzorec DNA in pripadajoča začetna oligonukleotida za pomnoževanje promotorja PR1b, fluorescenčnega proteina in konstrukta TGA2

Matrična DNA	5' PCR začetni oligonukleotid	3' PCR začetni oligonukleotid
PR1b(Desiree.1)	PR1b_F_CACC	PR1b_R_CACC_Fus_mCherry_P_D
PR1b(Rywal.1)	PR1b_F_CACC	PR1b_R_CACC_Fus_mCherry_R_TC
PR1b(Rywal.2)	PR1b_F_CACC	PR1b_R_CACC_Fus_mCherry_R_AT
PR1b(Rywal.3)	PR1b_F_CACC	PR1b_R_CACC_Fus_mCherry_R_TC
PR1b(Desiree.3)	PR1b_F_CACC	PR1b_R_CACC_Fus_YFP
TGA2(PW363.1)::CFP	TGA_F_GW	TGA_R_GW_Fus_CFP
TGA2(PW363.1)::YFP	TGA_F_GW	TGA_R_GW_Fus_CFP
TGA2(Rywal.1)::CFP	TGA_F_GW	TGA_R_GW_Fus_CFP
TGA2(Rywal.1)::YFP	TGA_F_GW	TGA_R_GW_Fus_CFP
mCherry	C=mCherryF=YFP_F=CFP_F	D=mCherryR=YFP_R=CFP_R
YFP	C=mCherryF=YFP_F=CFP_F	D=mCherryR=YFP_R=CFP_R

Preglednica 6: Program PCR reakcije, s katero smo pomnožili promotor PR1b, fluorescenčni protein in konstrukt TGA2

Korak	Temperatura	Čas	Ponovitev
Začetna denaturacija	98 °c	30 s	1 cikel
Denaturacija	98 °c	10 s	
Prileganje	62 °c	30 s	30 ciklov
Podaljševanje	72 °c	2,5 min	
Končno podaljševanje	72 °c	10 min	1 cikel
	4 °c	∞	

3.2.2.3 Agarozna gelska elektroforeza

S PCR reakcijo smo pomnožili promotorje in fluorescenčne proteine. Prisotnost PCR produkta smo preverili na 1-odstotnem agaroznem gelu pripravljenem iz agaroze (Sigma), 1x pufra TAE (Milipore) in etidijevega bromida (Sigma, $c = 1 \mu\text{l}/20 \text{ ml}$ raztopine agaroze). Raztopino smo razlili v nosilec z glavničkom in po 30 min strjen gel prenesli v elektroforezno kadičko z 1x pufrom TAE.

Vsakemu vzorcu (50 μl) smo dodali 40 μl nanašalnega pufra (Loading Dye, Fermentas) in dobro premešali. V prvo jamico na gelu smo nanесли 5 μl velikostne lestvice Mass Ruler™ DNA Ladder Mix, (Fermentas), v ostale pa vzorce z nanašalnim pufrom.

Elektroforeza je tekla eno uro pri napetosti 100 V. Po končani elektroforezi smo gel osvetlili pod UV svetlobo na transiluminatorju (UViPRO) in slikali s programom UVI Photo MW (Biosystematica). Na sliki gela smo preverili velikosti fragmentov.

V primeru uporabe kompleta reagentov za izolacijo DNA iz agaroznega gela Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) smo uporabili modificiran 1× pufer TAE (Millipore).

3.2.2.4 Izolacija DNA iz gela

Ker je pri PCR reakciji poleg pomnoževanje željenih fragmentov prišlo tudi do nespecifičnega pomnoževanja, smo PCR produkte nanесли na 1-odstotni agarozni gel, da bi fragmente ločili po velikosti. Po končani elektroforezi smo gel prestavili na Transiluminator Safe Imager™ (Invitrogen) in s skalpelom izrezali gel z ustrezno DNA. Izolacijo DNA iz gela smo nadaljevali po navodilih proizvajalca (Wizard® SV Gel and PRC Clean-Up System, Promega).

3.2.2.5 Merjenje koncentracije DNA

Izoliranim vzorcem smo določili koncentracijo in čistost s pomočjo nanodropa. Pred merjenjem je bilo v program potrebno vnesti vzorec pufr, v katerem smo eluirali izolirano DNA. Pri nas je bila to vedno voda brez nukleaz (Ambion).

3.2.2.6 Fuzijska verižna reakcija s polimerazo

Za združitev promotorja PR1b in fluorescenčnega proteina smo uporabili fuzijsko verižno reakcijo s polimerazo (Fusion PCR). Kot kontrolo smo uporabili reakcijsko mešanico brez DNA vzorca.

Preglednica 7: Reakcijska mešanica za pomnoževanje in fuzijo promotorja PR1b in fluorescenčnega proteina

Reagent	Založna koncentracija	Končna koncentracija	μl na reakcijo
Voda			28,5
5x Phusion HF pufer	5 x	1 x	10
dNTP mešanica	vsak 2,5 mM	vsak 200 μM	4
5' PCR začetni oligonukleotid	10 μM	100 nM	2,5
3' PCR začetni oligonukleotid	10 μM	100 nM	2,5
Phusion DNA polimeraza	2 U/μl	1 U/ 50 μl	0,5
Matrična DNA 1	10 ng/μl		1
Matrična DNA 2	10 ng/μl		1
Končni volumen			50

Preglednica 8: Vzorca DNA in pripadajoča začetna oligonukleotida za pomnoževanje in fuzijo promotorja PR1b in fluorescenčnega proteina

Matrična DNA 1	Matrična DNA 2	5' PCR začetni oligonukleotid	3' PCR začetni oligonukleotid
PR1b(Desiree.1)	mCherry	PR1b_F_CACC	D=mCherryR=YFP_R=CFP_R
PR1b(Rywal.1)	mCherry	PR1b_F_CACC	D=mCherryR=YFP_R=CFP_R
PR1b(Rywal.2)	mCherry	PR1b_F_CACC	D=mCherryR=YFP_R=CFP_R
PR1b(Rywal.3)	mCherry	PR1b_F_CACC	D=mCherryR=YFP_R=CFP_R
PR1b(Desiree.1)	YFP	PR1b_F_CACC	D=mCherryR=YFP_R=CFP_R

Preglednica 9: Program PCR reakcije za pomnoževanje in fuzijo promotorja PR1b in fluorescenčnega proteina

Korak	Temperatura	Čas	Ponovitev
Začetna denaturacija	98 °c	3 min	1 cikel
Denaturacija	98 °c	10 s	
Prileganje	64 °c	30 s	5 ciklov
Podaljševanje	72 °c	90 s	
Denaturacija	98 °c	10 s	
Prileganje	55 °c	30 s	30 ciklov
Podaljševanje	72 °c	90 s	
Končno podaljševanje	72 °c	10 min	1 cikel
	4 °c	∞	

Uspešnost reakcije smo preverili na agaroznem gelu, iz katerega smo izolirali DNA in s pomočjo nanodropa določili koncentracijo.

3.2.2.7 Kloniranje konstrukta v pENTR in transformacija v *E.coli*

Konstrukt, sestavljen iz izbranega promotorja in fluorescenčnega proteina, smo klonirali v plazmid pENTR. Reakcijo smo izvedli po prirejenih navodilih proizvajalca (TOPO® Cloning Procedure for Experienced Users, Invitrogen).

Količino PCR produkta, ki smo ga dodali v reakcijsko mešanico, smo izračunali s pomočjo programa In-Fusion Molar Ratio Calculator. Ta nam na podlagi izbranega razmerja med plazmidom pENTR (2580 bp) in konstruktom, ki ga želimo vnesti, ter njune velikosti (število baznih parov), določi maso oziroma volumen, ki ga dodamo v reakcijsko mešanico. Izbrano molarno razmerje med insertom in vektorjem je bilo 3:1. Za delo smo izbrali konstrukte iz preglednice 10.

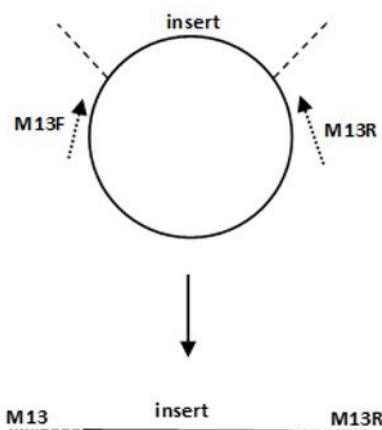
Preglednica 10: Reakcijska mešanica za kloniranje PCR produkta v plazmid pENTR

Konstrukt	Velikost konstrukta (bp)	PCR produkt (μl)	Raztopina soli (μl)	Voda (μl)	TOPO vektor (μl)
PR1b(Rywal.3)::mCherry	2220	1,3	1	2,7	1
PR1b(Desiree.1)::YFP	2320	1,2	1	2,8	1
TGA2(Rywal.1)::CFP	2220	2	1	4	1
TGA2(Rywal.1)::YFP	2220	2	1	4	1

Reakcijsko mešanico smo inkubirali 20 minut pri sobni temperaturi. Na ledu odtaljenim One Shot® kemijsko kompetentnim *E.coli* smo dodali 2 μl reakcijske mešanice in reakcijsko zmes še 30 minut inkubirali na ledu. Nato smo celice za 30 sekund izpostavili 42 °C in jim dodali 250 μl gojišča S.O.C. sobne temperature. Sledila je enourna inkubacija pri 37 °C in 250 vnm (vrtljajih na minuto). Na gojišče LB s spektinomycinom ($c = 75 \mu\text{g/ml}$) smo razmazali 50 oziroma 150 μl bakterijske kulture in jih pustili rasti preko noči na 37 °C

3.2.2.8 Verižna reakcija s polimerazo iz bakterijskih kolonij

S PCR reakcijo smo preverili, če izbrane bakterijske kolonije vsebujejo naš konstrukt. Za vsak konstrukt smo izbrali 6-8 kolonij. Pri reakciji smo uporabili polimerazo KAPA2G (Kapa biosystems) in začetna oligonukleotida M13F in M13R (Kapa biosystems), ki sta komplementarna koncema plazmida pENTR, med katerima je bil naš konstrukt in omogočata pomnoževanje inserta. Začetna oligonukleotida sta pri pomnoževanju na začetek in konec konstrukta dodala vsak po približno 150 bp (Sl.15).



Slika 15: Shema pomnoževanja z začetnima oligonukleotidoma M13

Pri pomnoževanju z začetnima oligonukleotidoma M13 se primerja vežeta približno 150 bp stran od terminalnih koncev plazmida, zato je PCR produkt za približno 300 bp daljši od dolžine inserta. Insert je označen z odebeljeno neprekinjeno črto, začetna oligonukleotida z, vmesni nukleotidna pa z -----.

Kot matrično DNA smo uporabili bakterijsko kulturo, ki smo jo resuspendirali v 50 μ l vode. 1 μ l vzorca razredčene bakterijske kolonije smo dodali 9 μ l reakcijske mešanice. Kot kontrolo smo uporabili reakcijsko mešanico brez vzorca DNA.

Preglednica 11: Reakcijska mešanica za PCR reakcijo za pomnoževanje iz plazmida pENTR

Reagent	Založna koncentracija	Končna koncentracija	μ l na reakcijo
Voda			4,54
Pufer B	5 X	1 X	2
dNTP mešanica	vsak 2,5 mM	vsak 0,25 mM	1
5' PCR začetni oligonukleotid (M13F)	10 μ M	700 nM	0,7
3' PCR začetni oligonukleotid (M13R)	10 μ M	700 nM	0,7
Polimeraza KAPA2G	5 U/ μ l	0,3 U	0,06
Matrična DNA			1
končni volumen			10

Preglednica 12: Program PCR reakcije za pomnoževanje iz plazmida pENTR

Korak	Temperatura	Čas	Ponovitev
Začetna denaturacija	95 °c	10 min	1 cikel
Denaturacija	95 °c	10 s	
Prileganje	54 °c	30 s	30 ciklov
Podaljševanje	72 °c	3 min	
Končno podaljševanje	72 °c	5 min	1 cikel
	4 °c	∞	

PCR produktu smo dodali 10 μ l nanašalnega pufra in uspešnost reakcije preverili na agaroznem gelu.

3.2.2.9 Prekonočne kulture

Bakterijske kolonije, ki so vsebovale naše konstrukte, smo nacepili v 5 ml tekočega LB gojišča s spektinomycinom ($c = 75 \mu\text{g/ml}$). Bakterije smo inkubirali preko noči pri 250 vnm in 37°C .

3.2.2.10 Trajne kulture

Iz prekonočnih kultur pripravili trajne kulture. 500 μ l prekonočne bakterijske kulture smo dodali 250 μ l sterilnega 80 % glicerola in zamrznili v tekočem dušiku. Vzorce smo shranili na -80°C .

3.2.2.11 Izolacija plazmida iz bakterij

Iz preostale prekonočne kulture smo izolirali plazmid po prirejenih navodilih proizvajalca s kompletom Plasmid isolation GenElut TM Plasmid Mini prep Kit proizvajalca Sigma. Pri tem smo tekočino za elucijo DNA iz kolone zamenjali za vodo brez nukleaz, kar je zahtevalo 10 minutno inkubacijo pri sobni temperaturi pred centrifugiranjem. Izoliranim plazmidom smo s pomočjo nanodropa določili koncentracijo in čistost.

3.2.2.12 Sekvenciranje

Sekvenciranje nam je omogočilo natančno določanje nukleotidnega zaporedja promotorjev PR1b, hkrati pa je služilo kot vmesno preverjanje pravilnega poteka kloniranja. Sekvenciranje je opravilo podjetje GATC. Vzorec za sekvenciranje je vseboval 5 μ l 5 μM začetnega oligonukleotida in 5 μ l plazmida ($c = 80\text{-}100 \text{ ng}/\mu\text{l}$) ali 5 μ l PCR produkta ($c = 20\text{-}60 \text{ ng}/\mu\text{l}$).

Vsak vzorec smo sekvencirali s 5' in 3' začetnim oligonukleotidom. Izbrana začetna oligonuklotida sta bila odvisna od konstrukta, ki smo ga sekvencirali. Vzorce v vstopnem vektorju pENTR oz. pCR8 smo sekvencirali z začetnim oligonukleotidom M13R oziroma M13F.

3.2.2.13 LR-reakcija

Z LR-reakcijo, ki je del sistema Gateway®, smo po navodilih proizvajalca Invitrogen prenesli konstrukt iz plazmida pENTR v ciljni plazmid pH7WG (PR1b) oziroma pK7WG (TGA2). Inkubacija reakcijske mešanice je namesto ene ure, kot je zapisano v navodilih proizvajalca, potekala preko noči.

3.2.2.14 Transformacija bakterije *E. coli*

Vektor z vstavljenim konstruktom smo transformirali v bakterijo *E. coli* TOP 10 (Invitrogen). Bakterijam smo dodali 1 µl LR-reakcijske mešanice in jih 30 minut inkubirali na ledu. Nato smo celice za 30 sekund izpostavili temperaturnemu šoku 42 °C, jim dodali 250 ml gojišča S.O.C. in jih inkubirali 1 uro pri 37 °C in 225 vnm. Na gojišče LB s spektinomycinom (c = 75 µg/ml) smo razmazali po 20 in 150 ul bakterijske mešanice. Bakterije so rasle preko noči pri 37°C. S PCR reakcijo iz bakterijskih kolonij smo preverili, če bakterije vsebujejo naš konstrukt.

Preglednica 13: Reakcijska mešanica za pomnoževanje iz ciljnega plazmida pH7WG ali pK7WG s PCR reakcijo

Reagent	Založna koncentracija	Končna koncentracija	µl na reakcijo
Voda			3,54
Pufer B	5 x	1 x	2
dNTP mešanica	vsak 2,5 mM	vsak 0,25 mM	1
5' PCR začetni oligonuklotid (PR1b_F_CACC/TGA_F_CACC)	10 µM	700 nM	0,7
3' PCR začetni oligonuklotid (D=mCherryR=YFP_R=CFP_R)	10 µM	700 nM	0,7
Polimeraza KAPA2G	5 U/µl	0,3 U	0,06
Matrična DNA			2
Končni volumen			10

Preglednica 14: Program PCR reakcije iz ciljnega plazmida pH7WG ali pK7WG

korak	temperatura	čas	ponovitev
Začetna denaturacija	95 °C	10 min	1 cikel
Denaturacija	95 °C	10 s	
Prileganje	62 °C	30 s	35 ciklov
Podaljševanje	72 °C	3 min	
Končno podaljševanje	72 °C	5 min	1 cikel
	4 °C	∞	

Iz bakterij, ki so vsebovale naše konstrukte, smo pripravili prekončne kulture, trajne kulture, izolirali plazmide, izmerili njihovo koncentracijo in jih sekvencirali z enakimi začetnimi oligonukleotidi, kot smo jih uporabili za PCR reakcijo.

3.2.2.15 Transformacija elektrokompetentnih bakterij *A. tumefaciens*

Pripravljen ciljni vektor smo z elektroporacijo vnesli v bakterijo *Agrobacterium tumefaciens*. Za transformacijo smo uporabili dva seva agrobakterije: sev GV3101 (za prehodno transformacijo *Nicotiana benthamiana*) in sev LBA4404 (za stabilno transformacijo krompirja).

Bakterijam *Agrobacterium tumefaciens* smo dodali 100 ng izbranega plazmida. Bakterije smo odpipetirali v ohlajeno 0,1 cm kiveto in elektroporirali pri napetosti 2000 V. V kiveto smo dodali 1 ml YM gojišča sobne temperature in bakterijsko suspenzijo tri ure inkubirali pri 225 vnm in 30 °C. Po transformaciji smo razmazali po 10 µl, 30 µl in 100 µl bakterijske suspenzije na gojišče YM z rifampicinom (c = 20 µg/ml) in spektinomycinom (c = 75 µg/ml) ter jih pustili rasti dva dni pri 30 °C.

3.2.2.16 Verižna reakcija s polimerazo iz kolonij agrobakterij

S PCR reakcijo iz bakterijskih kolonij smo preverili, ali izbrane bakterije vsebujejo naš konstrukt. Pri tem je vzorec DNA zahteval posebno pripravo. Kolonijo smo resuspendirali v 20 µl vode, ji dodali 4 µl 1 M NaOH in raztopino 5 minut inkubirali pri 37 °C. Po centrifugiranju smo kot matrično DNA za PCR reakcijo uporabili 2 µl supernatanta.

Preglednica 15: Reakcijska mešanica za reakcijo PCR iz agrobakterije

Reagent	Založna koncentracija	Končna koncentracija	µl na reakcijo
Voda			3,54
Pufer B	5 x	1 x	2
dNTP mešanica	vsak 2,5 mM	vsak 0,25 mM	1
5' PCR začetni oligonukleotid (PR1b_F_CACC/TGA_F_CACC)	10 µM	700 nM	0,7
3' PCR začetni oligonukleotid (D=MCHERRYR=YFP_R=CFP_R)	10 µM	700 nM	0,7
Polimeraza KAPA2G	5 u/µl	0,3 u	0,06
Matrična DNA			2
Končni volumen			10

Preglednica 16: Program PCR reakcije za pomnoževanje iz agrobakterije

korak	temperatura	čas	ponovitev
Začetna denaturacija	95 °C	10 min	1 cikel
Denaturacija	95 °C	10 s	
Prileganje	62 °C	30 s	35 ciklov
Podaljševanje	72 °C	3 min	
Končno podaljševanje	72 °C	5 min	1 cikel
	4 °C	∞	

Uspešnost PCR smo preverili na gelu in iz bakterij, ki so vsebovale naš konstrukt, pripravili prekonočne kulture. Naslednji dan smo iz njih pripravili trajne kulture.

3.2.3 Transformacija rastlin

Bakterija *A. tumefaciens* vsebuje Ti-plazmid, na katerem so vir geni in T-DNA. Poškodovane rastlinske celice izločajo snovi, ki sprožijo indukcijo vir genov. Sintetizirani vir proteini omogočajo izrez T-DNA iz Ti-plazmida in njen transport v jedro rastlinske celice. V rastlini se T-DNA integrira v rastlinski genom in začnejo se izražati geni, ki so zapisani znotraj T-DNA (Stachel in sod., 1986).

Transformacija z agrobakterijo je danes ena najpogostejših metod rastlinskega genskega inženiringa, pri čemer T-DNA zamenjajo z željenim konstruktom ali transgenom (Chung in sod., 2006). Bakterije lahko uporabimo za stabilno transformacijo, pri kateri transgen postane del stalnega rastlinskega genoma (Stachel in sod., 1986), ali prehodno transformacijo, kjer lahko nekaj dni po infiltraciji spremljamo prehodno izražanje transgena v infiltriranih tkivnih (Jones in sod., 2009).

3.2.3.1 Prehodna transformacija rastlin

3.2.3.1.1 Agroinfiltracija

Delo je potekalo sterilno. Opremo, ki smo jo potrebovali za transformacijo, smo avtoklavirali (sita, papir, filter papir, kozarci, erlenmajerice, ...) oziroma obžgali (pincete, skalpeli).

- Dan 1

Poleg pripravljenih bakterijskih kultur smo kot kontrolo agroinfiltracije uporabili na NIB-u pripravljeno trajno kulturo agrobakterij z vstavljenim genom za rdeči fluorescenčni protein (angl. red fluorescent protein, RFP).

Preglednica 17: Konstrukti uporabljeni pri agroinfiltraciji

Konstrukt	Plazmid	Sev	Selekcija
TGA2(Rywal.1)::YFP	pK7WG	GV3101	Spektinomycin (c = 75 µg/ml)
PR1b(Desiree.1)::YFP	pH7WG	GV3101	Spektinomycin (c = 75 µg/ml)
Rdeči označevalec jedra (RFP)		GV3101	Kanamycin (c = 50 µg/ml)

Bakterije iz trajne kulture smo nacepili v 5 ml gojišča LB z rifampicinom (c = 20 µg/ml) in ustrezno selekcijo (Pregl. 17) ter jih inkubirali preko noči na 30°C in 225 vnm.

- Dan 2

Prekonočno kulturo smo redčili v 50 ml gojišča LB z rifampicinom in ustrezno selekcijo (Pregl. 17) do vrednosti OD (angl. optical density) 0,1 ter jo pustili rasti, dokler OD ni dosegla vrednost 0,5. Bakterijsko kulturo smo centrifugirali pri 4°C in 4000 vnm. Celice smo resuspendirali v 10 ml gojišča LB in jih pustili 30 min na ledu. Po centrifugiranju smo jih resuspendirali v tolikšnem volumnu 0,2 mM acetosiringona (Aldrich), da so imele vse bakterijske kulture vrednost OD približno 0,7. Bakterijsko suspenzijo oziroma njihove mešanice smo z brizgo infiltrirali v liste rastline *Nicotiana benthamiana*.

3.2.3.1.2 Tretiranje s hormoni

Po 3 dneh smo agroinfiltrirane liste izpostavili različnim hormonom. Vsak hormon je imel svojo kontrolo.

Liste smo poškopili z 0,3 mM ali 1 mM 2,6-dikloroizonikotinsko kislino (angl. 2,6-dichloroisonicotinic acid, INA) (Aldrich), ki smo jo pripravili z raztapljanjem v 1 % etanolu. Kot kontrolo delovanja INA smo zato uporabili 1 % etanol.

V primeru hlapnih oziroma plinskih hormonov smo rastlino z njimi tretirali v komorah iz pleksistekla. Pri tretiranju z etilenom smo z njim zamenjali celotni volumen zraka v komori. Pri tretiranju z metil-jasmonske kisline (MeJA) pa smo na filterpapir v komori z normalno atmosfero kapnili 3 µl MeJA. Kot kontrolo smo eno rastlino za 24 ur zaprli v komoro z normalno atmosfero.

Po tretiranju smo izražanje promotorjev v različnem času opazovali pod konfokalnim mikroskopom.

Preglednica 18: Poskusi agroinfiltracije

	Agrobakterija s konstruktom	Tretiranje	Kontrola tretiranja	Čas opazovanja po tretiranju(h)
Poskus 1	TGA2(Rywal.1)::YFP + RFP	0,3 mM INA	1 % etanol	24
Poskus 2	PR1b(Desiree.1)::YFP + RFP	0,3 mM INA	1 % etanol	0,27,48
		1 mM INA	1 % etanol	0,27,48
Poskus 3	PR1b(Desiree.1)::YFP + RFP	Etilen	Neinfiltriran list	24,48
		Jasmonska kislina	Neinfiltriran list	24,48

3.2.3.1.3 Opazovanje pod konfokalno lupo

Agroinfiltriran list smo sploščili med pokrovom in dnom petrijevke. Delo s konfokalnim mikroskopom je potekalo na laserskem konfokalnem mikroskopu Leica TCS LSI, povezanim z Leica Z6 APOA in objektivom PLAN APO 5.0X/0.50 LWL. Slike smo obdelali s programom Leica LAS X (Leica Microsystems).

Preglednica 19: Pogoji za opazovanje markerjev s konfokalno lupo

Marker	Vzbujanje z laserjem (nm)	Emisija (nm)	Barvni spekter
Protein mCherry	532	570-630	rdeči
Protein YFP	488	525-550	rumeni
Protein RFP	532	570-630	rdeči
klorofil	488	690-750	zeleni

3.2.3.2 Stabilna transformacija rastlin

3.2.3.2.1 Stabilna transformacija kultivarja Rywal

Delo je potekalo sterilno. Opremo, ki smo jo potrebovali za transformacijo, smo avtoklavirali (sita, papir, filter papir, kozarci, erlenmajerice, ...) oziroma obžgali (pincete, skalpeli).

- Dan 1

Izbrano trajno kulturo (Pregl. 20) smo nacepili v 5 ml YEB s gojišča z rifampicinom ($c = 20 \mu\text{g/ml}$) in spektinomycinom ($c = 75 \mu\text{g/ml}$). Bakterije smo pustili rasti preko noči pri $30 \text{ }^\circ\text{C}$ in 225 vnm.

- Dan 2

Zjutraj smo v 50 ml gojišču YEB z rifampicinom ($c = 20 \mu\text{g/ml}$) in spektinomycinom ($c = 75 \mu\text{g/ml}$) nacepili 1 ml oziroma 2 ml prekonočne bakterijske kulture. Volumen bakterijske kulture smo spreminjali glede na rast celic in pri slabši rasti bakterij v gojišče inokulirali več bakterijske kulture. Bakterije so rasle pri enakih pogojih kot prejšnji dan.

Popoldan smo izmerili vrednost OD bakterijske kulture in različne volumne nacepili v erlenmajerice s 50 ml gojišču YEB z rifampicinom in spektinomycinom. Bakterije so rasle pri enakih pogojih kot prej.

- Dan 3

Pripravili smo 11 petrijevok z gojiščem MS30. Bakterijsko kulturo z vrednostjo OD med 0,4 in 0,7 smo centrifugirali in celice resuspendirali v 1200 μl gojišču YEB (brez selekcij). Na 10 petrijevok smo razmazali po 100 μl bakterijske kulture. Eno petrijevko smo pustili brez bakterij, ta nam je služila kot kontrola.

Na sterilnem papirju smo razrezali rastline na nekaj milimetrov velike internodije in liste, na katerih smo naredili do 8 zarez. Zareze smo naredili tudi na večjih internodijah.

Izsečke (internodije in liste) smo prenesli na petrijevke. Liste smo položili na gojišče z zgornjo stranjo navzdol. Petrijevke smo za 2 dni postavili v temo na sobni temperaturi.

- Dan 5

Pripravili smo petrijevke z gojiščem MCI s selekcijo in dve brez selekcije. Na vsako petrijevko z gojiščem MCI s selekcijo smo prenesli 20 izsečkov iz petrijevok okuženih z bakterijami. Petrijevke smo zaprli s parafilmom in postavili v rastno komoro.

Kontrole (vsaka 20 izsečkov):

- pozitivna kontrola: brez bakterij (netransformirani izsečki za kontrolo), brez selekcije;
- negativna kontrola: brez bakterij (netransformirani izsečki za kontrolo), s selekcijo;
- pozitivna kontrola: z bakterijami (transformirani izsečki), brez selekcije.

- Dan 15

Izsečke smo prenesli na petrijevke s svežim gojiščem GR2 in to ponavljali vsakih 14 dni, dokler niso zrasli poganjki.

Transgene poganjke smo porezali in jih predstavili v banjico z gojiščem MS15 s selekcijo. V eno banjico smo predstavili največ 10 poganjkov.

Preglednica 20: Poskusi stabilne transformacije na sorti Rywal

	Konstrukt	Plazmid	Sev	Selekcija za bakterije	Selekcija za rastline	Selekcija v banjicah
1. Poskus	PR1b(Desiree.1)::YFP	pH7WG	LBA4404	Spektinomycin c = 75 µg/ml	Higromicin; c = 20 mg/l	/
2. Poskus	PR1b(Desiree.1)::YFP	pH7WG	LBA4404	Spektinomycin c = 75 µg/ml	Higromicin; c ₁ = 4 in c ₂ = 15 mg/l	/
3. Poskus	TGA2(Rywal.1)::YFP	pK7WG	LBA4404	Spektinomycin c = 75 µg/ml	Kanamycin; c ₁ = 4 in c ₂ = 15 mg/l	Kanamycin; c = 50 mg/l

3.2.3.2.2 Stabilna transformacija kultivarja Désirée

Delo je potekalo sterilno. Opremo, ki smo jo potrebovali za transformacijo, smo avtoklavirali (sita, papir, filter papir, kozarci, erlenmajerice, ...) oziroma obžgali (pincete, skalpeli).

- Dan 1

Izbrano trajno kulturo (Pregl. 21) smo nacepili v 5 ml YEB s gojišča z rifampicinom (c = 20 µg/ml) in spektinomycinom (c = 75 µg/ml). Bakterije smo pustili rasti preko noči pri 30 °C in 225 vnm.

- Dan 2

a) Zjutraj smo v 50 ml gojišča YEB z rifampicinom (c = 20 µg/ml) in spektinomycinom (c = 75 µg/ml) nacepili 1 ml oziroma 2 ml prekonočne bakterijske kulture. Volumen bakterijske kulture smo spreminjali glede na rast celic in pri slabši rasti bakterij v gojišče inokulirali več bakterijske kulture. Bakterije so rasle pri enakih pogojih kot prejšnji dan.

Popoldan smo izmerili vrednost OD bakterijske kulture in različne volumne nacepili v erlenmajerice s 50 ml gojišča YEB z rifampicinom in spektinomycinom. Bakterije so rasle pri enakih pogojih kot prej.

b) Na sterilnem papirju smo razrezali rastline, na nekaj milimetrov velike internodije. Narezane izsečke smo prestavili na petrijevke z R3B gojiščem, na katere smo predhodno položili dva filter papirja in ju navlažili z 2 ml gojišča PACM.

Na dve petrijevki, ki sta služili za kontrolo, smo prenesli 20 izsečkov. Na preostalih pet petrijevki pa smo prenesli približno 60 izsečkov. Petrijevke smo zaprli s parafilmom in jih postavili v rastno komoro.

- Dan 3

Izmerili smo vrednost OD bakterijske kulture. Za nadaljnje delo smo izbrani bakterijsko kulturo z vrednostjo OD med 0,4 in 0,7. Bakterijsko kulturo smo centrifugirali 10 min pri 2500 vnm in celice resuspendirali v 75 ml gojišča LB (brez selekcij). Bakterijsko kulturo smo razdelili v tri petrijevke.

V petrijevko s bakterijsko kulturo smo prenesli zgornji filter papir z izsečki. Čas namakanja izsečkov v bakterijski kulturi namakali je opisan v Tabeli 18. Izsečke smo precedili skozi cedilo, jih osušili na filter papirju in prenesli nazaj na petrijevke s filter papirjem, ki smo jih zaprli s parafilmom ter postavili v rastno komoro. Izsečkov iz kontrolnih petrijevk nismo namakali v bakterijski kulturi in smo jih pustili na ploščah.

- Dan 5

Pripravili smo petrijevke z gojiščem Zcv s selekcijo in dve brez selekcije. Na vsako petrijevko z gojiščem Zcv s selekcijo smo prenesli 20 izsečkov iz petrijevk, okuženih z bakterijami. Petrijevke smo zaprli s parafilmom in postavili v rastno komoro.

Kontrole:

- pozitivna kontrola: brez bakterij (netransformirani izsečki za kontrolo), brez selekcije;
- negativna kontrola: brez bakterij (netransformirani izsečki za kontrolo), s selekcijo;
- pozitivna kontrola: z bakterijam (transformirani izsečki), brez selekcije.

- Dan 15

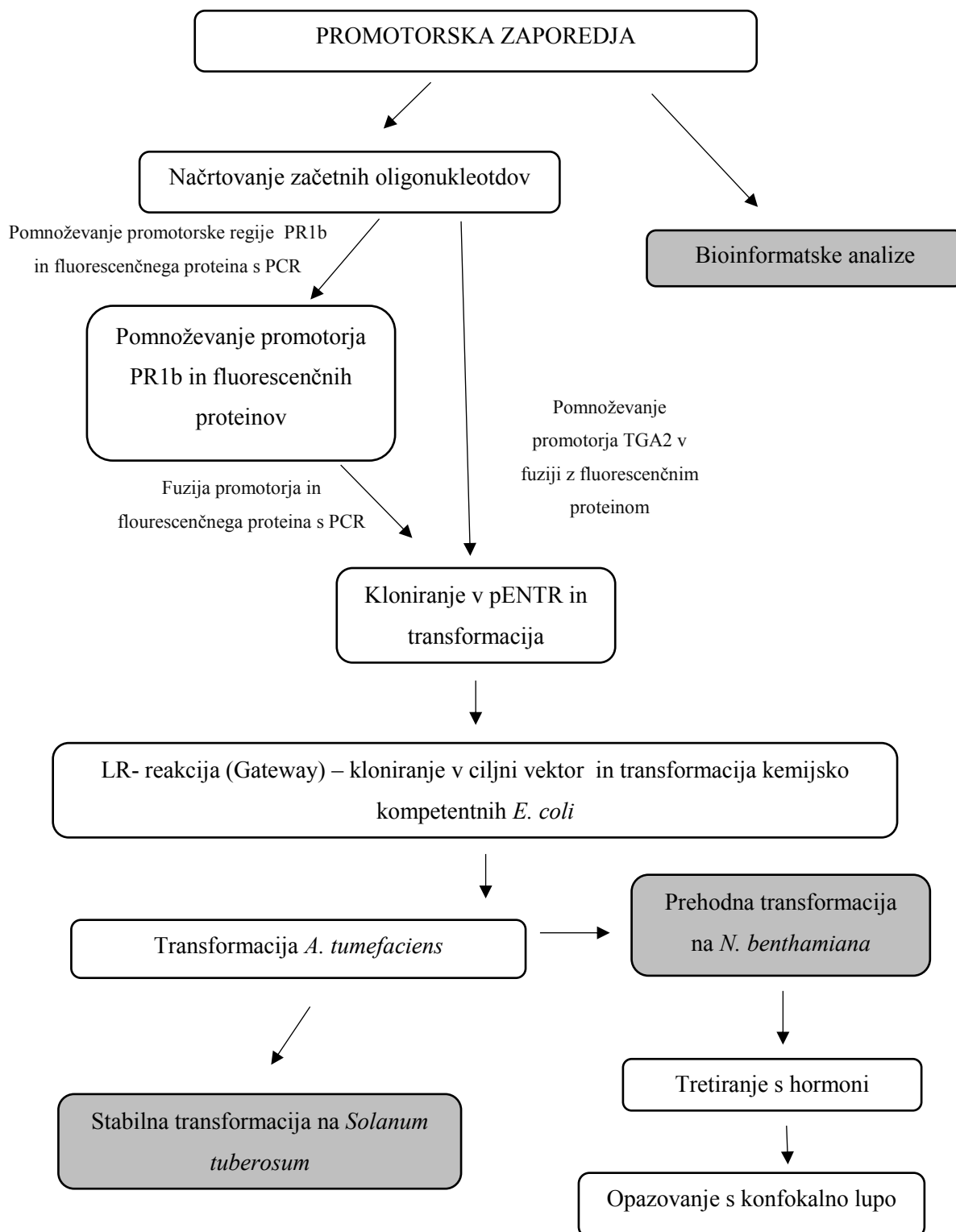
Izsečke smo prenesli na petrijevke s svežim gojiščem Zcv in to ponavljali vsakih 14 dni, dokler niso zrasli poganjki.

Transgene poganjke smo porezali in jih prestavili v banjico z gojiščem MS15 s selekcijo. V eno banjico smo prestavili največ 10 poganjkov.

Preglednica 21: Poskusi stabilne transformacije na sorti Désirée

Konstrukti	Plazmid	Sev	Selekcija za bakterije	Namakanje izsečkov (min)	Selekcija za rastline	Opombe	Selekcija v banjicah
1. poskus	TGA2(Rywal.1)::YFP	pK7WG LBA4404	Spektinomycin c = 75 ul/ml	7	Kanamycin; c = 100 mg/l		Kanamycin; c = 100 mg/l
2. poskus	TGA2(Rywal.1)::CFP	pK7WG LBA4404	Spektinomycin c = 75 ul/ml	5 in 10	Kanamycin; c ₁ = 20 in c ₂ = 100 mg/l	Izsečke (5 min) smo prestavili na ploščo s c ₁ in c ₂ . Izsečke (10 min) smo prestavili na ploščo s c ₁ in c ₂ . Vzdolžno prerezne izsečke (10 min) smo prestavili na ploščo s c ₁ in c ₂ .	Kanamycin; c = 100 mg/l
3. poskus	PR1b(Desiree.1)::YFP	pH7WG LBA4404	Spektinomycin c = 75 ul/ml	5 in 10	Higromicin; c ₁ = 4 in c ₂ = 20 mg/l	Izsečke (5 min) smo prestavili na ploščo s c ₁ in c ₂ . Izsečke (10 min) smo prestavili na ploščo s c ₁ in c ₂ .	/

4 REZULTATI



Slika 16: Shematski prikaz poteka dela

4.1 BIOINFORMATSKE ANALIZE PROMOTORJA GENA PR1B

4.1.1 Poravnave nukleotidnih zaporedij izbranih promotorjev

Promotorska zaporedja PR1b iz genotipov PW363, Désirée in Rywal so bila v okviru doktorskega dela Tjaše Lukan pomnožena na podlagi znanega genoma divjega krompirja *Solanum tuberosum* iz skupine Phureja. Vsak genotip je bil pomnožen trikrat (Pril. A). Za točno določanje nukleotidnega zaporedja smo promotorska zaporedja sekvencirali s promotorjema (Sl. 13, 14), ki si prilegata na sredino zaporedja in omogočata sekvenciranje proti 5' in 3' koncu zaporedja. Iz zaporedja, ki je bilo dvakrat sekvencirano smo dobili točno nukleotidno zaporedje.

Dobljena nukleotidna zaporedja smo med seboj poravnali z računalniškim programom za prileganje nukleotidnih zaporedij AlignX.

		Section 1						
		(1)	10	20	30	40	50	
PR1b_(PW.1)	(1)	AAATAG	AAAGTCAAGAAAAA	CTCTCCAAATAC	GTGATGGACAGGAAAT			
PR1b_(PW.2)	(1)	AAATAG	AAAGTCAAGAAAAA	CTCTCCAAATAC	GTGATGGACAGGAAAT			
PR1b_(PW.3)	(1)	AAATAG	AAAGTCAAGAAAAA	CTCTCCAAATAC	GTGATGGACAGGAAAT			
PR1b_(Desiree.1)	(1)	AAATAG	AAAGTCAAGAAAAA	CTCTCCAAATAC	GTGATGGACAGGAAAT			
PR1b_(Desiree.2)	(1)	AAATAG	AAAGTCAAGAAAAA	CTCTCCAAATAC	GTGATGGACAGGAAAT			
PR1b_(Desiree.3)	(1)	AAATAG	AAAGTCAAGAAAAA	CTCTCCAAATAC	GTGATGGACAGGAAAT			
PR1b_(Rywal.1)	(1)	AAATAG	AAAGTCAAGAAAAA	CTCTCCAAATAC	GTGATGGACAGGAAAT			
PR1b_(Rywal.2)	(1)	AAATAG	AAAGTCAAGAAAAA	CTCTCCAAATAC	GTGATGGACAGGAAAT			
PR1b_(Rywal.3)	(1)	AAATAG	AAAGTCAAGAAAAA	CTCTCCAAATAC	GTGATGGACAGGAAAT			
		Section 2						
		(51)	60	70	80	90	100	
PR1b_(PW.1)	(50)	TCCACGCAGCGGTGAC	CAGTGGCAGAACCATG	ATTTTCAATRAAG	GGGGT			
PR1b_(PW.2)	(49)	TCCACGCAGCGGTGAC	CAGTGGCAGAACCATG	ATTTTCAATRAAG	GGGGT			
PR1b_(PW.3)	(50)	TCCACGCAGCGGTGAC	CAGTGGCAGAACCATG	ATTTTCAATRAAG	GGGGT			
PR1b_(Desiree.1)	(50)	TCCACGCAGCGGTGAC	CAGTGGCAGAACCATG	ATTTTCAATRAAG	GGGGT			
PR1b_(Desiree.2)	(50)	TCCACGCAGCGGTGAC	CAGTGGCAGAACCATG	ATTTTCAATRAAG	GGGGT			
PR1b_(Desiree.3)	(50)	TCCACGCAGCGGTGAC	CAGTGGCAGAACCATG	ATTTTCAATRAAG	GGGGT			
PR1b_(Rywal.1)	(50)	TCCACGCAGCGGTGAC	CAGTGGCAGAACCATG	ATTTTCAATRAAG	GGGGT			
PR1b_(Rywal.2)	(50)	TCCACGCAGCGGTGAC	CAGTGGCAGAACCATG	ATTTTCAATRAAG	GGGGT			
PR1b_(Rywal.3)	(50)	TCCACGCAGCGGTGAC	CAGTGGCAGAACCATG	ATTTTCAATRAAG	GGGGT			
		Section 3						
		(101)	101	110	120	130	140	150
PR1b_(PW.1)	(100)	CAAAATCTGAA	GGATTAAACATACGAACTAG	TCGAAAGGGGG	TTTCGAGA			
PR1b_(PW.2)	(99)	CAAAATCTGAA	GGATTAAACATACGAACTAG	TCGAAAGGGGG	TTTCGAGA			
PR1b_(PW.3)	(100)	CAAAATCTGAA	GGATTAAACATACGAACTAG	TCGAAAGGGGG	TTTCGAGA			
PR1b_(Desiree.1)	(100)	CAAAATCTGAA	GGATTAAACATACGAACTAG	TCGAAAGGGGG	TTTCGAGA			
PR1b_(Desiree.2)	(100)	CAAAATCTGAA	GGATTAAACATACGAACTAG	TCGAAAGGGGG	TTTCGAGA			
PR1b_(Desiree.3)	(100)	CAAAATCTGAA	GGATTAAACATACGAACTAG	TCGAAAGGGGG	TTTCGAGA			
PR1b_(Rywal.1)	(100)	CAAAATC	---GTGTCCCGCCACCGATTAT	---AATGTCT	---CGAGA			
PR1b_(Rywal.2)	(100)	CAAAATC	---GTGTCCCGCCACCGATTAT	---AATGTCT	---CGAGA			
PR1b_(Rywal.3)	(100)	CAAAATC	---GTGTCCCGCCACCGATTAT	---AATGTCT	---CGAGA			
		Section 4						
		(151)	151	160	170	180	190	200
PR1b_(PW.1)	(148)	TCTATTATATACAT	CTAAAAAATAATTTTAA	CCATGTATATATAGTAATA				
PR1b_(PW.2)	(147)	TCTATTATATACAT	CTAAAAAATAATTTTAA	CCATGTATATATAGTAATA				
PR1b_(PW.3)	(148)	TCTATTATATACAT	CTAAAAAATAATTTTAA	CCATGTATATATAGTAATA				
PR1b_(Desiree.1)	(148)	TCTATTATATACAT	CTAAAAAATAATTTTAA	CCATGTATATATAGTAATA				
PR1b_(Desiree.2)	(148)	TCTATTATATACAT	CTAAAAAATAATTTTAA	CCATGTATATATAGTAATA				
PR1b_(Desiree.3)	(148)	TCTATTATATACAT	CTAAAAAATAATTTTAA	CCATGTATATATAGTAATA				
PR1b_(Rywal.1)	(140)	TCCG	---ATACGACGAAAGCTT	---TTTCAGAGGATTAAACATACGAAAC				
PR1b_(Rywal.2)	(140)	TCCG	---ATACGACGAAAGCTT	---TTTCAGAGGATTAAACATACGAAAC				
PR1b_(Rywal.3)	(150)	TCTATTATATACAT	CTAAAAAATAATTTTAA	CCATGTATATATAGTAATA				

Se nadaljuje

Nadaljevanje slike 17: Poravnava nukleotidnih zaporedij promotorjev PR1b iz genotipov PW363, Rywal in Désirée

		Section 5					
	(201)	201	210	220	230	240	250
PR1b_(PW.1)	(198)	TTTTCCGTCGAAAGGGTTT	TGGATGAAACCCCTAAAGACAT	TGCTGGCTCCT			
PR1b_(PW.2)	(197)	TTTTCCGTCGAAAGGGTTT	TGGATGAAACCCCTAAAGACAT	TGCTGGCTCCT			
PR1b_(PW.3)	(198)	TTTTCCGTCGAAAGGGTTT	TGGATGAAACCCCTAAAGACAT	TGCTGGCTCCT			
PR1b_(Desiree.1)	(198)	TTTTCCGTCGAAAGGGTTT	TGGATGAAACCCCTAAAGACAT	TGCTGGCTCCT			
PR1b_(Desiree.2)	(198)	TTTTCCGTCGAAAGGGTTT	TGGATGAAACCCCTAAAGACAT	TGCTGGCTCCT			
PR1b_(Desiree.3)	(198)	TTTTCCGTCGAAAGGGTTT	TGGATGAAACCCCTAAAGACAT	TGCTGGCTCCT			
PR1b_(Rywal.1)	(183)	---TAGTCGAAAGGGGGTTCGA	-----				
PR1b_(Rywal.2)	(183)	---TAGTCGAAAGGGGGTTCGA	-----				
PR1b_(Rywal.3)	(200)	TTTTCCGTCGAAAGGGGGTTCGA	TGAAACCCCTAAAGACAT	TGCTGGCTCCT			
		Section 6					
	(251)	251	260	270	280	290	300
PR1b_(PW.1)	(248)	CCCTGGCGGTGACCTATT	-----	AAAACTTTAATCGAAAAAT	TATAC	TTTATA	
PR1b_(PW.2)	(247)	CCCTGGCGGTGACCTATT	-----	AAAACTTTAATCGAAAAAT	TATAC	TTTATA	
PR1b_(PW.3)	(248)	CCCTGGCGGTGACCTATT	-----	AAAACTTTAATCGAAAAAT	TATAC	TTTATA	
PR1b_(Desiree.1)	(248)	CCCTGGCGGTGACCTATT	-----	AAAACTTTAATCGAAAAAT	TATAC	TTTATA	
PR1b_(Desiree.2)	(248)	CCCTGGCGGTGACCTATT	-----	AAAACTTTAATCGAAAAAT	TATAC	TTTATA	
PR1b_(Desiree.3)	(248)	CCCTGGCGGTGACCTATT	-----	AAAACTTTAATCGAAAAAT	TATAC	TTTATA	
PR1b_(Rywal.1)	(202)	-CAT--C-----TATT	-----	-----	-ATAC	-----	-A
PR1b_(Rywal.2)	(202)	-CAT--C-----TATT	-----	-----	-ATAC	-----	-A
PR1b_(Rywal.3)	(250)	CCCTGGCGGTGACCTATT	-----	AAAACTTTAATCGAAAAAT	TATAC	TTTATA	
		Section 7					
	(301)	301	310	320	330	340	350
PR1b_(PW.1)	(297)	TGTAAAAATATATATGAAGTACATTCGGTCAGGAACACTAC	TTAGGTGCA				
PR1b_(PW.2)	(296)	TGTAAAAATATATATGAAGTACATTCGGTCAGGAACACTAC	TTAGGTGCA				
PR1b_(PW.3)	(297)	TGTAAAAATATATATGAAGTACATTCGGTCAGGAACACTAC	TTAGGTGCA				
PR1b_(Desiree.1)	(297)	TGTAAAAATATATATGAAGTACATTCGGTCAGGAACACTAC	TTAGGTGCA				
PR1b_(Desiree.2)	(297)	TGTAAAAATATATATGAAGTACATTCGGTCAGGAACACTAC	TTAGGTGCA				
PR1b_(Desiree.3)	(297)	TGTAAAAATATATATGAAGTACATTCGGTCAGGAACACTAC	TTAGGTGCA				
PR1b_(Rywal.1)	(217)	TTTAAAAAATAATTTTAA	-----	C-----	CA-----	-----	-TGTATA
PR1b_(Rywal.2)	(217)	TTTAAAAAATAATTTTAA	-----	C-----	CA-----	-----	-TGTATA
PR1b_(Rywal.3)	(300)	TGTAAAAATATATATGAAGTACATTCGGTCAGGAACACTAC	TTAGGTGCA				
		Section 8					
	(351)	351	360	370	380	390	400
PR1b_(PW.1)	(347)	TATAATTAATTAAGCATATCAAATTTATTTATCTCTATTTAATACTTATTT					
PR1b_(PW.2)	(346)	TATAATTAATTAAGCATATCAAATTTATTTATCTCTATTTAATACTTATTT					
PR1b_(PW.3)	(347)	TATAATTAATTAAGCATATCAAATTTATTTATCTCTATTTAATACTTATTT					
PR1b_(Desiree.1)	(347)	TATAATTAATTAAGCATATCAAATTTATTTATCTCTATTTAATACTTATTT					
PR1b_(Desiree.2)	(347)	TATAATTAATTAAGCATATCAAATTTATTTATCTCTATTTAATACTTATTT					
PR1b_(Desiree.3)	(347)	TATAATTAATTAAGCATATCAAATTTATTTATCTCTATTTAATACTTATTT					
PR1b_(Rywal.1)	(244)	TATAGTAAAT-----A--TCAAATTTATTTATCTCTATTTAATACTTATTT					
PR1b_(Rywal.2)	(244)	TATAGTAAAT-----A--TCAAATTTATTTATCTCTATTTAATACTTATTT					
PR1b_(Rywal.3)	(350)	TATAATTAATTAAGCATATCAAATTTATTTATCTCTATTTAATACTTATTT					
		Section 9					
	(401)	401	410	420	430	440	450
PR1b_(PW.1)	(397)	AAACATGTAACATTTTATTCGTAATTCAACTTCAACCCCTAAAAACGGTT					
PR1b_(PW.2)	(396)	AAACATGTAACATTTTATTCGTAATTCAACTTCAACCCCTAAAAACGGTT					
PR1b_(PW.3)	(397)	AAACATGTAACATTTTATTCGTAATTCAACTTCAACCCCTAAAAACGGTT					
PR1b_(Desiree.1)	(397)	AAACATGTAACATTTTATTCGTAATTCAACTTCAACCCCTAAAAACGGTT					
PR1b_(Desiree.2)	(397)	AAACATGTAACATTTTATTCGTAATTCAACTTCAACCCCTAAAAACGGTT					
PR1b_(Desiree.3)	(397)	AAACATGTAACATTTTATTCGTAATTCAACTTCAACCCCTAAAAACGGTT					
PR1b_(Rywal.1)	(287)	AAACATGTAACATTTTATTCGTAATTCAACTTCAACCCCTAAAAACGGTT					
PR1b_(Rywal.2)	(287)	AAACATGTAACATTTTATTCGTAATTCAACTTCAACCCCTAAAAACGGTT					
PR1b_(Rywal.3)	(400)	AAACATGTAACATTTTATTCGTAATTCAACTTCAACCCCTAAAAACGGTT					
		Section 10					
	(451)	451	460	470	480	490	500
PR1b_(PW.1)	(447)	TTAAAAATTAATAATTTTCATACGAAAGCTGCCAGGATGTGAGGCAGTTAA					
PR1b_(PW.2)	(446)	TTAAAAATTAATAATTTTCATACGAAAGCTGCCAGGATGTGAGGCAGTTAA					
PR1b_(PW.3)	(447)	TTAAAAATTAATAATTTTCATACGAAAGCTGCCAGGATGTGAGGCAGTTAA					
PR1b_(Desiree.1)	(447)	TTAAAAATTAATAATTTTCATACGAAAGCTGCCAGGATGTGAGGCAGTTAA					
PR1b_(Desiree.2)	(447)	TTAAAAATTAATAATTTTCATACGAAAGCTGCCAGGATGTGAGGCAGTTAA					
PR1b_(Desiree.3)	(447)	TTAAAAATTAATAATTTTCATACGAAAGCTGCCAGGATGTGAGGCAGTTAA					
PR1b_(Rywal.1)	(337)	TTAAAAATTAATAATTTTCATACGAAAGCTGCCAGGATGTGAGGCAGTTAA					
PR1b_(Rywal.2)	(337)	TTAAAAATTAATAATTTTCATACGAAAGCTGCCAGGATGTGAGGCAGTTAA					
PR1b_(Rywal.3)	(450)	TTAAAAATTAATAATTTTCATACGAAAGCTGCCAGGATGTGAGGCAGTTAA					
		Section 11					
	(501)	501	510	520	530	540	550
PR1b_(PW.1)	(497)	TTCTACAGAAAGGACCAAAATTTTTCCTGGTTTATGTGTCCATCACTT					
PR1b_(PW.2)	(496)	TTCTACAGAAAGGACCAAAATTTTTCCTGGTTTATGTGTCCATCACTT					
PR1b_(PW.3)	(497)	TTCTACAGAAAGGACCAAAATTTTTCCTGGTTTATGTGTCCATCACTT					
PR1b_(Desiree.1)	(497)	TTCTACAGAAAGGACCAAAATTTTTCCTGGTTTATGTGTCCATCACTT					
PR1b_(Desiree.2)	(497)	TTCTACAGAAAGGACCAAAATTTTTCCTGGTTTATGTGTCCATCACTT					
PR1b_(Desiree.3)	(497)	TTCTACAGAAAGGACCAAAATTTTTCCTGGTTTATGTGTCCATCACTT					
PR1b_(Rywal.1)	(387)	TTCTACAGAAAGGACCAAAATTTTTCCTGGTTTATGTGTCCATCACTT					
PR1b_(Rywal.2)	(387)	TTCTACAGAAAGGACCAAAATTTTTCCTGGTTTATGTGTCCATCACTT					
PR1b_(Rywal.3)	(500)	TATCTACAGAAAGGACCAAAATTTTTCCTGGTTTATGTGTCCATCACTT					
		Section 12					
	(551)	551	560	570	580	590	600
PR1b_(PW.1)	(547)	TGTTTATTTTTGTTTTTCATTTATTTCAAATTCCTTCAATGCTAACAA					
PR1b_(PW.2)	(546)	TGTTTATTTTTGTTTTTCATTTATTTCAAATTCCTTCAATGCTAACAA					
PR1b_(PW.3)	(547)	TGTTTATTTTTGTTTTTCATTTATTTCAAATTCCTTCAATGCTAACAA					
PR1b_(Desiree.1)	(547)	TGTTTATTTTTGTTTTTCATTTATTTCAAATTCCTTCAATGCTAACAA					
PR1b_(Desiree.2)	(547)	TGTTTATTTTTGTTTTTCATTTATTTCAAATTCCTTCAATGCTAACAA					
PR1b_(Desiree.3)	(547)	TGTTTATTTTTGTTTTTCATTTATTTCAAATTCCTTCAATGCTAACAA					
PR1b_(Rywal.1)	(437)	TGTTTATTTTTGTTTTTCATTTATTTCAAATTCCTTCAATGCTAACAA					
PR1b_(Rywal.2)	(432)	TGTTTATTTTTGTTTTTCATTTATTTCAAATTCCTTCAATGCTAACAA					
PR1b_(Rywal.3)	(545)	TGTTTATTTTTGTTTTTCATTTATTTCAAATTCCTTCAATGCTAACAA					

Se nadaljuje

Nadaljevanje slike 17: Poravnava nukleotidnih zaporedij promotorjev PR1b iz genotipov PW363, Rywal in Désirée

Section 13									
	(601)	601	610	620	630	640	650		
PR1b_(PW.1)	(587)	ATTCTCACTCTTCTCTCTCGTACAAATAATTTTCTCTCAATAGATTTAGGG							
PR1b_(PW.2)	(586)	ATTCTCACTCTTCTCTCTCGTACAAATAATTTTCTCTCAATAGATTTAGGG							
PR1b_(PW.3)	(587)	ATTCTCACTCTTCTCTCTCGTACAAATAATTTTCTCTCAATAGATTTAGGG							
PR1b_(Desiree.1)	(587)	ATTCTCACTCTTCTCTCTCGTACAAATAATTTTCTCTCAATAGATTTAGGG							
PR1b_(Desiree.2)	(587)	ATTCTCACTCTTCTCTCTCGTACAAATAATTTTCTCTCAATAGATTTAGGG							
PR1b_(Desiree.3)	(587)	ATTCTCACTCTTCTCTCTCGTACAAATAATTTTCTCTCAATAGATTTAGGG							
PR1b_(Rywal.1)	(487)	ATTCTCACTCTTCTCTCTCGTACAAATAATTTTCTCTCAATAGATTTAGAG							
PR1b_(Rywal.2)	(482)	ATTCTCACTCTTCTCTCTCGTACAAATAATTTTCTCTCAATAGATTTAGGG							
PR1b_(Rywal.3)	(595)	ATTCTCACTCTTCTCTCTCGTACAAATAATTTTCTCTCAATAGATTTAGGG							
Section 14									
	(651)	651	660	670	680	690	700		
PR1b_(PW.1)	(647)	CGGCTCAAAAATAATATCGATGGCCATAAAATCATTTTTCCATGAAATATTT							
PR1b_(PW.2)	(646)	CGGCTCAAAAATAATATCGATGGCCATAAAATCATTTTTCCATGAAATATTT							
PR1b_(PW.3)	(647)	CGGCTCAAAAATAATATCGATGGCCATAAAATCATTTTTCCATGAAATATTT							
PR1b_(Desiree.1)	(647)	CGGCTCAAAAATAATATCGATGGCCATAAAATCATTTTTCCATGAAATATTT							
PR1b_(Desiree.2)	(647)	CGGCTCAAAAATAATATCGATGGCCATAAAATCATTTTTCCATGAAATATTT							
PR1b_(Desiree.3)	(647)	CGGCTCAAAAATAATATCGATGGCCATAAAATCATTTTTCCATGAAATATTT							
PR1b_(Rywal.1)	(537)	CGGTTCAA--TAATATCGATGGCTATAAAATCATTTTTCCATGAAATATTT							
PR1b_(Rywal.2)	(532)	CGGTTCAA--TAATATCGATGGCCATAAAATCATTTTTCCATGAAATATTT							
PR1b_(Rywal.3)	(645)	CGGTTCAA--TAATATCGATGGCCATAAAATCATTTTTCCATGAAATATTT							
Section 15									
	(701)	701	710	720	730	740	750		
PR1b_(PW.1)	(697)	TAAAGTAAACACTGAATCGCATCCTCTCTTGTAGCAGAGGTTCCATGTTTC							
PR1b_(PW.2)	(696)	TAAAGTAAACACTGAATCGCATCCTCTCTTGTAGCAGAGGTTCCATGTTTC							
PR1b_(PW.3)	(697)	TAAAGTAAACACTGAATCGCATCCTCTCTTGTAGCAGAGGTTCCATGTTTC							
PR1b_(Desiree.1)	(697)	TAAAGTAAACACTGAATCGCATCCTCTCTTGTAGCAGAGGTTCCATGTTTC							
PR1b_(Desiree.2)	(697)	TAAAGTAAACACTGAATCGCATCCTCTCTTGTAGCAGAGGTTCCATGTTTC							
PR1b_(Desiree.3)	(697)	TAAAGTAAACACTGAATCGCATCCTCTCTTGTAGCAGAGGTTCCATGTTTC							
PR1b_(Rywal.1)	(585)	TAAAGTAAACACTGAATCGCATCCTCTCTTGTAGCAGAGGTTCCATGTTTC							
PR1b_(Rywal.2)	(580)	TAAAGTAAACACTGAATCGCATCCTCTCTTGTAGCAGAGGTTCCATGTTTC							
PR1b_(Rywal.3)	(693)	TAAAGTAAACACTGAATCGCATCCTCTCTTGTAGCAGAGGTTCCATGTTTC							
Section 16									
	(751)	751	760	770	780	790	800		
PR1b_(PW.1)	(747)	GAATCCTAAAAATGATAAATAAATACTGCTAGATAGAACTTCCCTTTAAAGG							
PR1b_(PW.2)	(746)	GAATCCTAAAAATGATAAATAAATACTGCTAGATAGAACTTCCCTTTAAAGG							
PR1b_(PW.3)	(747)	GAATCCTAAAAATGATAAATAAATACTGCTAGATAGAACTTCCCTTTAAAGG							
PR1b_(Desiree.1)	(747)	GAATCCTAAAAATGATAAATAAATACTGCTAGATAGAACTTCCCTTTAAAGG							
PR1b_(Desiree.2)	(747)	GAATCCTAAAAATGATAAATAAATACTGCTAGATAGAACTTCCCTTTAAAGG							
PR1b_(Desiree.3)	(747)	GAATCCTAAAAATGATAAATAAATACTGCTAGATAGAACTTCCCTTTAAAGG							
PR1b_(Rywal.1)	(635)	GAATCCTAAAAATGAAATAAATAAATACTGCTAGATAGAACTTCCCTTTAAAGG							
PR1b_(Rywal.2)	(630)	GAATCCTAAAAATGAAATAAATAAATACTGCTAGATAGAACTTCCCTTTAAAGG							
PR1b_(Rywal.3)	(743)	GAATCCTAAAAATGAAATAAATAAATACTGCTAGATAGAACTTCCCTTTAAAGG							
Section 17									
	(801)	801	810	820	830	840	850		
PR1b_(PW.1)	(797)	TACGTATGTGACATAAATCAAATTAATTAGGACTCCAGTACACACCCCAAG							
PR1b_(PW.2)	(796)	TACGTATGTGACATAAATCAAATTAATTAGGACTCCAGTACACACCCCAAG							
PR1b_(PW.3)	(797)	TACGTATGTGACATAAATCAAATTAATTAGGACTCCAGTACACACCCCAAG							
PR1b_(Desiree.1)	(797)	TACGTATGTGACATAAATCAAATTAATTAGGACTCCAGTACACACCCCAAG							
PR1b_(Desiree.2)	(797)	TACGTATGTGACATAAATCAAATTAATTAGGACTCCAGTACACACCCCAAG							
PR1b_(Desiree.3)	(797)	TACGTATGTGACATAAATCAAATTAATTAGGACTCCAGTACACACCCCAAG							
PR1b_(Rywal.1)	(685)	TACTTATGTGACATAAATCAAATTAATTAGGACTCCAGTACACACCCCAAG							
PR1b_(Rywal.2)	(680)	TACTTATGTGACATAAATCAAATTAATTAGGACTCCAGTACACACCCCAAG							
PR1b_(Rywal.3)	(793)	TACTTATGTGACATAAATCAAATTAATTAGGACTCCAGTACACACCCCAAG							
Section 18									
	(851)	851	860	870	880	890	900		
PR1b_(PW.1)	(847)	ACAT---TGTATAAGAAATTTT---TTTTTATTCAGACCCCTATAATTTTGG							
PR1b_(PW.2)	(846)	ACAT---TGTATAAGAAATTTT---TTTTTATTCAGACCCCTATAATTTTGG							
PR1b_(PW.3)	(847)	ACAT---TGTATAAGAAATTTT---TTTTTATTCAGACCCCTATAATTTTGG							
PR1b_(Desiree.1)	(847)	ACAT---TGTATAAGAAATTTT---TTTTTATTCAGACCCCTATAATTTTGG							
PR1b_(Desiree.2)	(847)	ACAT---TGTATAAGAAATTTT---TTTTTATTCAGACCCCTATAATTTTGG							
PR1b_(Desiree.3)	(847)	ACAT---TGTATAAGAAATTTT---TTTTTATTCAGACCCCTATAATTTTGG							
PR1b_(Rywal.1)	(735)	ACAT---TGTATAAGAAAAAAGTTTTTATTCAGACCCCTATAATTTTGG							
PR1b_(Rywal.2)	(730)	ACAT---TGTATAAGAAAAAAGTTTTTATTCAGACCCCTATAATTTTGG							
PR1b_(Rywal.3)	(843)	ACATGATGCGATAAGAAAAAAGTTTTTATTCAGACCCCTATAATTTTGG							
Section 19									
	(901)	901	910	920	930	940	950		
PR1b_(PW.1)	(893)	AGCCTAAAGCCCTTATTTTAGTGTCTCAACCAATTTGATCAGTCCATGCT							
PR1b_(PW.2)	(892)	AGCCTAAAGCCCTTATTTTAGTGTCTCAACCAATTTGATCAGTCCATGCT							
PR1b_(PW.3)	(893)	AGCCTAAAGCCCTTATTTTAGTGTCTCAACCAATTTGATCAGTCCATGCT							
PR1b_(Desiree.1)	(893)	AGCCTAAAGCCCTTATTTTAGTGTCTCAACCAATTTGATCAGTCCATGCT							
PR1b_(Desiree.2)	(893)	AGCCTAAAGCCCTTATTTTAGTGTCTCAACCAATTTGATCAGTCCATGCT							
PR1b_(Desiree.3)	(893)	AGCCTAAAGCCCTTATTTTAGTGTCTCAACCAATTTGATCAGTCCATGCT							
PR1b_(Rywal.1)	(782)	AGCCTAAAGCCCTTATTTTAGTGTCTCAACCAATTTGATCAGTCCATGCT							
PR1b_(Rywal.2)	(777)	AGCCTAAAGCCCTTATTTTAGTGTCTCAACCAATTTGATCAGTCCATGCT							
PR1b_(Rywal.3)	(893)	AGCCTAAAGCCCTTATTTTAGTGTCTCAACCAATTTGATCAGTCCATGCT							
Section 20									
	(951)	951	960	970	980	990	1000		
PR1b_(PW.1)	(943)	TCAAGAGGCTGTAGAACATGTGTGAGCCCT-ATCTAATGGAAAAA-TA							
PR1b_(PW.2)	(942)	TCAAGAGGCTGTAGAACATGTGTGAGCCCT-ATCTAATGGAAAAA-TA							
PR1b_(PW.3)	(943)	TCAAGAGGCTGTAGAACATGTGTGAGCCCT-ATCTAATGGAAAAA-TA							
PR1b_(Desiree.1)	(943)	TCAAGAGGCTGTAGAACATGTGTGAGCCCT-ATCTAATGGAAAAA-TA							
PR1b_(Desiree.2)	(943)	TCAAGAGGCTGTAGAACATGTGTGAGCCCT-ATCTAATGGAAAAA-TA							
PR1b_(Desiree.3)	(943)	TCAAGAGGCTGTAGAACATGTGTGAGCCCT-ATCTAATGGAAAAA-TA							
PR1b_(Rywal.1)	(832)	TCAAGAGGCTGTAGAACATGTGTGAGCCCTCCATTAAATGGAAAAA-TA							
PR1b_(Rywal.2)	(827)	TCAAGAGGCTGTAGAACATGTGTGAGCCCTCCATTAAATGGAAAAA-TA							
PR1b_(Rywal.3)	(943)	TCAAGAGGCTGTAGAACATGTGTGAGCCCTCCATTAAATGGAAAAA-TA							

Se nadaljuje

Nadaljevanje slike 17: Poravnava nukleotidnih zaporedij promotorjev PR1b iz genotipov PW363, Rywal in Désirée

		Section 21						
		(1001)	1001	1010	1020	1030	1040	1050
PR1b_(PW.1)	(991)	TACATCTTTTATACTTCACGAGGTTGTAGAACATGTGTGAGCCCCATCTAA						
PR1b_(PW.2)	(990)	TACATCTTTTATACTTCACGAGGTTGTAGAACATGTGTGAGCCCCATCTAA						
PR1b_(PW.3)	(991)	TACATCTTTTATACTTCACGAGGTTGTAGAACATGTGTGAGCCCCATCTAA						
PR1b_(Desiree.1)	(991)	TACATCTTTTATACTTCACGAGGTTGTAGAACATGTGTGAGCCCCATCTAA						
PR1b_(Desiree.2)	(991)	TACATCTTTTATGCTTCACGAGGTTGTAGAACATGTGTGAGCCCCATCTAA						
PR1b_(Desiree.3)	(991)	TACATCTTTTATGCTTCACGAGGTTGTAGAACATGTGTGAGCCCCATCTAA						
PR1b_(Rywal.1)	(881)	TACATCTTTTATGCTTCACGAGGTTGTAGAACATGTGTGAGCCCCATCTAA						
PR1b_(Rywal.2)	(876)	TACATCTTTTATGCTTCACGAGGTTGTAGAACATGTGTGAGCCCCATCTAA						
PR1b_(Rywal.3)	(993)	TACATCTTTTATGCTTCACGAGGTTGTAGAACATGTGTGAGCCCCATCTAA						
		Section 22						
		(1051)	1051	1060	1070	1080	1090	1100
PR1b_(PW.1)	(1041)	TAGAAAAAA-TATACATCCTTTTAAATAATCAAGTCTTCCTAAGTTTAT						
PR1b_(PW.2)	(1040)	TAGAAAAAA-TATACATCCTTTTAAATAATCAAGTCTTCCTAAGTTTAT						
PR1b_(PW.3)	(1041)	TAGAAAAAA-TATACATCCTTTTAAATAATCAAGTCTTCCTAAGTTTAT						
PR1b_(Desiree.1)	(1041)	TAGAAAAAA-TATACATCCTTTTAAATAATCAAGTCTTCCTAAGTTTAT						
PR1b_(Desiree.2)	(1041)	TAGAAAAAA-TATACATCCTTTTAAATAATCAAGTCTTCCTAAGTTTAT						
PR1b_(Desiree.3)	(1041)	TAGAAAAAA-TATACATCCTTTTAAATAATCAAGTCTTCCTAAGTTTAT						
PR1b_(Rywal.1)	(931)	TAGAAAAAA-TATACATCCTTTTAAATAATCAAGTCTTCCTAAGTTTAT						
PR1b_(Rywal.2)	(926)	TAGAAAAAA-TATACATCCTTTTAAATAATCAAGTCTTCCTAAGTTTAT						
PR1b_(Rywal.3)	(1043)	TAGAAAAAA-TATACATCCTTTTAAATAATCAAGTCTTCCTAAGTTTAT						
		Section 23						
		(1101)	1101	1110	1120	1130	1140	1150
PR1b_(PW.1)	(1090)	AGACTTTTTATTCCACCCAAAAATGCTTAATTAATCTTGTTTAAACCTTAT						
PR1b_(PW.2)	(1089)	AGACTTTTTATTCCACCCAAAAATGCTTAATTAATCTTGTTTAAACCTTAT						
PR1b_(PW.3)	(1090)	AGACTTTTTATTCCACCCAAAAATGCTTAATTAATCTTGTTTAAACCTTAT						
PR1b_(Desiree.1)	(1090)	AGACTTTTTATTCCACCCAAAAATGCTTAATTAATCTTGTTTAAACCTTAT						
PR1b_(Desiree.2)	(1090)	AGACTTTTTATTCCACCCAAAAATGCTTAATTAATCTTGTTTAAACCTTAT						
PR1b_(Desiree.3)	(1090)	AGACTTTTTATTCCACCCAAAAATGCTTAATTAATCTTGTTTAAACCTTAT						
PR1b_(Rywal.1)	(980)	AGACTTTTTATTCCACCCAAAAATGCTTAATTAATCTTGTTTAAACCTTAT						
PR1b_(Rywal.2)	(976)	AGACTTTTTATTCCACCCAAAAATGCTTAATTAATCTTGTTTAAACCTTAT						
PR1b_(Rywal.3)	(1092)	AGACTTTTTATTCCACCCAAAAATGCTTAATTAATCTTGTTTAAACCTTAT						
		Section 24						
		(1151)	1151	1160	1170	1180	1190	1200
PR1b_(PW.1)	(1140)	TTTGATAATATATATTTTGGAAAAAAT----CAAGAATTACCTAGATTA						
PR1b_(PW.2)	(1139)	TTTGATAATATATATTTTGGAAAAAAT----CAAGAATTACCTAGATTA						
PR1b_(PW.3)	(1140)	TTTGATAATATATATTTTGGAAAAAAT----CAAGAATTACCTAGATTA						
PR1b_(Desiree.1)	(1140)	TTTGATAATATATATTTTGGAAAAAAT----CAAGAATTACCTAGATTA						
PR1b_(Desiree.2)	(1140)	TTTGATAATATATATTTTGGAAAAAAT----CAAGAATTACCTAGATTA						
PR1b_(Desiree.3)	(1140)	TTTGATAATATATATTTTGGAAAAAAT----CAAGAATTACCTAGATTA						
PR1b_(Rywal.1)	(1030)	TTTGATAATATATATTTTGGAAAAAAT----CAAGAATTACCTAGATTA						
PR1b_(Rywal.2)	(1026)	TTTGATAATATATATTTTGGAAAAAAT----CAAGAATTACCTAGATTA						
PR1b_(Rywal.3)	(1142)	TTTGATAATATATATTTTGGAAAAAAT----CAAGAATTACCTAGATTA						
		Section 25						
		(1201)	1201	1210	1220	1230	1240	1250
PR1b_(PW.1)	(1185)	ATGATATGATATATCTTTAAAGCATATAGTATTCCATGAATCACACGACAT						
PR1b_(PW.2)	(1184)	ATGATATGATATATCTTTAAAGCATATAGTATTCCATGAATCACACGACAT						
PR1b_(PW.3)	(1185)	ATGATATGATATATCTTTAAAGCATATAGTATTCCATGAATCACACGACAT						
PR1b_(Desiree.1)	(1185)	ATGATATGATATATCTTTAAAGCATATAGTATTCCATGAATCACACGACAT						
PR1b_(Desiree.2)	(1185)	ATGATATGATATATCTTTAAAGCATATAGTATTCCATGAATCACACGACAT						
PR1b_(Desiree.3)	(1185)	ATGATATGATATATCTTTAAAGCATATAGTATTCCATGAATCACACGACAT						
PR1b_(Rywal.1)	(1078)	AAGTATGACTATCTTTAAAGCATATAGTATTCCATGAATCACACGACAT						
PR1b_(Rywal.2)	(1069)	AAGTATGACTATCTTTAAAGCATATAGTATTCCATGAATCACACGACAT						
PR1b_(Rywal.3)	(1192)	AAGTATGACTATCTTTAAAGCATATAGTATTCCATGAATCACACGACAT						
		Section 26						
		(1251)	1251	1260	1270	1280	1290	1300
PR1b_(PW.1)	(1235)	GCAATTAGGTACTAATCCATTTGAATTTTCTTTACATGAAAAATGAAA						
PR1b_(PW.2)	(1234)	GCAATTAGGTACTAATCCATTTGAATTTTCTTTACATGAAAAATGAAA						
PR1b_(PW.3)	(1235)	GCAATTAGGTACTAATCCATTTGAATTTTCTTTACATGAAAAATGAAA						
PR1b_(Desiree.1)	(1235)	GCAATTAGGTACTAATCCATTTGAATTTTCTTTACATGAAAAATGAAA						
PR1b_(Desiree.2)	(1235)	GCAATTAGGTACTAATCCATTTGAATTTTCTTTACATGAAAAATGAAA						
PR1b_(Desiree.3)	(1235)	GCAATTAGGTACTAATCCATTTGAATTTTCTTTACATGAAAAATGAAA						
PR1b_(Rywal.1)	(1128)	GCAAT---GGTACTAATCCATTTGAATTTTCTTTACATGAAAAATGAAA						
PR1b_(Rywal.2)	(1119)	GCAAT---GGTACTAATCCATTTGAATTTTCTTTACATGAAAAATGAAA						
PR1b_(Rywal.3)	(1242)	GCAAT---GGTACTAATCCATTTGAATTTTCTTTACATGAAAAATGAAA						
		Section 27						
		(1301)	1301	1310	1320	1330	1340	1350
PR1b_(PW.1)	(1285)	TCACAATGTTTAAATTTAAACAAATCAAAGTTTGATAAAAAATCTAATCAA						
PR1b_(PW.2)	(1284)	TCACAATGTTTAAATTTAAACAAATCAAAGTTTGATAAAAAATCTAATCAA						
PR1b_(PW.3)	(1285)	TCACAATGTTTAAATTTAAACAAATCAAAGTTTGATAAAAAATCTAATCAA						
PR1b_(Desiree.1)	(1285)	TCACAATGTTTAAATTTAAACAAATCAAAGTTTGATAAAAAATCTAATCAA						
PR1b_(Desiree.2)	(1285)	TCACAATGTTTAAATTTAAACAAATCAAAGTTTGATAAAAAATCTAATCAA						
PR1b_(Desiree.3)	(1285)	TCACAATGTTTAAATTTAAACAAATCAAAGTTTGATAAAAAATCTAATCAA						
PR1b_(Rywal.1)	(1175)	TCACAATGTTTAAATTTAAACAAATCAAAGTTTGATAAAAAATCTAATCAA						
PR1b_(Rywal.2)	(1166)	TCACAATGTTTAAATTTAAACAAATCAAAGTTTGATAAAAAATCTAATCAA						
PR1b_(Rywal.3)	(1289)	TCACAATGTTTAAATTTAAACAAATCAAAGTTTGATAAAAAATCTAATCAA						
		Section 28						
		(1351)	1351	1360	1370	1380	1390	1400
PR1b_(PW.1)	(1334)	AGATAAAAA-TGCTCATTTTGGAAAAA-CTTAAAGGACCCAAAGTAAT						
PR1b_(PW.2)	(1333)	AGATAAAAA-TGCTCATTTTGGAAAAA-CTTAAAGGACCCAAAGTAAT						
PR1b_(PW.3)	(1334)	AGATAAAAA-TGCTCATTTTGGAAAAA-CTTAAAGGACCCAAAGTAAT						
PR1b_(Desiree.1)	(1334)	AGATAAAAA-TGCTCATTTTGGAAAAA-CTTAAAGGACCCAAAGTAAT						
PR1b_(Desiree.2)	(1334)	AGATAAAAA-TGCTCATTTTGGAAAAA-CTTAAAGGACCCAAAGTAAT						
PR1b_(Desiree.3)	(1334)	AGATAAAAA-TGCTCATTTTGGAAAAA-CTTAAAGGACCCAAAGTAAT						
PR1b_(Rywal.1)	(1225)	ATAAAAAAAATGCTCATTTTGGAAAAA-CTTAAAGGACCCAAAGTAAT						
PR1b_(Rywal.2)	(1216)	ATAAAAAAAATGCTCATTTTGGAAAAA-CTTAAAGGACCCAAAGTAAT						
PR1b_(Rywal.3)	(1339)	ATAAAAAAA-TGCTCATTTTGGAAAAA-CTTAAAGGACCCAAAGTAAT						

Se nadaljuje

Nadaljevanje slike 17: Poravnava nukleotidnih zaporedij promotorjev PR1b iz genotipov PW363, Rywal in Désirée

		Section 29						
		(1401)	1401	,1410	,1420	,1430	,1440	1450
PR1b_(PW.1)	(1382)	ACTTCTAAAAA	ATTGAAGGAC	AAAAATGGCTCAAC	GAATAACACAA	GAGA		
PR1b_(PW.2)	(1381)	ACTTCTAAAAA	ATTGAAGGAC	AAAAATGGCTCAAC	GAATAACACAA	GAGA		
PR1b_(PW.3)	(1382)	ACTTCTAAAAA	ATTGAAGGAC	AAAAATGGCTCAAC	GAATAACACAA	GAGA		
PR1b_(Desiree.1)	(1382)	ACTTCTAAAAA	ATTGAAGGAC	AAAAATGGCTCAAC	GAATAACACAA	GAGA		
PR1b_(Desiree.2)	(1382)	ACTTCTAAAAA	ATTGAAGGAC	AAAAATGGCTCAAC	GAATAACACAA	GAGA		
PR1b_(Desiree.3)	(1382)	ACTTCTAAAAA	ATTGAAGGAC	AAAAATGGCTCAAC	GAATAACACAA	GAGA		
PR1b_(Rywal.1)	(1274)	ACTTCTAAAAA	ATTGAAGGAC	AAAAATGGCTCAAC	GAATAACACAA	GAGA		
PR1b_(Rywal.2)	(1265)	ACTTCTAAAAA	ATTGAAGGAC	AAAAATGGCTCAAC	GAATAACACAA	GAGA		
PR1b_(Rywal.3)	(1388)	ACTTCTAAAAA	ATTGAAGGAC	AAAAATGGCTCAAC	GAATAACACAA	GAGA		
		Section 30						
		(1451)	1451	,1460	,1470	,1480	,1490	1500
PR1b_(PW.1)	(1432)	CTATTTTGAAC	TACTATCAA	AGATAAGGAG	ACCATTTTAT	CCATTTCCCT		
PR1b_(PW.2)	(1431)	CTATTTTGAAC	TACTATCAA	AGATAAGGAG	ACCATTTTAT	CCATTTCCCT		
PR1b_(PW.3)	(1432)	CTATTTTGAAC	TACTATCAA	AGATAAGGAG	ACCATTTTAT	CCATTTCCCT		
PR1b_(Desiree.1)	(1432)	CTATTTTGAAC	TACTATCAA	AGATAAGGAG	ACCATTTTAT	CCATTTCCCT		
PR1b_(Desiree.2)	(1432)	CTATTTTGAAC	TACTATCAA	AGATAAGGAG	ACCATTTTAT	CCATTTCCCT		
PR1b_(Desiree.3)	(1432)	CTATTTTGAAC	TACTATCAA	AGATAAGGAG	ACCATTTTAT	CCATTTCCCT		
PR1b_(Rywal.1)	(1324)	CTATTTTGAAC	TACTATCAA	AGATAAGGAG	ACCATTTTAT	CCATTTCCCT		
PR1b_(Rywal.2)	(1315)	CTATTTTGAAC	TACTATCAA	AGATAAGGAG	ACCATTTTAT	CCATTTCCCT		
PR1b_(Rywal.3)	(1438)	CTATTTTGAAC	TACTATCAA	AGATAAGGAG	ACCATTTTAT	CCATTTCCCT		
		Section 31						
		(1501)	1501	,1510	,1520	,1530	,1540	1550
PR1b_(PW.1)	(1482)	TACTAATTTCC	TTTAAATTTT	CTTCCACACAT	GGCTAAAC	CAAAATTC	CCACAA	
PR1b_(PW.2)	(1481)	TACTAATTTCC	TTTAAATTTT	CTTCCACACAT	GGCTAAAC	CAAAATTC	CCACAA	
PR1b_(PW.3)	(1482)	TACTAATTTCC	TTTAAATTTT	CTTCCACACAT	GGCTAAAC	CAAAATTC	CCACAA	
PR1b_(Desiree.1)	(1482)	TACTAATTTCC	TTTAAATTTT	CTTCCACACAT	GGCTAAAC	CAAAATTC	CCACAA	
PR1b_(Desiree.2)	(1482)	TACTAATTTCC	TTTAAATTTT	CTTCCACACAT	GGCTAAAC	CAAAATTC	CCACAA	
PR1b_(Desiree.3)	(1482)	TACTAATTTCC	TTTAAATTTT	CTTCCACACAT	GGCTAAAC	CAAAATTC	CCACAA	
PR1b_(Rywal.1)	(1374)	TACTAATTTCC	TTTAAATTTT	CTTCCACACAT	GGCTAAAC	CAAAATTC	CCACAA	
PR1b_(Rywal.2)	(1365)	TACTAATTTCC	TTTAAATTTT	CTTCCACACAT	GGCTAAAC	CAAAATTC	CCACAA	
PR1b_(Rywal.3)	(1488)	TACTAATTTCC	TTTAAATTTT	CTTCCACACAT	GGCTAAAC	CAAAATTC	CCACAA	
		Section 32						
		(1551)	1551	,1560	,1570	,1580	,1590	1600
PR1b_(PW.1)	(1532)	TTAAATTTTAC	TATATAA	TACACTACT	TATCTCACAT	TTTATAT	CCAAATA	
PR1b_(PW.2)	(1531)	TTAAATTTTAC	TATATAA	TACACTACT	TATCTCACAT	TTTATAT	CCAAATA	
PR1b_(PW.3)	(1532)	TTAAATTTTAC	TATATAA	TACACTACT	TATCTCACAT	TTTATAT	CCAAATA	
PR1b_(Desiree.1)	(1532)	TTAAATTTTAC	TATATAA	TACACTACT	TATCTCACAT	TTTATAT	CCAAATA	
PR1b_(Desiree.2)	(1532)	TTAAATTTTAC	TATATAA	TACACTACT	TATCTCACAT	TTTATAT	CCAAATA	
PR1b_(Desiree.3)	(1532)	TTAAATTTTAC	TATATAA	TACACTACT	TATCTCACAT	TTTATAT	CCAAATA	
PR1b_(Rywal.1)	(1424)	TTAAATTTTAC	TATATAA	TACACTACT	TATCTCACAT	TTTATAT	CCAAATA	
PR1b_(Rywal.2)	(1415)	TTAAATTTTAC	TATATAA	TACACTACT	TATCTCACAT	TTTATAT	CCAAATA	
PR1b_(Rywal.3)	(1538)	TTAAATTTTAC	TATATAA	TACACTACT	TATCTCACAT	TTTATAT	CCAAATA	
		Section 33						
		(1601)	1601	,1610	,1620	,1630		
PR1b_(PW.1)	(1582)	ACTTAGATTTA	TATTTTCT	TTCCACTAG	ACCTAAAG	CAAAA		
PR1b_(PW.2)	(1581)	ACTTAGATTTA	TATTTTCT	TTCCACTAG	ACCTAAAG	CAAAA		
PR1b_(PW.3)	(1582)	ACTTAGATTTA	TATTTTCT	TTCCACTAG	ACCTAAAG	CAAAA		
PR1b_(Desiree.1)	(1582)	ACTTAGATTTA	TATTTTCT	TTCCACTAG	ACCTAAAG	CAAAA		
PR1b_(Desiree.2)	(1582)	ACTTAGATTTA	TATTTTCT	TTCCACTAG	ACCTAAAG	CAAAA		
PR1b_(Desiree.3)	(1582)	ACTTAGATTTA	TATTTTCT	TTCCACTAG	ACCTAAAG	CAAAA		
PR1b_(Rywal.1)	(1474)	ACTTAGATTTA	TATTTTCT	TTCCACTAG	ACCTAAAG	CAAAA		
PR1b_(Rywal.2)	(1465)	ACTTAGATTTA	TATTTTCT	TTCCACTAG	ACCTAAAG	CAAAA		
PR1b_(Rywal.3)	(1585)	ACTTAGATTTA	TATTTTCT	TTCCACTAG	ACCTAAAG	CAAAA		

Slika 17: Poravnava nukleotidnih zaporedij promotorjev PR1b iz genotipov PW363, Rywal in Désirée

Poravnave smo naredili s pomočjo programa AlignX. Popolno ujemanje je prikazano svetlo sivo, temno siva in bela pa prikazujeta odstopanja v nukleotidnem zaporedju.

Primerjava med zaporedji je pokazala, da se promotorji PR1b lahko razlikujejo med genotipi kot tudi znotraj genotipa. Za razumevanje raznolikosti smo zaporedja vnesli v orodja za analizo potencialnih vezavnih mest za transkripcijske faktorje.

4.1.2 Iskanje vezavnih mest za transkripcijske faktorje v promotorskih zaporedjih

Nukleotidna zaporedja promotorjev PR1b smo analizirali s pomočjo baz prostodostopnih orodij. Z bioinformatiko bazo podatkov Transfac smo v rastlinskih promotorjih PR1b določili vezavna mesta za transkripcijske faktorje.

Preglednica 22: Analiza nukleotidnih zaporedij promotora PR1b iz genotipov PW363, Rywal in Désirée s pomočjo bioinformatične baze Transfac za iskanje vezavnih mest za transkripcijske faktorje v promotorskih zaporedjih

Transkripcijski faktor	Regulatorno zaporedje	PW363			Rywal			Desiree		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3
BPC1	agaaag	6 (+)								
NAC6	ttacgt	30 (+)	29 (-)	30 (-)	30 (-)	30 (-)		30 (-)	30 (-)	30 (-)
OCSBF-1	acgtg	32 (-)	31 (-)	32 (-)	32 (-)	32 (-)		32 (-)	32 (-)	32 (-)
C1	cgaactagccg						123 (+)			
ARR10	agatccg					137 (+)				
GT-1	agftaatatcta	169 (+)	168 (+)	169 (+)	225(+)	225(+)		169 (+)	169 (+)	169 (+)
HSFA1E	ccgtcg	202 (+)	201 (+)	202 (+)			204 (+)	202 (+)	202 (+)	202 (+)
HSFA2	ttttgg	214 (-)	213 (-)	214 (-)				214 (-)	214 (-)	214 (-)
At2g41690	gttcgg						216 (-)			
TGA1a	gcggtgacctattgaaaact						255 (+)			
AZF3	aaattatactt	282 (-)	281 (-)	282 (-)			285 (-)	282 (-)	282 (-)	282 (-)
TGA1A	ttegtca	320 (+)	319 (+)	320 (+)			323 (+)	320 (+)	320 (+)	320 (+)
HSFA4A	actatt	406 (+)	405 (+)	406 (+)	296 (+)	296 (+)	409 (+)	406 (+)	406 (+)	406 (+)
RIN	ccttaaaaacg	434 (-)	433 (-)	434 (-)	324 (-)	324 (-)	437 (-)	434 (-)	434 (-)	434 (-)
GT-1	agftaatatcta					381 (-)	494 (-)			
BPC1	agaaag	504 (+)	503 (+)	504 (+)	394 (+)	394 (+)	507 (+)	504 (+)	504 (+)	504 (+)
WRKY	tgactaactaa				477 (-)					
At3g51080	tttttcc					409 (-)	522 (-)			
CBNAC	ttgctt	577 (+)	576 (+)	577 (+)		462 (+)	575 (+)	577 (+)	577 (+)	577 (+)
Myb-15	taacaa	591 (+)	590 (+)	591 (+)		476 (+)	589 (+)	591 (+)	591 (+)	591 (+)
MADS-A	aatcctaaaatgaaaa				636 (+)					
ERF13	agggcggtc	643 (-)	642 (-)	643 (-)		528 (-)	641 (-)	643 (-)	643 (-)	643 (-)
DRF1.3	agggcggtc	643 (-)	642 (-)	643 (-)		528 (-)	641 (-)	643 (-)	643 (-)	643 (-)
ESR1	agggcggtc	643 (-)	642 (-)	643 (-)		528 (-)	641 (-)	643 (-)	643 (-)	643 (-)
At3g63350	ggcgcg	644 (-)	643 (-)	644 (-)		529 (-)	642 (-)	644 (-)	644 (-)	644 (-)
ERF1	ggcggtc	645 (+)	644 (+)	645 (+)		530 (+)	643 (+)	645 (+)	645 (+)	645 (+)
At3g51080	tttttcc	679 (-)	678 (-)	679 (-)		562 (-)	675 (-)	679 (-)	679 (-)	679 (-)
MADS-A	aatcctaaaatgaaaa					631 (+)	744 (+)			

Se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 22: Analiza nukleotidnih zaporedij promotorja PR1b iz genotipov PW363, Rywal in Désirée s pomočjo bioinformatične baze Transfac za iskanje vezavnih mest za transkripcijske faktorje v promotorskih zaporedjih

Transkripcijski faktor	Regulatorno zaporedje	PW363			Rywal			Desirée		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3
ASR-1	accca	840 (+)	839 (+)	840 (+)	728 (+)	723 (+)		840 (+)	840 (+)	840 (+)
PEND	tataagaatt	853 (-)	852 (-)	853 (-)				853 (-)	853 (-)	853 (-)
GT-1	ttttttttatt	862 (+)	861 (+)	862 (+)				862 (+)	862 (+)	862 (+)
HSFA2	ttttgg	887 (-)	886 (-)	887 (-)	776 (-)	771 (-)	887 (-)	887 (-)	887 (-)	887 (-)
CBNAC	ttgctt						914 (+)			
OCSBF-1	cacgt	931 (+)	930 (+)	931 (+)	820 (+)	815 (+)		931 (+)	931 (+)	931 (+)
At3g51080	ggaaaaa	980 (+)	979 (+)	980 (+)	870 (+)	865 (+)	981 (+)	980 (+)	980 (+)	980 (+)
TGA1A	tacatca	1052 (+)	1051 (+)	1052 (+)				1052 (+)	1052 (+)	1052 (+)
ASR-1	accca	1104 (+)	1103 (+)	1104 (+)	994 (+)	990 (+)	1106 (+)	1104 (+)	1104 (+)	1104 (+)
HSFA2	ccaaaa	1106 (+)	1105 (+)	1106 (+)	996 (+)	992 (+)	1108 (+)	1106 (+)	1106 (+)	1106 (+)
HSFA4A	actatt				1085 (+)	1076 (+)	1199 (+)			
HBP-1a	cacacgacat	1225 (+)	1224 (+)	1225 (+)	1118 (+)	1109 (+)	1232 (+)	1225 (+)	1225 (+)	1225 (+)
AGL20	tttaatttaac	1294 (-)	1293 (-)	1294 (-)	1184 (-)	1175 (-)	1298 (-)	1294 (-)	1294 (-)	1294 (-)
Myb-15	taacaa	1302 (+)	1301 (+)	1302 (+)	1192 (+)	1183 (+)	1306 (+)	1302 (+)	1302 (+)	1302 (+)
GT-1	gataaaaaaaaa				1224 (-)	1215 (-)				
HSFA2	ccaaaa				1294 (+)	1285 (+)	1376 (+)			
HSFA2	ccaaaa						1408 (+)			
SQUA	acaaaaatgg	1401 (-)	1400 (-)	1401 (-)				1401 (-)	1401 (-)	1401 (-)
HSFA4A	actatt	1431 (+)	1430 (+)	1431 (+)	1323 (+)	1314 (+)	1437 (+)	1431 (+)	1431 (+)	1431 (+)
SQUA	ccatttttat	1463 (+)	1462 (+)	1463 (+)	1355 (+)	1346 (+)	1469 (+)	1463 (+)	1463 (+)	1463 (+)
CBNAC	aagcaa	1613 (-)	1612 (-)	1613 (-)	1505 (-)	1496 (-)	1616 (-)	1613 (-)	1613 (-)	1613 (-)

Prvi stolpec predstavlja seznam transkripcijskih faktorjev, ki se vežejo na regulatorno zaporedje promotorja PR1b (drugi stolpec). Naslednji trije stolpci označujejo promotorska zaporedja genotipov PW363, Rywal in Désirée. Stolpec vsakega kultivarja se deli na tri stolpce, ki označujejo tri promotorska zaporedja istega genotipa, označena z 1, 2 in 3. Izpolnjena celica v tabeli pomeni, da je transkripcijski faktor v promotorju prisoten. Iz nje lahko razberemo položaj mesta vezave transkripcijskega faktorja, opisano z številom zaporednega nukleotida in njegovo lego na negativni (-) ali pozitivni (+) verigi.

Med promotorskimi zaporedji sorte PW363 izstopa promotorsko zaporedje 1, saj vsebuje dodatno regulatorno zaporedje, kamor se veže transkripcijski faktor BPC1. Promotorsko

zaporedje 2 ima v primerjavi s promotorskima zaporedjema 1 in 3 en nukleotid manj, saj se vsi transkripcijski faktorji vežejo za en nukleotid bližje 5' koncu promotorja.

Največja raznolikost med promotorskimi zaporedji se pojavlja pri kultivarju Rywal, kamor se poleg istih transkripcijskih faktorjev, ki se vežejo na različne mesta, vežejo tudi različni transkripcijski faktorji.

Promotorska zaporedja znotraj kultivarja Désirée pa so med seboj popolnoma enaka in hkrati identična promotorskem zaporedju 3 genotipa PW363.

4.1.3 Iskanje znanih cis regulatornih elementov v promotorskih zaporedjih

Z bioinformatičnim orodjem PlantCARE smo v rastlinskih promotorjih PR1b določili cis-aktivne regulatorne elemente.

Preglednica 23: Analiza nukleotidnih zaporedij promotora PR1b iz genotipov PW363, Rywal in Désirée s pomočjo bioinformatične baze PlantCARE za določanje cis-regulatornih elementov

Regulatorni element	PW			Rywal			Desirée		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
5UTR z Py bogat odsek	1	1	1				1	1	1
3-AF1 vezavno mesto						1			
AAGAA-motiv	2	2	2	1	1	1	2	2	2
ABRE	1	1	1	1	1		1	1	1
ACE	1	1	1	1	1	1	1	1	1
ARE	1	1	1	1			1	1	1
AT-bogati element			1	1	1	1	1	1	1
ATCT-motiv	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AT1_motiv	1	1	1	1	1		1	1	1
Box 4	5	5	5	4	5	3	5	5	5
Box I	2	2	2	3	3	3	2	2	2
CAAT-box	28	28	28	26	28	27	28	28	28
CAT-box	1	1	1			1	1	1	1
CGTCA-motiv	1	1	1			1	1	1	1
CTAG-motiv						1			
G-Box	1	1	1	1	1		1	1	1
G-box	3	3	3	3	3	1	3	3	3
GCC box	1	1	1		1	1	1	1	1
GC-motiv				1	1				
GT1-motiv	3	3	3	1	2		4	3	3
HSE	3	3	3	3	3	3	3	3	3
I-box	1	1	1	1	2	1	1	1	1
LTR	1	1	1	1	1		1	1	1
MBS	1	1	1	2	2	1	1	1	1
MRE						1			
Skn-1_motiv	1	1	1	2	1	2	1	1	1
Sp1	3	3	3	2	3	5	3	3	3
TATA-box	79	79	79	66	61	77	78	76	79
TC-bogate ponovitve	3	3	3	3	3	3	3	3	3
TCA-element				1	1	1			
TGACG-motiv	1	1	1			1	1	1	1

Se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 23: Analiza nukleotidnih zaporedij promotorja PR1b iz genotipov PW363, Rywal in Désirée s pomočjo bioinformatične baze PlantCARE za določanje cis-regulatornih elementov

Regulatorni element	PW			Rywal			Desiree		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Unnamed_1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Unnamed_3	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Unnamed_4	5	5	5	5	5	8	5	5	5
Unnamed_6	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Unnamed_8	1	1	1				1	1	1
circadian				1	1	1			

Prvi stolpec predstavlja seznam regulatornih elementov promotorja PR1b. Naslednji trije stolpci označujejo promotorska zaporedja genotipov PW363, Rywal in Désirée. Stolpec vsakega genotipa se deli na 3 stolpce, ki označujejo tri promotorska zaporedja istega kultivarja, označena z 1, 2 in 3. Izpolnjena celica v tabeli pomeni, da je regulatorni element v promotorju prisoten, njegova ponovljivost pa je številčno prikazana. S temno sivo so označeni regulatorni elementi, ki so vključeni v rastlinsko obrambo.

Iz preglednice 23 je razvidno, da imajo različni genotipi krompirja prisotne različne cis-aktivne regulatorne elemente.

Med promotorskimi zaporedji genotipa PW izstopa zaporedje 3, ki se od preostalih dveh zaporedij razlikuje le po prisotnosti AT-bogatega elementa. Promotorska zaporedja znotraj genotipa Désirée so enaka in hkrati identični promotorskima zaporedjema 1 in 2 iz genotipa PW363. Večja raznolikost med promotorskimi zaporedji se pojavlja pri genotipu Rywal.

Regulatorna elementa CGTCA-motiv in TGACG-motiv sodelujeta v signalni poti MeJa in sta prisotna v vseh promotorskih zaporedjih genotipov PW363 in Désirée ter pri tretjem promotorskem zaporedju genotipa Rywal, medtem ko je TCA-element vpleten v signalno pot SA in je prisoten le pri genotipu Rywal.

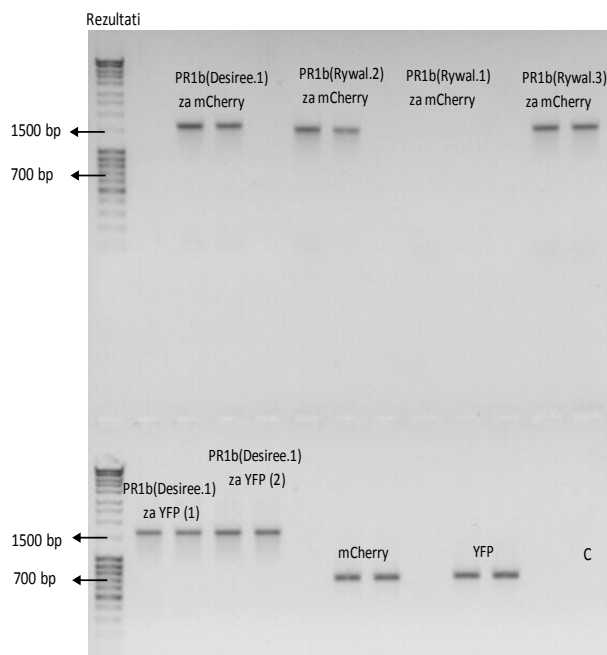
4.2 PRIPRAVA KONSTRUKTOV

4.2.1 Kloniranje konstruktov

Analiza nukleotidnih zaporedij PR1b, ki so bila pomnožena v okviru doktorskega dela Tjaše Lukan, je bila osnova za načrtovanje začetnih oligonukleotidov za pomnoževanje željenih promotorskih regij (Sl. 10, 11, 12) s PCR. Za kloniranje s pomočjo homologne rekombinacije so začetni oligonukleotidi A za pomnoževanje promotorja na 5' koncu imeli zaporedje CACC, ki je omogočalo usmerjeno ligacijo v vstopni plazmid pENTR™/D-TOPO® (Pregl. 3) in začetni oligonukleotidi B pa so za pomnoževanje promotorja PR1b na 3' koncu imeli zaporedje, ki se nalega na 5' konec zaporedja fluorescenčnega proteina in s tem omogoči fuzijo promotorja s fluorescenčnim proteinom.

V začetni reakciji PCR smo kot matrično DNA uporabili plazmide s fluorescenčnim proteinom mCherry oziroma YFP in promotorje gena PR1b. Za pomnoževanje promotorja PR1b smo vzeli promotorska zaporedja, ki so se med seboj najbolj razlikovala, in sicer smo iz kultivarja Désirée izbrali zaporedje 1, sam je identičen zaporedju 2 in 3, iz kultivarja Rywal pa vse tri, saj so zaporedja med seboj različna. Kot matrično DNA smo uporabili tudi plazmide s konstrukti TGA2::fluorescenčni protein in ob tem že pripravili vstopni klon za Gateway® kompatibilno rekombinacijsko kloniranje.

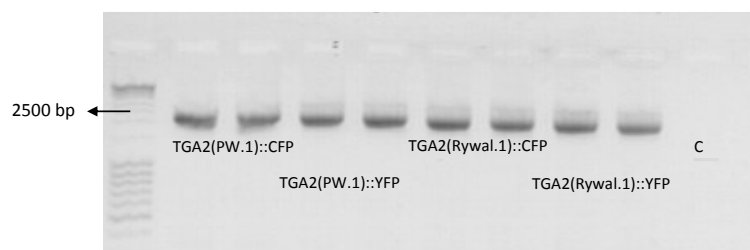
Velikosti produktov PCR smo preverili z agarozno gelsko elektroforezo (Sl. 17, 18). Dobili smo produkte pričakovanih velikosti, saj je izbrani del promotorja PR1b dolg približno 1600 bp (dodano je še zaporedje CACC na 5' koncu in 20 nukleotidov na 3' koncu, ki so v naslednjih reakcijah omogočili naleganje na 5' konec fluorescenčnega proteina). Pomnoževanje ni bilo uspešno pri promotorju PR1b(Rywal.1). Produkti PCR fluorescenčnih proteinov so bili pričakovane velikosti, saj je velikost mCherry 711 bp, YFP pa 720 bp. Po izolaciji iz gela je povprečna koncentracija DNA znašala okoli 30 ng/μl.



Slika 18: Analiza produktov PCR po pomnoževanju posameznih promotorjev in fluorescenčnih proteinov

1-% agarozni gel. V prvi jamici je velikostna lestvica MassRuler™ DNA Ladder Mix, na kateri sta označeni DNA velikosti 700 in 1500 bp. Sledijo produkti PCR promotorja PR1b in fluorescenčnih proteinov mCherry in YFP. C je negativna kontrola. Prvi vzorcu PR1b(Desiree.1) smo reakcijo ponovili dvakrat, promotorsko zaporedje kultivarja Rywal pa je pomnoženo trikrat, saj so zaporedja med seboj različna. Promotorjem je na 5' koncu dodano zaporedje CACC, na 3' pa zaporedje, ki nalega na izbran fluorescenčni protein. Vsak vzorec je v dveh jamicah.

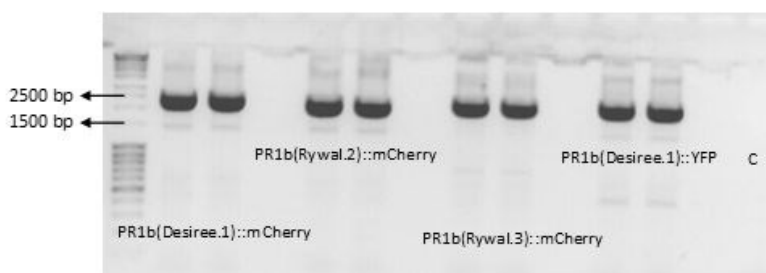
V naslednji stopnji smo izvedli fuzijski PCR in s tem združili promotorsko zaporedje z zaporedjem izbranega fluorescenčnega proteina. Velikost dobljenih PCR produktov je bila v skladu s pričakovanju tudi v primeru konstrukta TGA2::fluorescenčni protein in sicer približno 2200 bp. Produkto smo nato izolirali iz gela in jih tako ločili od začetnih oligonukleotidov v reakciji. Po izolaciji iz gela je povprečna koncentracija DNA znašala okoli 35 ng/μl.



Slika 19: Analiza produktov PCR po pomnoževanju konstrukta promotorja TGA2 v fuziji s fluorescenčnim proteinom

1-% agarozni gel. V prvi jamici je velikostna lestvica MassRuler™ DNA Ladder Mix z označeno velikostjo 2500 bp. Sledijo produkti PCR konstrukta promotorjev TGA2 s fluorescenčnim proteinom in dodanim CACC koncem. Vsak vzorec je v dveh jamicah. C je negativna kontrola. PW je oznaka za PW363.

Podoben set reakcij smo izvedli tudi za pripravo konstrukta PR1b::fluorescenčni protein. Velikosti produktov pomnoževanja promotorja oziroma zaporedja, ki kodira za fluorescenčni protein, smo preverili z agarozno gelsko elektroforezo (Sl. 19). Dobili smo produkte pričakovanih velikosti, in sicer približno 2300 bp za konstrukt s promotorjem PR1b, pri čemer je 711 bp (mCherry) oziroma 720 bp (YFP) pripadalo fluorescenčnemu proteinu, preostalih približno 1600 bp pa promotorju PR1b.



Slika 20: Analiza produktov PCR po fuziji promotorja PR1b iz različnih kultivarjev krompirja s fluorescenčnim proteinom

1-% agarozni gel. V prvi jamici je velikostna lestvica MassRuler™ DNA Ladder Mix na kateri sta označeni velikosti 2500 in 1500 bp. Sledijo produkti PCR združenih promotorjev PR1b in fluorescenčnih proteinov mCherry ali YFP. C je negativna kontrola. Vsak vzorec je v dveh jamicah.

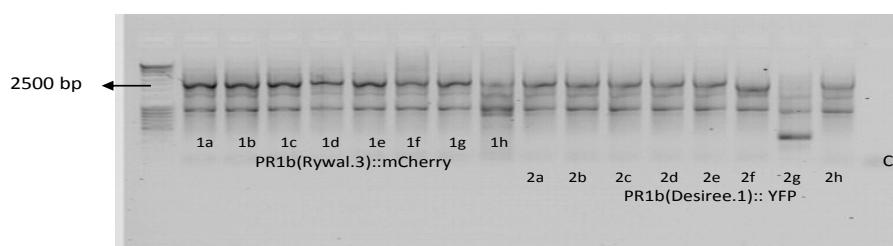
Povprečna koncentracija DNA po izolaciji iz gela je znašala okoli 40 ng/μl.

4.2.2 Potrditev konstrukta v vstopnem plazmidu pENTR v transformiranih bakterijah *E. coli*

Konstrukte promotorjev s fluorescenčnim proteinom smo vnesli v plazmid pENTR. Po transformaciji One Shot® TOP10 kemijsko kompetentnih celic bakterije *E. coli* s plazmidi, ki so vsebovali naš konstrukt, so na gojišču z ustreznimi antibiotiki za posamezen konstrukt preko noči zrasle kolonije transformiranih bakterij. Na vsaki je bilo od 1 do 200 kolonij, odvisno od količine razmazane transformacijske mešanice.

Da bi potrdili prisotnost konstrukta v plazmidu pENTR/D-TOPO® v bakteriji *E. coli*, smo naredili PCR iz bakterijske kolonije. Naključno smo izbrali nekaj kolonij za posamezni konstrukt. Velikosti smo preverili z agarozno gelsko elektroforezo. Pričakovana velikost produkta PCR konstrukta PR1b::fluorescenčni protein je bila 2600 bp, konstrukta TGA2::fluorescenčni protein pa 2500 bp. Dodatnih 300 bp je posledica pomnoževanja konstrukta z začetnim oligonukleotidom M13F in M13R, ki sta na začetek in konec konstrukta dodala še vsak približno 150 bp, skupno približno 300 bp (Sl. 20).

Vključitev konstrukta v plazmid smo dokazali v vseh kolonijah za konstrukt PR1b(Rywal.3)::mCherry, v petih kolonijah za konstrukt PR1b(Desiree.1)::YFP in v vseh kolonijah za konstrukt TGA2::fluorescenčni protein.



Slika 21: Analiza produktov PCR iz bakterijske kolonije *E. coli* za določanje prisotnosti konstrukta v plazmidu pENTR

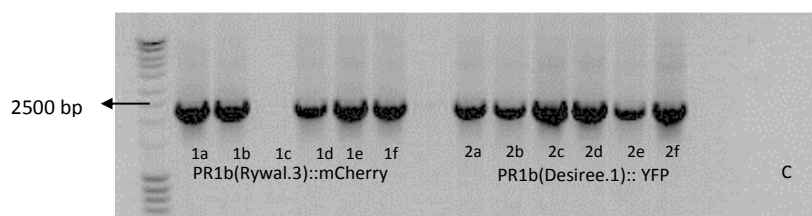
1-% agarozni gel. V prvi jamici je velikostna lestvica MassRuler™ DNA Ladder Mix z označeno velikostjo 2500 bp. Sledijo produkti PCR konstrukta PR1b s fluorescenčnim proteinom v plazmidu pENTR. Pri vsakem konstruktumu smo preverili osem bakterijskih kolonij (a-h). C je negativna kontrola. S pomočjo AGE smo določili prisotnost konstrukta v vstopnem vektorju.

Izbrane bakterije smo namnožili v prekonočnih kulturah in izolirali plazmide. Povprečna koncentracija DNA po izolaciji je znašala okoli 150 ng/μl.

4.2.3 Potrditev konstruktov v ciljnim plazmidu v transformiranih bakterijah *E. coli*

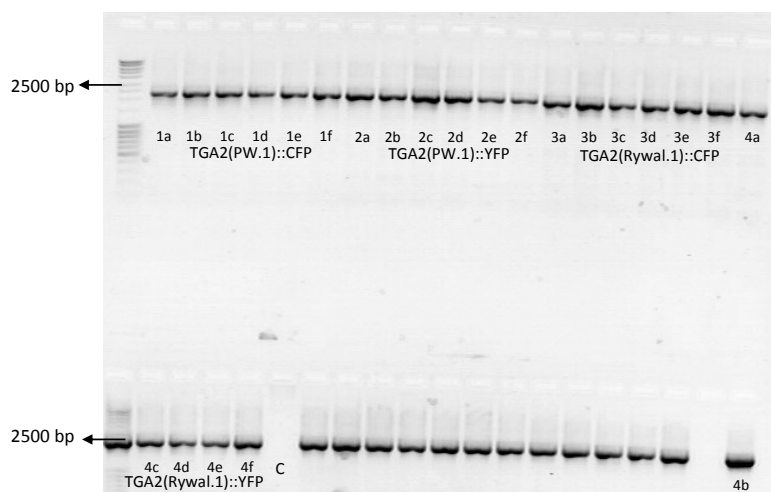
Z uporabo sistema Gateway® za rekombinacijsko kloniranje z LR-reakcijo smo pripravili ciljni binarni plazmid za agroinfiltracijo rastlin. Konstrukt PR1b::fluorescenčni protein smo vnesli v ciljni plazmid pH7WG, konstrukt TGA2::fluorescenčni protein pa v ciljni plazmid pK7WG. Po transformaciji kemijsko kompetentnih bakterij je na gojišču z ustrezno selekcijo zraslo najmanj 50 kolonij.

Za potrditev konstruktov v ciljnim vektorju po transformaciji kemijsko kompetentnih celic bakterije *E. coli* One Shot® TOP10 smo naredili PCR na osnovi kolonije iz 6 naključno izbranih kolonij in pri vseh potrdili ustrezn vključek, z izjemo konstrukta PR1b::mCherry, pri katerem smo prisotnost in ustrežno velikost potrdili v petih kolonijah (Sl. 21, 22).



Slika 22: Analiza produktov PCR iz bakterijske kolonije *E. coli* za določanje prisotnosti konstrukta PR1b v plazmidu pH7WG

1-% agarozni gel. V prvi jamici je velikostna lestvica MassRuler™ DNA Ladder Mix z označeno velikostjo 2500 bp. Sledijo produkti PCR konstrukta PR1b s fluorescenčnim proteinom v plazmidu pH7WG. Pri vsakem konstruktu smo preverili 6 bakterijskih kolonij (a-f). C je negativna kontrola. S pomočjo AGE smo določili prisotnost konstruktov v ciljnim vektorju.



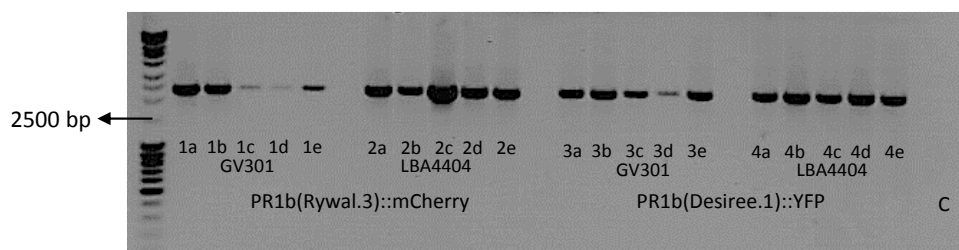
Slika 23: Analiza produktov PCR iz bakterijske kolonije *E.coli* za določanje prisotnosti konstrukta TGA2 v plazmidu pK7WG

1-% agarozni gel. V prvi jamici je velikostna lestvica MassRuler™ DNA Ladder Mix z označeno velikostjo 2500 bp. Sledijo produkti PCR konstrukta TGA2 s fluorescenčnim proteinom v plazmidu pK7WG. Pri vsakem konstruktumu smo preverili 6 bakterijskih kolonij (a-f). C je negativna kontrola. Vzorci, ki niso označeni, so del drugega poskusa. S AGE smo določili prisotnost konstrukta v ciljnem vektorju.

Iz prekonončne kulture ustrezno transformiranih bakterijskih celic *E.coli* smo nato izolirali plazmide, s koncentracijo približno 120 ng/μl in 100 ng plazmida elektroporirali v bakterijo *A. tumefaciens* sevov GV3101 in LBA4404.

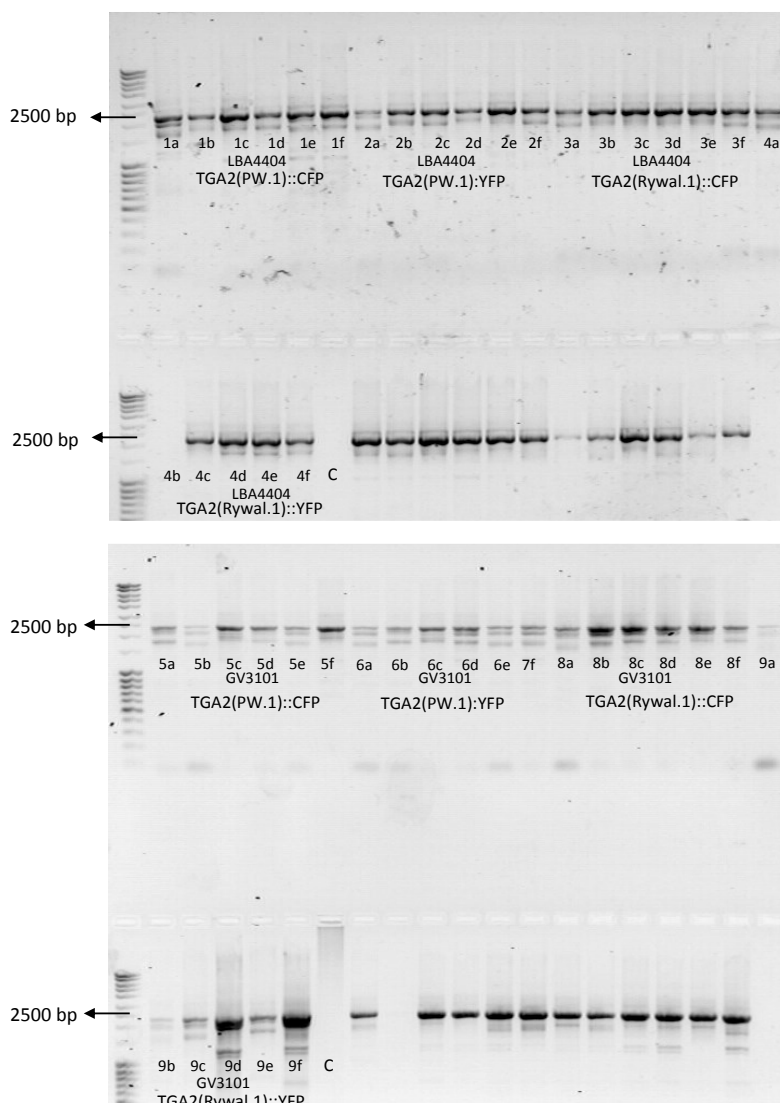
4.2.4 Potrditev konstrukta v ciljnem plazmidu v transformiranih bakterijah *A. tumefaciens*

Po transformaciji elektrokompetentnih bakterij *A. tumefaciens* je na gojišču z ustrezno selekcijo zraslo najmanj 50 kolonij. Za potrditev plazmidnih vektorjev pH7WG in pK7WG z vstavljenim konstruktumu s pomočjo elektroporacije smo naredili PCR na osnovi kolonije iz naključno izbranih kolonij na gojišču z antibiotiki in pri vseh, razen pri koloniji 4b, potrdili prisotnost in ustrezno velikost konstrukta (Sl. 23, 24, 25).



Slika 24: Analiza produktov PCR iz bakterijske kolonije *A. tumefaciens* za določanje prisotnosti konstrukta PR1b v plazmidu pH7WG

1-% agarozni gel. V prvi jamici je velikostna lestvica MassRuler™ DNA Ladder Mix z označeno velikostjo 2500 bp. Sledijo produkti PCR konstrukta PR1b s fluorescenčnim proteinom v plazmidu pH7WG. Pri vsakem konstruktumu smo preverili 5 bakterijskih kolonij (a-e). C je negativna kontrola. S pomočjo AGE smo določili prisotnost konstruktov v ciljnim vektorju.



Slika 25: Analiza produktov PCR iz bakterijske kolonije bakterije *A. tumefaciens* za določanje prisotnosti konstrukta TGA2 v plazmidu pK7WG

1-% agarozni gel. V prvi jamici je velikostna lestvica MassRuler™ DNA Ladder Mix z označeno velikostjo 2500 bp. Sledijo produkti PCR konstrukta TGA2 s fluorescenčnim proteinom v plazmidu pK7WG. Pri vsakem konstruktumu smo preverili 6 bakterijskih kolonij (a-f). C je negativna kontrola. Vzorci, ki niso označeni, so del drugega poskusa. S pomočjo elektroforeznega gela smo določili prisotnost konstruktov v ciljnem vektorju. PW je oznaka za PW363.

Za nadaljnje delo smo pri vsakem konstruktumu izbrali 3 bakterijske kolonije, za katere smo dokazali, da vsebujejo konstrukt in iz njih pripravili trajne kulture, ki smo jih uporabili za transformacijo rastlin.

4.3 TRANSFORMACIJA RASTLIN

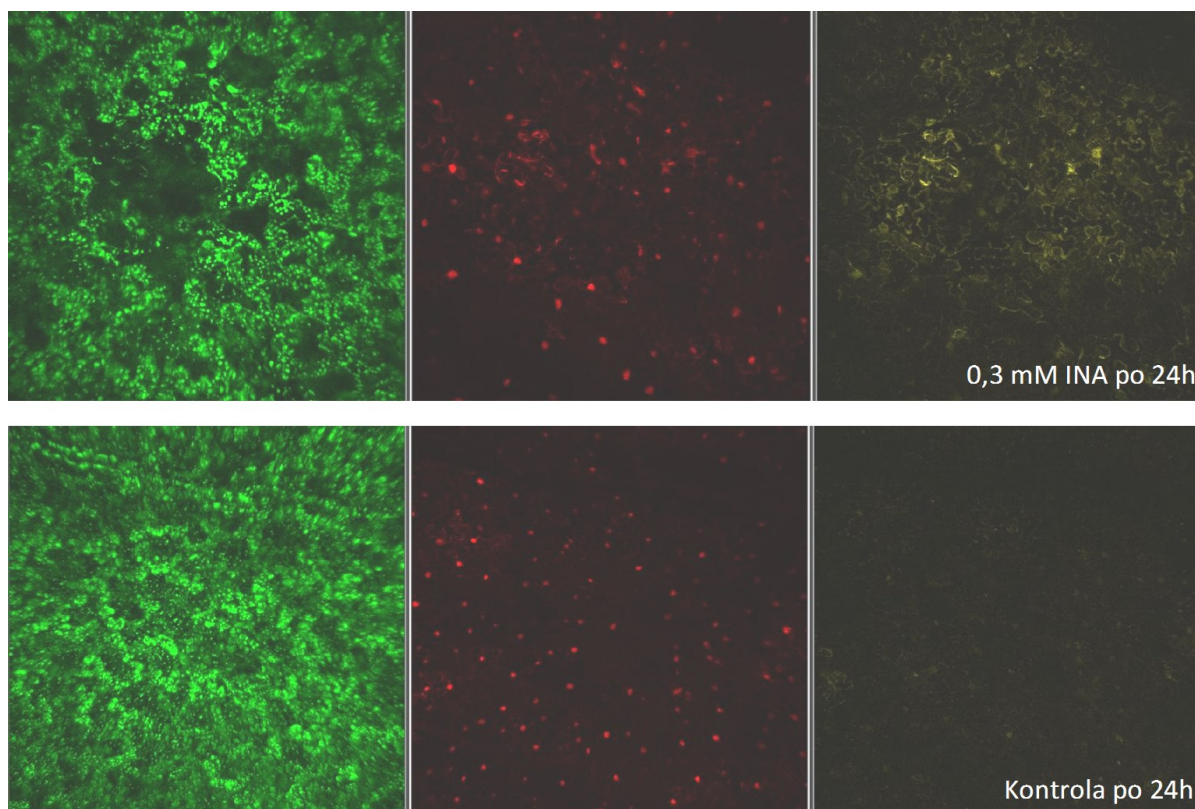
4.3.1 Prehodna transformacija modelne rastline / agroinfiltracija

4.3.1.1 Indukcija izražanja gena TGA2 po tretiranju z INA v modelni rastlini

Liste rastlin tobaka *N. benthamiana*, v katere smo z agroinfiltracijo vnesli plazmid pK7WG, ki je vseboval promotor TGA2(Rywal.1) v fuziji z YFP, smo uporabili za spremljanje izražanja fluorescenčnega proteina pod promotorjem gena TGA2. Kot pozitivno kontrolo smo v list poleg omenjenega plazmida vnesli plazmid, ki je vseboval gen H2B v fuziji z RFP, za katerega vemo, da se kopiči v jedru celic.

Liste smo štiri dni po agroinfiltraciji tretirali z 0,3 mM INA in po 24 urah spremljali izražanje proteina YFP pod konfokalnim mikroskopom. Kot negativni kontroli smo uporabili agroinfiltriran list, tretiran z 1-% etanolom, v katerem je bila pripravljena tudi raztopina INA, in netretiran agroinfiltriran list.

Po tretiranju agroinfiltriranega lista z 1-% etanolom smo zaznali šibko fluorescenco. Po tretiranju lista z 0,3 mM INA je bila opazna močnejša fluorescenca, zato predvidevamo, da je prišlo do indukcije promotorja TGA2 in izražanja YFP (Sl. 26).



Slika 26: Izražanje proteina YFP pod promotorjem gena TGA2(Rywal.1) po tretiranju z 0,3 mM INA

Slika povrhnjice listov *N. benthamiana* tretiranih z 0,3 mM INA in 1-% etanolom (kontrola) po 24 urah, posneta s konfokalnim mikroskopom. Levo je prikazana emisija klorofila (570-630 nm), v sredini emisija jedrnega proteina v fuziji z RFP (570-630 nm) in desno emisija proteina TGA2 v fuziji z YFP (525-550 nm).

4.3.1.2 Indukcija izražanja gena PR1b z INA v modelni rastlini

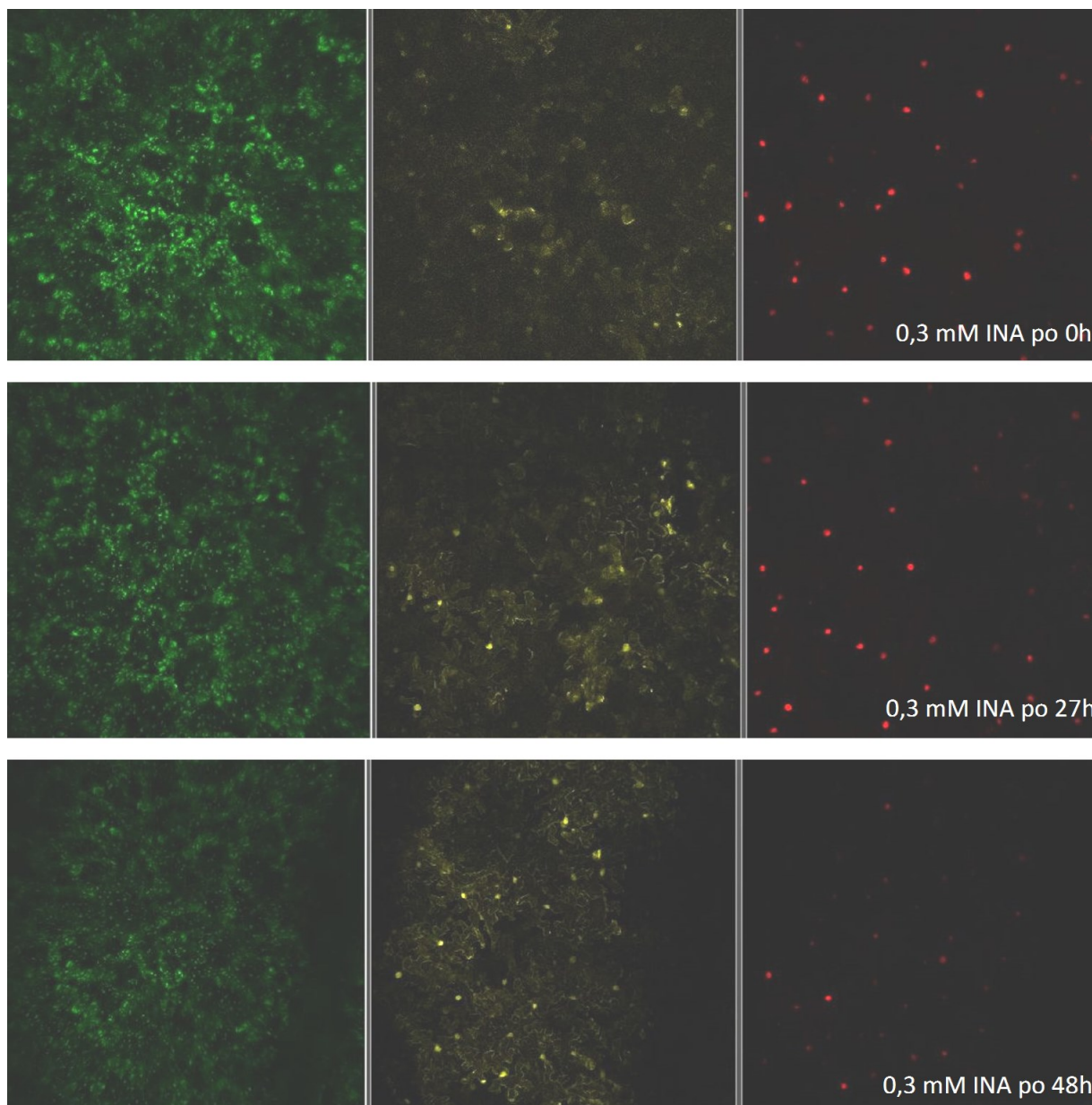
Liste rastlin tobaka *N. benthamiana*, v katere smo z agroinfiltracijo vnesli plazmid pH7WG, ki je vseboval promotor PR1b (Desiree.1) v fuziji z YFP, smo uporabili za spremljanje aktivnosti promotorja. Kot pozitivno kontrolo smo v list poleg omenjenega plazmida vnesli plazmid, ki je vseboval gen H2B v fuziji z RFP, za katerega vemo, da se kopiči v jedru celic.

Liste smo štiri dni po agroinfiltraciji tretirali z 0,3 mM in 1 mM INA ter po 0, 27 in 48 urah času spremljali izražanje promotorja pod konfokalnim mikroskopom.

Pri tretiranju z 0,3 mM INA smo po opazili dinamične spremembe signala proteina YFP. Po 0 h so bile opazne le rahle rumene lise, ki predstavljajo ozadje. Po 27 urah so bili opazni robovi celic (lokalizacija citoplazme) in jedro, ob katere je stisnjena citoplazma, v kateri se

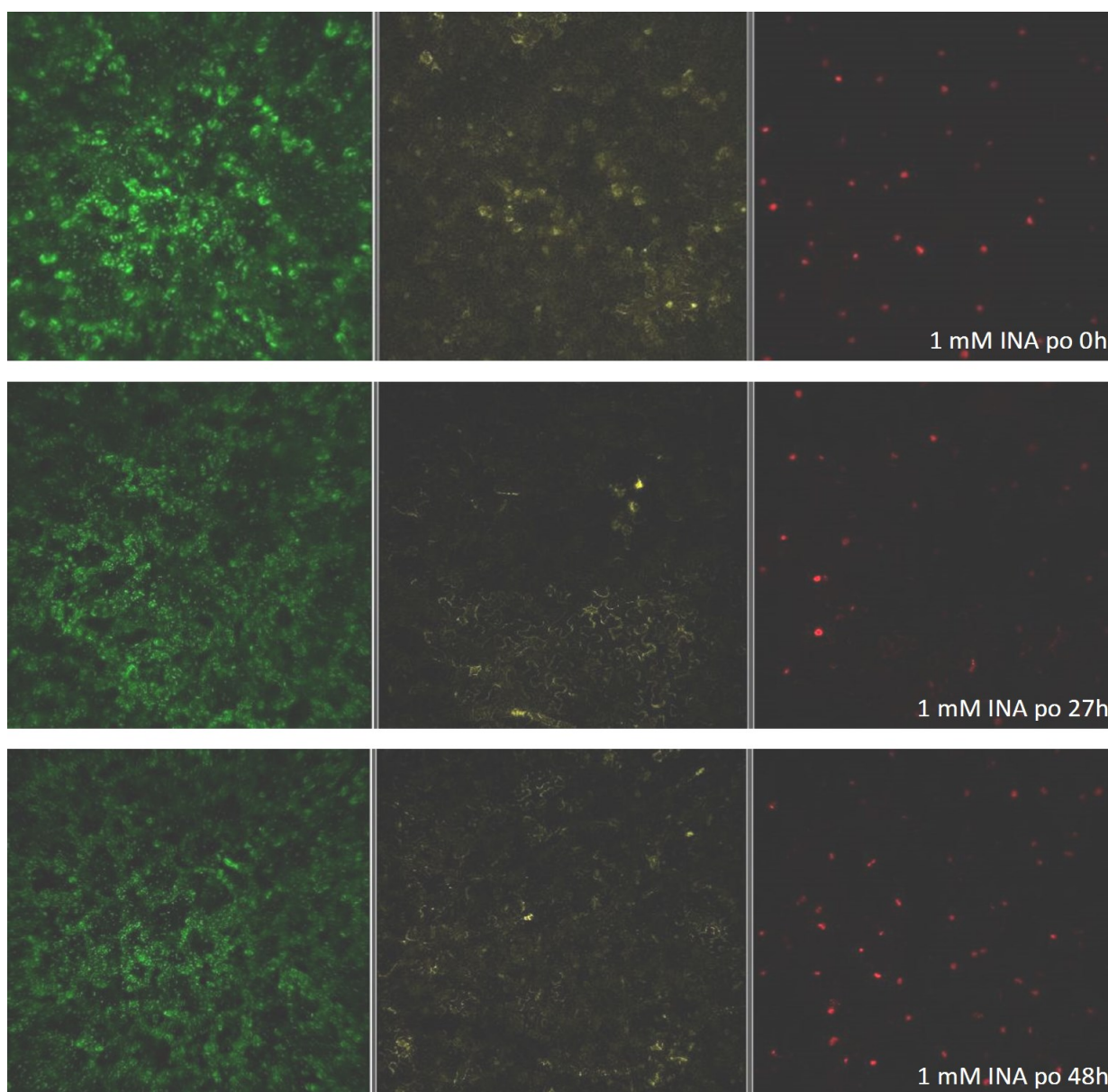
izraža YFP. Po 48 urah, glede na rezultate po 27 urah, nismo opazili sprememb fluorescence (Sl. 27).

Takoj po tretiranju z 1 mM INA ni bilo opazne fluorescence, po 27 urah pa so bili vidni robovi celic, ob katere je stisnjena citoplazma, v kateri se izraža YFP. Po 48 urah fluorescenca proteina YFP izginja (Sl. 28).



Slika 27: Izražanje proteina YFP pod promotorjem gena PR1b(Desiree.1) po tretiranju z 0,3 mM INA

Slika povrhnjice listov *N. benthamiana* tretiranih z 0,3 mM INA, po 0, 27 in 48 urah, posneta s konfokalnim mikroskopom. Levo je prikazana emisija klorofila (570-630 nm), v sredini emisija proteina PR1b v fuziji z YFP (525-550 nm) in desno emisija jedrnega proteina v fuziji z RFP (570-630 nm).



Slika 28: Izražanje proteina YFP pod promotorjem gena PR1b(Desiree.1) po tretiranju z 1 mM INA

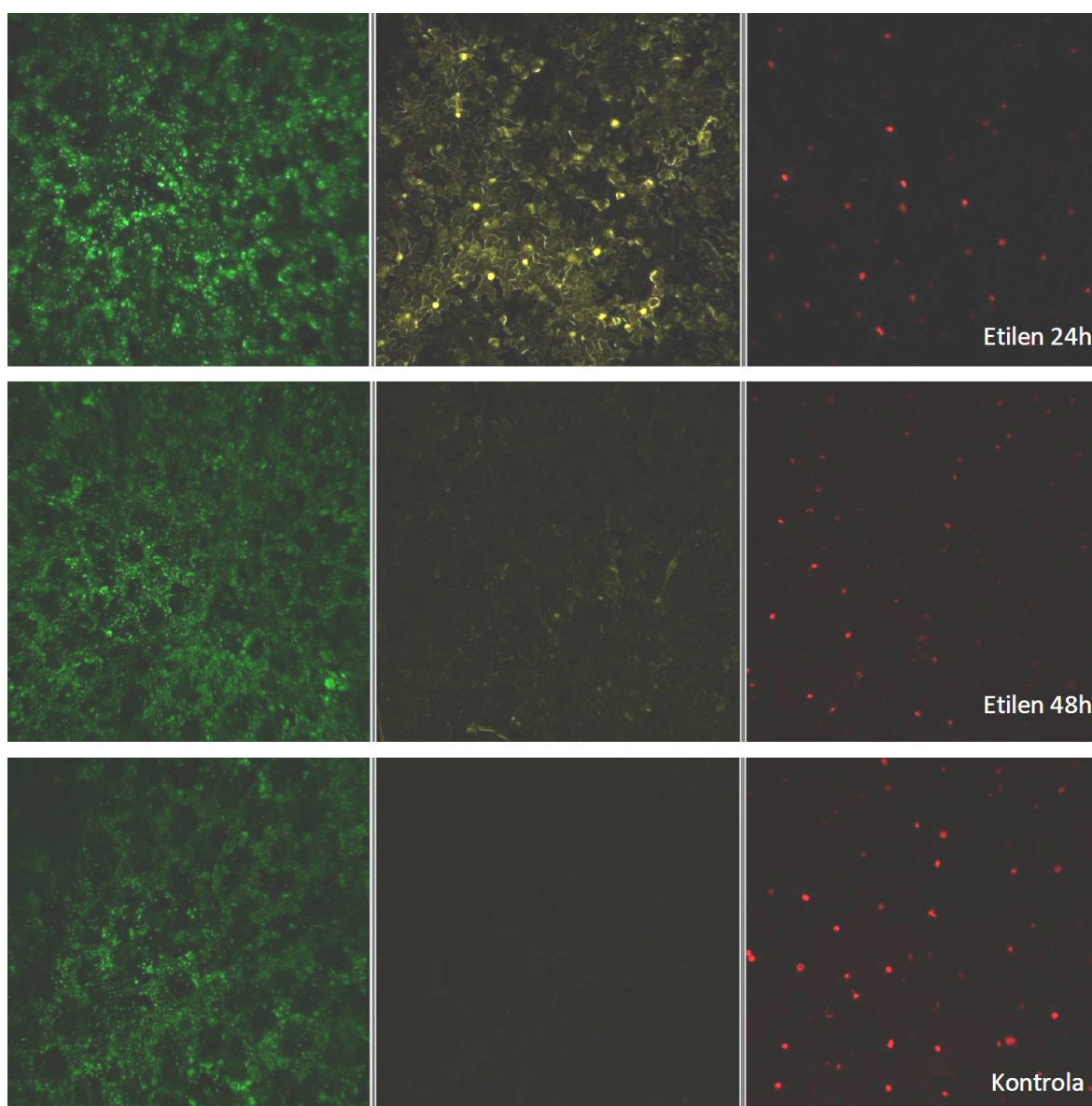
Slika povrhnjice listov *N. benthamiana* tretiranih z 1 mM INA po 0, 27 in 48 urah, posneta s konfokalnim mikroskopom. Levo je prikazana emisija klorofila (570-630 nm), v sredini emisija proteina PR1b v fuziji z YFP (525-550 nm) in desno emisija RFP (570-630 nm).

4.3.1.3 Indukcija izražanja promotorja gena PR1b z etilenom in MeJA v modelni rastlini

Liste rastlin tobaka *N. benthamiana*, v katere smo z agroinfiltracijo vnesli plazmid pK7YWG, ki je vseboval promotor PR1b(Desiree.1) v fuziji z YFP, smo uporabili za spremljanje aktivnosti promotorja. Kot pozitivno kontrolo smo v list poleg omenjenega plazmida vnesli plazmid, ki je vseboval gen H2B v fuziji z RFP, za katerega vemo, da se kopiči v jedru celic. Kot negativno kontrolo smo uporabili agroinfiltrano rastlino, zaprto v komori z normalno atmosfero.

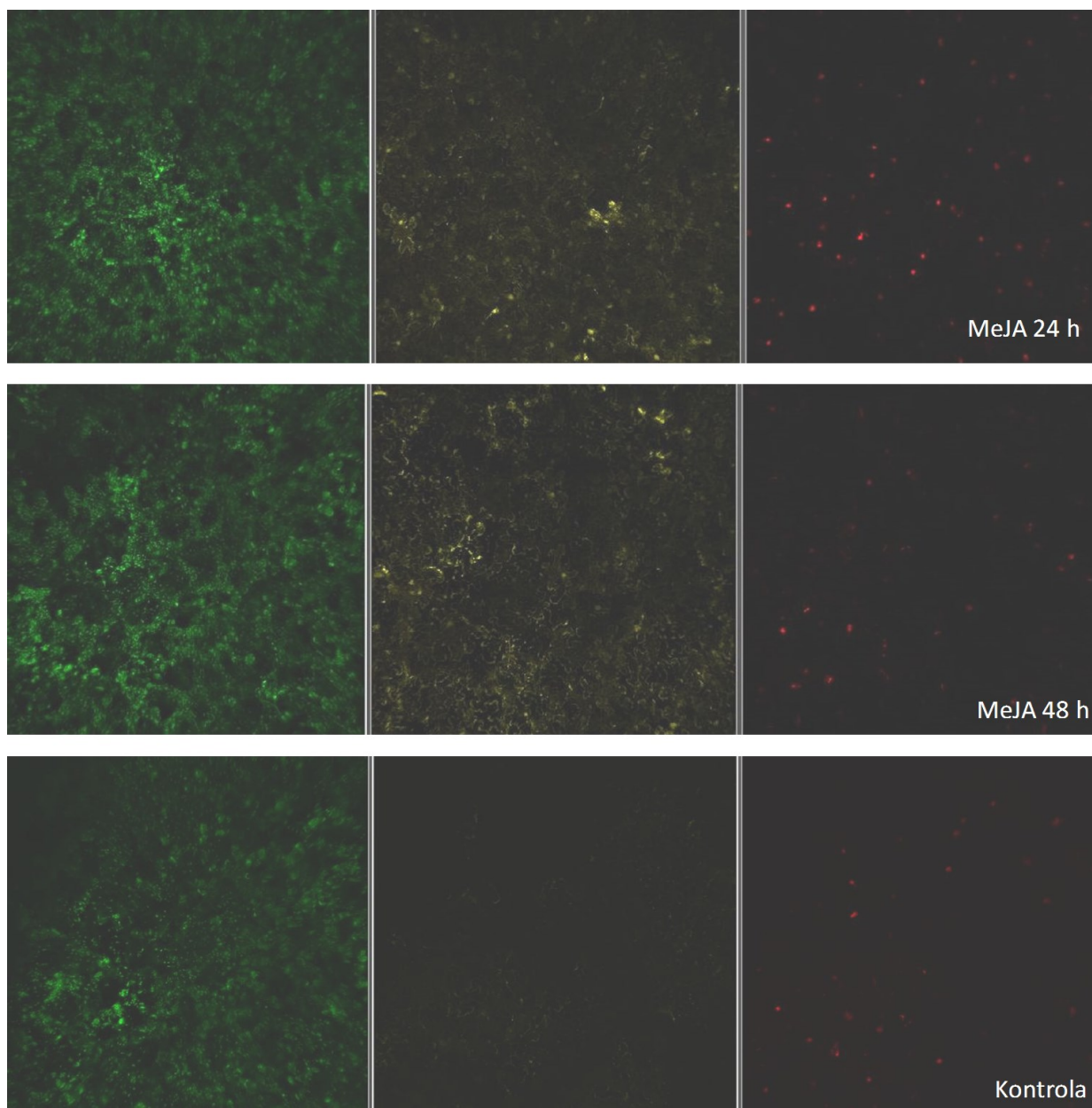
Liste smo štiri dni po agroinfiltraciji tretirali etilenom in MeJA ter po 24 in 48 urah spremljali izražanje proteina YFP pod promotorjem gena PR1b pod konfokalnim mikroskopom.

Pri kontroli smo opazili šibko fluorescenco proteina YFP. Po tretiranju z etilenom smo po 24 urah zaznali fluorescenco, v obliki rumenih list, ki predstavljajo ozadje, robove celičnih sten, ob katere je stisnjena citoplazma s proteini YFP in jedra, ki jih prav tako obdaja citoplazma. Fluorescenca je po 48 urah nismo več zaznali (Sl. 29). Pri tretiranju z z MeJA flouescene nismo opazili (Sl. 30).



Slika 29: Izražanje proteina YFP pod promotorjem gena PR1b(Desiree.1) po tretiranju z etilenom

Slika povrhnjice listov *N. benthamiana* tretiranih z etilenom po 24 in 48 urah ter kontrola posneta s konfokalnim mikroskopom. Levo je prikazana emisija klorofila (570-630 nm), v sredini emisija proteina PR1b v fuziji z YFP (525-550 nm) in desno emisija RFP (570-630 nm).



Slika 30: Izražanje proteina YFP pod promotorjem gena PR1b(Desiree.1) po tretiranju z MeJA

Slika povrhnjice listov *N. benthamiana* tretiranih z etilenom po 24 in 48 urah ter kontrola posneta s konfokalnim mikroskopom. Levo je prikazana emisija klorofila (570-630 nm), v sredini emisija proteina PR1b v fuziji z YFP (525-550 nm) in desno emisija RFP (570-630 nm).

4.3.2 Stabilna transformacija

Pri stabilni transformaciji smo izsečke okužili z bakterijami in čakali, da na gojišču s selekcijo iz njih zrastejo transgeni poganjki. Vsaka transformacija je imela tudi dve pozitivni in negativno kontrolo. Pri prvi pozitivni kontroli, kjer izsečkov nismo izpostavili bakterijam in selekciji, smo pričakovali rast rastlin. Pri drugi pozitivni kontroli, kjer smo izsečke izpostavili bakterijam, ne pa selekciji, smo pričakovali rast rastlin. Pri negativni kontroli, kjer smo izsečke izpostavili le selekciji, nismo pričakovali rasti. Odpornost na selekcijo naj bi rastlini posredovale bakterije preko vnesenega plazmida, skupaj s pripravljenim konstruktom za spremljanje aktivnosti izbranih genov.

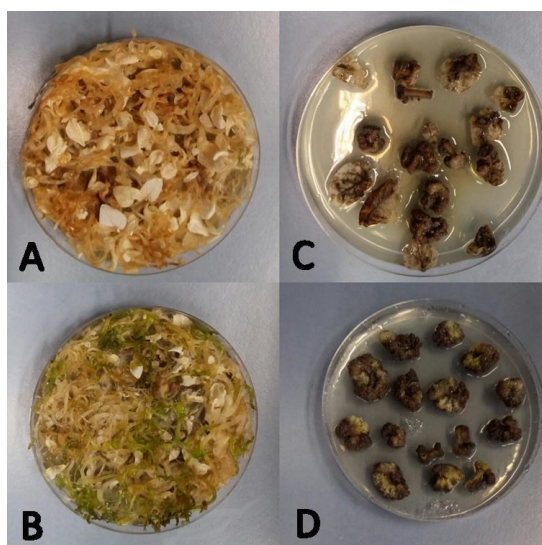
4.3.2.1 Transformacija sorte Rywal

Za transformacijo krompirja sorte Rywal smo uporabili listke in internodije štiri tedne starih rastlin. Poskus smo ponovili trikrat, pri čemer smo uporabili različne konstrukte (Pregl. 20).

4.3.2.1.1 Stabilna transformacija sorte Rywal s konstruktom PR1b(Desiree.1)::YFP

Transformacijo smo izvedli z bakterijo *A. tumefaciens* seva LBA4404, ki je vsebovali plazmid pH7WG s konstruktom PR1b(Desiree.1)::YFP. Za selekcijo smo uporabili antibiotik higromicin s koncentracijo 20 mg/l.

Prve poganjke smo opazili 4 tedne po transformaciji. Kontrole so zrasle v skladu s pričakovanji (Sl. 31, petrijevka A, B, C), zato smo pričakovali rast transgenih poganjkov v petrijevki D. Iz izsečkov so se po 7 tednih razvili rjavi kalusi in rasti poganjkov ni bilo, zato sklepamo, da je bila transformacija neuspešna (Sl. 31, petrijevka D).



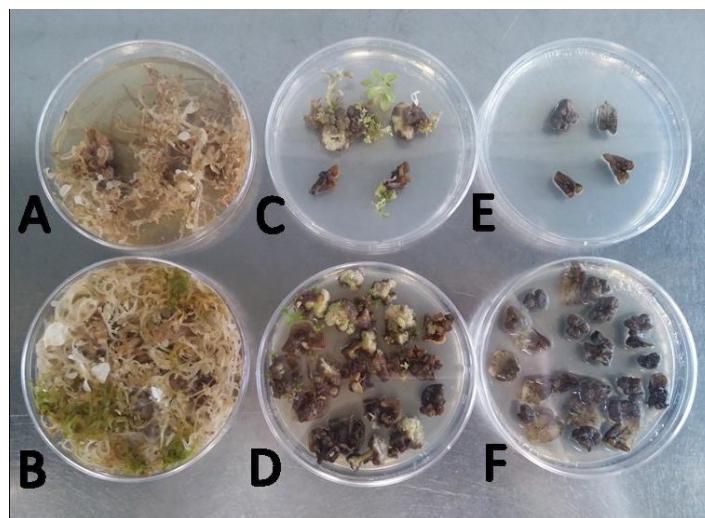
Slika 31: Izsečki na koncu poskusa stabilne transformacije krompirja sorte Rywal s konstruktom PR1b(Desiree.1)::YFP

Konstrukto PR1b(Desiree.1)::YFP. Petrijevka A – pozitivna kontrola: z bakterijami in brez selekcije, rast je v skladu s pričakovanji; petrijevka B – pozitivna kontrola: brez bakterij in brez selekcije, rast je v skladu s pričakovanji; petrijevka C – negativna kontrola: brez bakterij, s selekcijo 20 mg/l higromicina, rast je v skladu s pričakovanji; petrijevka D – transformacija s selekcijo 20 mg/l higromicina, pričakovana rast transgenih poganjkov, do česar ni prišlo.

Ponovili smo poskus prve transformacije, pri tem pa spremenili koncentracijo antibiotika, uporabili smo dve koncentraciji in sicer 4 in 15 mg/l.

Prve poganjke smo na kontrolnih petrijevkah opazili 4 tedne po transformaciji. Pozitivni kontroli sta zrasli v skladu s pričakovanji (Sl. 32, petrijevka A in B), prav tako tudi negativna kontrola z višjo koncentracijo higromicina ($c = 15$ mg/l) (Sl. 32, petrijevka E). Pri tej koncentraciji smo pričakovali rast transgenih poganjkov, vendar je bila transformacija neuspešna, saj so izsečki zopet postali rjavi in poganjki niso zrasli (Sl. 32, petrijevka F).

Poganjki pa so zrasli na negativni kontroli z nižjo koncentracijo higromicina ($c = 4$ mg/l) (Sl. 32, petrijevka C), kjer rasti nismo pričakovali. Pri tej koncentraciji se je večina izsečkov razvila v rjavo zelene kaluse, zraslo je tudi nekaj poganjkov (Sl. 32, petrijevka D).



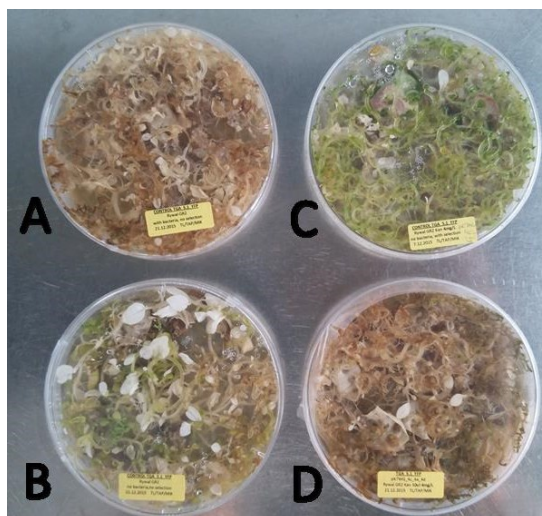
Slika 32: Izsečki na koncu poskusa stabilne transformacije krompirja sorte Rywal s konstruktom PR1b(Desiree.1)::YFP

Konstrukto PR1b(Desiree.1)::YFP. Petrijevka A – pozitivna kontrola: z bakterijami in brez selekcije, rast je v skladu s pričakovanji, petrijevka B – pozitivna kontrola: brez bakterij in brez selekcije, rast je v skladu s pričakovanji; petrijevka C – negativna kontrola: brez bakterij, s selekcijo 4 mg/l higromicina, rast ni v skladu s pričakovanji, zraslo je nekaj poganjkov; petrijevka D – transformacija s selekcijo 4 mg/l higromicina, rast je v skladu s pričakovanji; petrijevka E – negativna kontrola: brez bakterij, s selekcijo 15 mg/l higromicina, rast je v skladu s pričakovanji; petrijevka F – transformacija s selekcijo 15 mg/l higromicina, pričakovana rast transgenih poganjkov, kjer pa do tega ni prišlo.

4.3.2.1.2 Stabilna transformacija sorte Rywal s konstruktom TGA2(Rywal.1)::YFP

Transformacijo smo izvedli z bakterijo *A. tumefaciens* seva LBA4404, ki je vsebovala plazmid pK7WG s konstruktom TGA2(Rywal.1)::YFP. Za selekcijo smo izbrali antibiotik kanamicin z dvema koncentracijama, in sicer 4 in 15 mg/l.

Pozitivni kontroli sta zrasli v skladu s pričakovanji (Slika 33, petrijevka A in B). Na negativni kontroli (Sl. 33, petrijevka C) so nepričakovano zrasli poganjki, kar je verjetno posledica prenizke koncentracije antibiotika. Tudi na gojišču z deli rastlin tretiranih z bakterijo in pod selekcijskim pritiskom je zraslo nekaj poganjkov (Sl. 33, petrijevka D). Za te predvidevamo, da je poleg pobeglih poganjkov zraslo tudi nekaj transgenih poganjkov, kar pa bi morali v nadaljevanju preveriti.



Slika 33: Izsečki na koncu poskusa stabilne transformacije krompirja sorte Rywal s konstruktom TGA2(Rywal.1)::YFP

Konstrukt TGA2(Rywal.1)::YFP. Petrijevka A – pozitivna kontrola: z bakterijami in brez selekcije, rast je v skladu s pričakovanji; petrijevka B – pozitivna kontrola: brez bakterij in brez selekcije, rast je v skladu s pričakovanji; petrijevka C – negativna kontrola: brez bakterij, s selekcijo 4 mg/l kanamicina, rast ni v skladu s pričakovanji, saj so zrasli poganjki; petrijevka D – transformacija s selekcijo 4 mg/l kanamicina, rast je v skladu s pričakovanji.

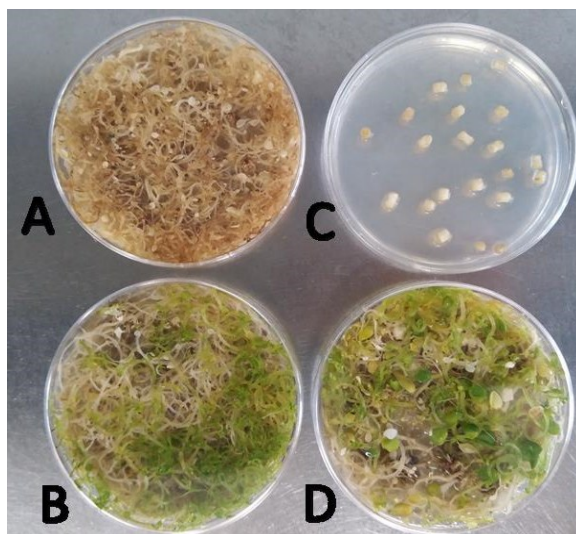
4.3.2.2 Stabilna transformacija sorte Désirée

Za transformacijo krompirja sorte Désirée smo uporabili internodije štiri tedne starih rastlin. Poskus smo ponovili trikrat, pri čemer smo uporabili različne konstrukte (Pregl. 21)

4.3.2.2.1 Stabilna transformacija sorte Désirée s konstruktom TGA2(Rywal.1)::YFP

Transformacijo smo izvedli z bakterijo *A. tumefaciens* seva LBA4404, ki je vsebovali plazmid pK7WG s konstruktom TGA2(Rywal.1)::YFP. Za selekcijo smo izbrali antibiotik kanamicin s koncentracijo 100 mg/l.

Prve poganjke smo opazili 2 tedna po transformaciji. Izsečki so na vseh petrijevkah zrasli v skladu s pričakovanji, zato predvidevamo, da je bila transformacija uspešna (Sl. 34).



Slika 34: Izsečki na koncu poskusa stabilne transformacije krompirja sorte Désirée s konstruktom TGA2(Rywal.1)::YFP

Konstruktor TGA2(Rywal.1)::YFP. Petrijevka A – pozitivna kontrola: z bakterijami in brez selekcije, rast je v skladu s pričakovanji; petrijevka B – pozitivna kontrola: brez bakterij in brez selekcije, rast je v skladu s pričakovanji; petrijevka C – negativna kontrola: brez bakterij, s selekcijo 100 mg/l kanamicina, rast je v skladu s pričakovanji; petrijevka D – stabilna transformacija s selekcijo 100 mg/l kanamicina, rast je v skladu s pričakovanji.

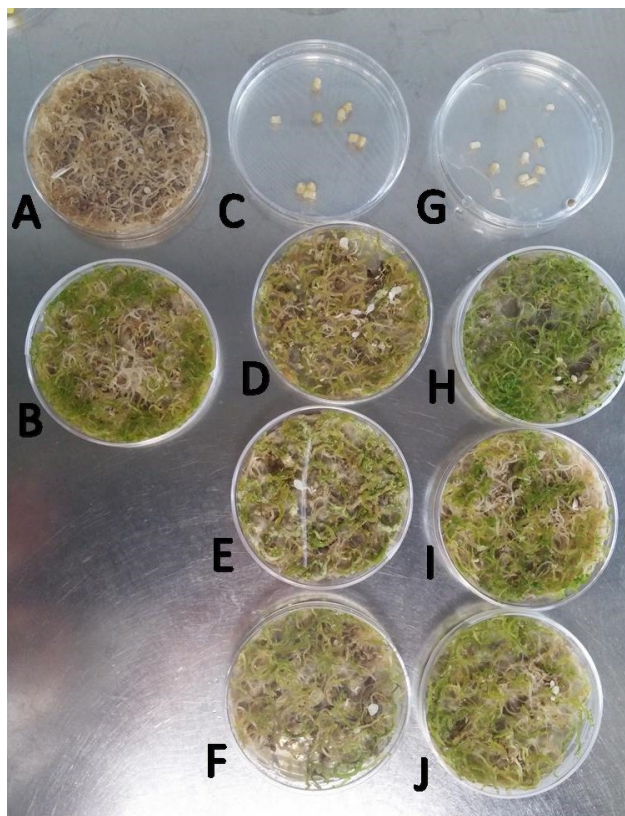
4.3.2.2.2 Stabilna transformacija sorte Désirée s konstruktom TGA2(Rywal.1)::CFP

Transformacijo smo izvedli z bakterijo *A. tumefaciens* seva LBA4404, ki je vsebovali plazmid pK7WG s konstruktom TGA2(Rywal.1)::CFP. Za selekcijo smo izbrali antibiotik kanamicin z dvema koncentracijama, in sicer 20 in 100 mg/l. Pri tem smo preverili ali je uspešnost transformacije odvisna od časa namakanja v bakterijski kulturi in od bolj izpostavljene površine rastlinskega materiala.

Prve poganjke smo opazili 2 tedna po transformaciji. Izsečki so na vseh petrijevkah zrasli skladu s pričakovanji, zato predvidevamo, da je bila transformacija uspešna. Transgeni poganjki so zrasli tako pri nižji ($c = 20$ mg/l) (Sl. 35, petrijevka D, E, F) kot tudi pri višji ($c = 100$ mg/l) (Sl. 35, H, I, J) koncentraciji kanamicina.

V rasti poganjkov oziroma uspešnosti transformacije ni opaznih razlik med izsečki, ki smo jih v bakterijski kulturi namakali 5 (Sl. 35, petrijevka D, H) oziroma 10 minut (Sl. 35,

petrijevka E, I). Prav tako ni bilo opaznih razlik med prerezanimi in neprerezanimi izsečki (Sl. 35, petrijevka F, J).



Slika 35: Izsečki na koncu poskusa stabilne transformacije krompirja sorte Désirée s konstruktom TGA2(Rywal.1)::CFP

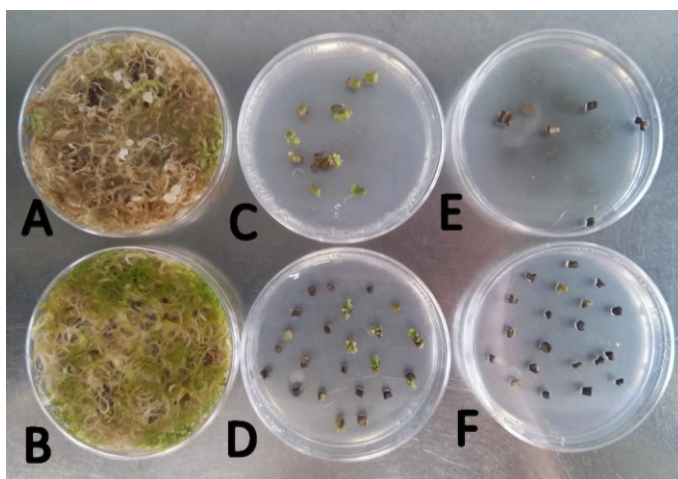
Konstrukat TGA2(Rywal.1)::CFP. Petrijevka A – pozitivna kontrola: z bakterijami in brez selekcije, rast je v skladu s pričakovanji; petrijevka B – pozitivna kontrola: brez bakterij in brez selekcije, rast je v skladu s pričakovanji; petrijevka C – negativna kontrola: brez bakterij, s selekcijo 20 mg/l kanamicina, rast je v skladu s pričakovanji; petrijevka D – transformacija s selekcijo 20 mg/l kanamicina, 5 minut namakanja v bakterijski kulturi, rast je v skladu s pričakovanji; petrijevka E – transformacija s selekcijo 20 mg/l kanamicina, 10 minut namakanja v bakterijski kulturi, rast je v skladu s pričakovanji; petrijevka F – transformacija s selekcijo 20 mg/l kanamicina, prerezani izsečki (10 minut namakanja v bakterijskih kulturah), rast je v skladu s pričakovanji; petrijevka G – negativna kontrola: brez bakterij, s selekcijo 100 mg/l kanamicina, rast je v skladu s pričakovanji; petrijevka H – transformacija s selekcijo 100 mg/l kanamicina, 5 minut namakanja v bakterijski kulturi, rast je v skladu s pričakovanji; petrijevka I – transformacija s selekcijo 100 mg/l kanamicina, 10 minut namakanja v bakterijski kulturi, rast je v skladu s pričakovanji; petrijevka J – transformacija s selekcijo 100 mg/l kanamicina, prerezani izsečki (10 minut namakanja v bakterijski kulturi), rast je v skladu s pričakovanji.

4.3.2.2.3 Stabilna transformacija sorte Désirée s konstruktom PR1b(Desiree.1)::YFP

Transformacijo smo izvedli z bakterijo *Agrobacterium tumefaciens* seva LBA4404, ki je vsebovala plazmid pH7WG s konstruktom PR1b(Desiree.1)::YFP. Za selekcijo smo izbrali antibiotik higromicin z dvema koncentracijama, in sicer 4 in 20 mg/l.

Prve poganjke smo opazili 4 tedne po transformaciji. Pozitivni kontroli sta zrasli v skladu s pričakovanji, kot tudi negativna kontrola z višjo koncentracijo higromicina ($c = 20$ mg/l). Pri tej koncentraciji smo pričakovali rast transgenih poganjkov, vendar so izsečki postali rjavi, zato predvidevamo, da je bila transformacija neuspešna (Sl. 36, petrijevka F).

Poganjki pa so zrasli na negativni kontroli z nižjo koncentracijo higromicina ($c = 4$ mg/l) (Sl. 36, petrijevka C), kjer rasti nismo pričakovali. Pri tej koncentraciji je tudi v petrijevki, kjer smo pričakovali transgene poganjke zraslo nekaj poganjkov.

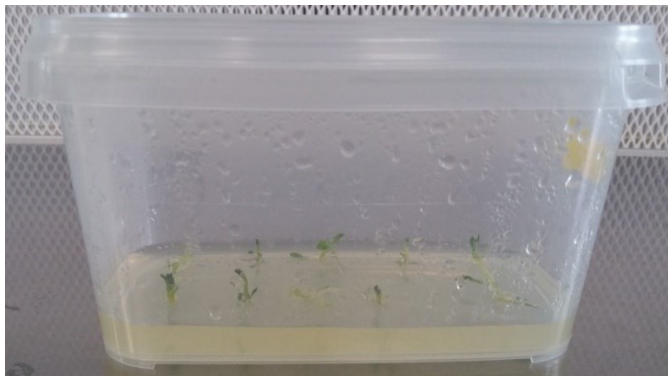


Slika 36: Izsečki na koncu poskusa stabilne transformacije krompirja sorte Désirée s konstruktom PR1b(Desiree.1)::YFP

Konstrukto PR1b(Desiree.1)::YFP. Petrijevka A – pozitivna kontrola: z bakterijami in brez selekcije, rast je v skladu s pričakovanji; petrijevka B – pozitivna kontrola: brez bakterij in brez selekcije, rast je v skladu s pričakovanji; petrijevka C – negativna kontrola: brez bakterij, s selekcijo 4 mg/l higromicina, rast ni v skladu s pričakovanji, saj je zraslo nekaj poganjkov; petrijevka D – transformacija s selekcijo 4 mg/l higromicina, rast je v skladu s pričakovanji; petrijevka E – negativna kontrola: brez bakterij, s selekcijo 20 mg/l higromicina, rast je v skladu s pričakovanji; petrijevka F – transformacija s selekcijo 20 mg/l higromicina, pričakovana rast transgenih poganjkov, vendar poganjki niso zrasli.

4.3.2.3 Prestavljanje transgenih poganjkov v banjice

Transgene poganjke smo porezali in prestavili v banjico z gojiščem MS15 in ustrezno selekcijo (Sl. 37). S tem smo potrdili prisotnost vključka v izbranih poganjkih.



Slika 37: Primer banjice z gojiščem MS15 s porezanimi poganjki s plošč.

5 RAZPRAVA

Namen našega dela je bilo preučevanje aktivnosti genov krompirja, ki so vpleteni v obrambni odgovor rastline. Poleg bioinformatičkih analiz promotorja PR1b iz genotipov Désirée, Rywal in PW363 smo izvedli tudi transformacijo rastlin, katere namen je opazovanje aktivnosti promotorjev izbranih genov preko izražanja fluorescenčnega proteina pod promotorjem preučevanih genov po aktivaciji rastlinske obrambe. V agrobakterije smo z elektroporacijo vnesli konstrukt promotorjev genov TGA2 oziroma PR1b iz omenjenih genotipov, v fuziji z različnimi fluorescenčnimi proteini. Prehodno transformacijo smo izvedli na rastlini *Nicotiana benthamiana*, stabilno transformacijo pa na krompirju, in sicer na kultivarjih Rywal in Désirée.

Zaradi visoke hranilne vrednosti in enostavne proizvodnje je krompir eden izmed glavnih kandidatov za izboljšanje pridelka s pomočjo rastlinske biotehnologije (Banerjee in sod., 2006). Genski inženiring je uveljavljena tehnologija za izboljšanje kmetijskih rastlin. S pomočjo agrobakterije lahko v rastlino vnesemo željene gene in ustvarimo rastline, ki imajo izboljšane lastnosti, ter povečano odpornost proti škodljivcem (Sidorov in sod., 1999). Transformacija rastlin pa je tudi najpogosteje uporabljeno orodje za študije funkcije genov (Tzfira & Citovsky, 2006). Rastlinska transformacija je najpogosteje izvedena s pomočjo agrobakterije. Pripravljene konstrukte smo vnesli v binarna plazmida pKH7W in pH7WG, ki sta del Gateway rekombinacijskega sistema ter jih elektoporirali v *Agrobacterium tumefaciens*. Za stabilno transformacijo smo uporabili sev LBA4404, za prehodno transformacijo pa sev GV3101.

Prehodna transformacija ali agroinfiltracija je učinkovita in hitra tehnika, s katero lahko spremljamo izražanje genov že nekaj dni po infiltraciji (Spakers in sod., 2006). V rastline smo infiltrirali agrobakterije, ki so vsebovale binarni vektor z vnešenim konstruktom promotorja gena PR1b oziroma TGA2 v fuziji s fluorescenčnim proteinom. Po transformaciji smo, ob tretiranju z različnimi kemikalijami in hormoni, spremljali izražanje fluorescenčnega proteina pod preučevanim promotorjem.

Za prehodno transformacijo smo izbrali tobak *N. benthamiana*. Aktivnost promotorjev pa smo za razliko od omenjenih člankov (Vornooij in sod., 1995; Schweizer in sod., 1997), ki so preučevali gena PR1 s qPCR, opazovali s konfokalnim mikroskopom, s katerim smo spremljali aktivnost promotorja na nivoju posameznih celic *in vivo*.

Za delo smo izbrali promotorje PR1b z dolžino približno 1600 bp. Lebel in sod. (1998) namreč trdijo, da mora biti nukleotidno zaporedje promotorja daljše od 621 bp, sicer promotor ni aktiven. S pomočjo mutacij in delecij promotorja PR1 *A. thaliana* so odkrili, da je promotor inducibilen z INA, če je dolg med 621 in 689 bp, znotraj tega zaporedja pa

moreta ležati regulatorna elementa LS10 in LS7. Dodatna zaporedja med 698 in 815 bp, ki jih vsebujejo daljši promotorji, prispevajo k boljši inducibilnosti z INA.

Kunz in sod. so že leta 1988 na kumari *Cucumis sativus* dokazali, da se ob tretiranju z INA, ob virusni okužbi ali napadu patogena, izražajo geni PR, ki so vpleteni v obrambni odziv rastline. Kasneje so uspešno indukcijo PR1 proteinov z različnimi koncentracijami INA dokazali v številnih rastlinah, pri tem pa so uporabili različne načine aplikacije INA. Vornooij in sod. (1995) navajajo, da so izražanje PR1 v *A. thaliana* zaznali že štiri ure po tretiranju in izražanje spremljali še nadaljnjih 72 ur. Liste štirih tednov starih rastline so poškropili z 0,325 μ M INA in spremljali koncentracijo mRNA PR1 ob različnih časih po tretiranju. V tobaku *N. tabacum*, kjer so v liste infiltrirali 0,7 mM INA, so izražanje mRNA PR1b zaznali po 8-16 urah, najvišjo koncentracijo pa so izmerili po 24 urah ter razgradnjo proteina PR1 zaznali po 32 urah. V obeh poskusih pa kljub povečani koncentraciji mRNA gena PR1 povečane koncentracije SA niso zaznali. Schweizer in sod. (1997) so dokazali, da je za izražanje PR1 proteinov potrebna zadostna koncentracija INA. Deset dni stare rastline riža *Oryza sativa* so zalivali z 0,53 μ M INA ter 1000-krat višjo koncentracijo INA (0,53 mM) in izražanje gena PR1 zaznali le po tretiranju z višjo koncentracijo, medtem ko so pri nižji koncentraciji zaznali izražanje genov PR drugih družin, in sicer PR5 in PR9.

Liste rastline smo poškropili z INA, pri tem pa izbrali nižjo (0,3 mM) in višjo (1 mM) koncentracijo. Izražanje smo spremljali takoj po tretiranju, 27 ur po tretiranju in 48 ur po tretiranju. YFP, ki je pod promotorjem gena PR1b, se izraža v citoplazmi. Fluorescenco v citoplazmi smo zaznali 27 ur po tretiranju, kar sovpadava z ugotovitvami Vornooija in sod., ki trdijo, da je izražanje PR1 proteina največje 24-32 ur po tretiranju. Po tretiranju z nižjo koncentracijo smo fluorescenco opazili tudi po 48 urah, po tretiranju z 1 mM INA pa ne.

Indukcijo z INA smo spremljali tudi preko promotorja gena TGA2, ki omogoči izražanje transkripcijskega faktorja, ki se veže na PR1. Sklepamo, da je za izražanje PR1b nujno tudi izražanje TGA2. Butterbrodt in sod. (2006) so na transformiranem tobaku preučevali aktivnost PR1 promotorja z vezavo TGA faktorja in ugotovili, da je prišlo do izražanja PR1 po 3-12 urah po tretiranju z SA. V našem poskusu smo rastline smo poškropili z 0,3 mM INA in po 24 urah opazovali fluorescenco. V primerjavi s kontrolo smo opazili močnejšo fluorescenco, zato domnevamo, da je prišlo do izražanja proteina YFP ter s tem izražanja transkripcijskega faktorja TGA2.

Promotorska zaporedja PR1b smo poravnali s pomočjo programa AlignX. Ugotovili smo, da se zaporedja razlikujejo tako med vrstami kot tudi znotraj vrste. Za boljše razumevanje raznolikosti smo zaporedja analizirali z različnimi orodji; Transfac in PlantCARE. Promotor PR1b(Desiree.1) ima v nukleotidnem zaporedju motiva CGTCA in TGACG, ki sodelujeta v odzivu na MeJA, zato smo rastline tretirali tudi z MeJA, vendar nismo opazili fluorescence.

Schweizer in sod. (1997) so na *Oryza sativa* preko določanja izražanja genov PR1 dokazali, da tako INA kot JA povzročita akumulacijo PR1 proteinov. Liste rastlin, ki so jih zalivali z različnimi koncentracijami INA, so poškropili z različnimi koncentracijami JA. Raztopino JA so pripravili v etanolu, zato jim je ta služil tudi kot kontrola. Kadar so rastline tretirali z obema kemikalijama hkrati, je bil učinek akumulacije PR1 proteinov sinergističen. Ugotovili so, da je moč učinka odvisna od koncentracije INA, večja kot je, manjši doprinos ima k odzivu JA. JA povzroči izražanje PR1 proteinov, a ob tem ne pride do lokalne rezistence rastline, kar so dokazali z uporabo patogena *Pseudomonas syringae*. S tem so potrdili navedbe številnih člankov, da je JA ojačevalec obrambnih odzivov. Sklepajo, da med gensko regulacijo z INA in JA obstaja pozitivna povratna zanka, ki omogoča akumulacijo PR1 proteinov, ne pa tudi indukcije rezistence rastline. Nekateri članki navajajo, da indukcijo PR1b proteinov SA in JA delujeta sinergistično, drugi pa navajajo njun antagonističen učinek (Niki in sod., 1998; Pena-Cortés in sod., 1993).

Rastlinska obramba je kompleksna mreža regulatornih poti, v katero je poleg SA in JA vključen še etilen (Kunkel in Brooks, 2002). Etilen v nasprotju z SA in JA je prisoten v rastlini na skoraj vseh stopnjah razvoja in ob tem pa ne aktivira obrambnih genov (van Loon in sod., 2006). V tobaku so proteini PR znotraj družine različno regulirani s SA v kombinaciji z JA ali etilenom (Niki in sod., 1998; Seo in sod., 2001). Lawton in sod. (1994) navajajo, da je za ekspresijo genov PR v *A. thaliana* potrebna samo SA, a se ob prisotnosti ET učinek SA potencira. Genetske raziskave iste študije pa kažejo, da ET negativno vpliva na SA-regulirano izražanje PR1, saj se količina mRNA gena PR1 ob tretiranju z ET zmanjša. V tobaku imata JA in ET sinergistični učinek na izražanje PR1b gena (Xu in sod., 1994). Sam etilen lahko pripomore k rezistenci ali celo k večji občutljivosti na patogen (Hoffman in sod., 1999). Pri našem delu smo agroinfiltrirane rastline za 24 ur izpostavili atmosferi s 100-% etilenom in opazovali izražanje YFP pod promotorjem PR1b. V primerjavi s kontrolo smo po 24 urah opazili fluorescenco, ki pa je po 48 urah upadla. Sklepamo da se pri krompirju gen PR1b inducira tudi ob tretiranju s samim etilenom, ko je njegova koncentracija visoka, kar kaže na prepletenost njegove signale poti z SA signalno potjo. Predvidevamo, da je po 48 urah koncentracija etilena v rastlini padla pod inducibilno, zato fluorescenco nismo več opazili.

Metoda prehodne transformacije se je izkazala za zahtevno, saj je treba inducirano stanje primerjati z neinduciranim. Pri rastlinah tretiranih z etanolom smo pod konfokalnim mikroskopom opazili fluorescenco, ki smo jo pričakovali kot posledico samoojačanja signala. Indukcijo proteinov PR lahko izzove tudi ranitev rastline (Broekaert in sod., 2000), do česar lahko pride med agroinfiltracijo ali pa senescenca listov (Buchanan-Wollaston in sod., 2003). Rezultati bi bili boljši, če bi poleg kvalitativnih rezultatov imeli še kvantitativne. Polovico tretiranega lista bi opazovali pod mikroskopom, iz druge polovice pa izolirali mRNA fluorescenčnega proteina in iz koncentracije ocenili izražanje gena PR1b.

Ker smo preučevali promotorje krompirjevih genov, smo izvedli še stabilno transformacijo na krompirju. Binarna plazmida pKH7W in pH7WG poleg vnesenega konstrukta nosita tudi dva zapisa za odpornost proti antibiotiku. V regiji, ki se ne vključi v rastlino, imata zapis za odpornost proti spektinomycinu, kar smo uporabili za selekcijo agrobakterij, v regiji, ki se vključi v rastlino, pa zapis za odpornost proti kanamicinu oziroma higromycinu, kar smo uporabili za selekcijo transformiranih poganjkov. Da bi po določenem času po izvedeni transformaciji preprečili prisotnost agrobakterije na gojišču, smo temu dodali nespecifična antibiotika cefalotaksim in vankomicin. Cefalotaksim sodi med bakterocidne antibiotike cefalosporine, ki s penetracijo v zunanje celične stene bakterij povzročijo lizo celice (Christian & Christian, 1997). Učinkovit je že v nizkih koncentracijah, tako pri Gram negativnih kot pozitivnih bakterijah, medtem ko vankomicin deluje le proti Gram negativnim bakterijam (Silva in sod., 2001). Poleg antibiotikov smo v gojišče dodali še rastni hormon zeatin ribozid, ki spada med citokinine in zmanjšuje nastanek kalusov ter spodbuja regeneracijo transgenih poganjkov (Beaujean in sod., 1998).

Za transformacijo smo uporabili kultivarja krompirja Rywal in Désirée. Slednja je najpogosteje uporabljena sorta krompirja za transformacijo, saj je v *in vitro* sistemih zelo odzivna (Beaujean in sod., 1998). Za transformacijo sorte Rywal smo na podlagi izkušenj poljskega laboratorija prof. Henniga Institute of Biochemistry in Biophysic uporabili liste in stebelne internodije. Takšno transformacijo so izvedli tudi Visser in sod., (1989), ki so ugotovili, da je transformacija internodijev uspešnejša. Beaujean in sod (1998) navajajo, da je transformacija listov v primerjavi z internodiji lažja, saj so slednji manj občutljivi na poškodbe, ki nastanejo med transformacijo. Poleg tega trdijo, da so listi bolj variabilni, saj naj bi bili mladi listi na vrhu poganjka primernejši za transformacijo od starejših listov v *in vitro* kulturah. Po priporočilu tujega laboratorija smo liste in nekatere internodije rahlo poškodovali s skalpelom ter jih prenesli na gojišče z razmazano bakterijsko kulturo. Rast transgenih poganjkov smo opazili tako na internodijih kot listkih, pri tem pa nismo opazovali, kje je frekvenca transformacije večja, saj je bil naš cilj le pridobitev transgenih poganjkov, ki bi jih kasneje lahko uporabili za analizo vstavljenih genov in ne za pridobitev večje količine transformant.

Pri transformaciji krompirja sorte Désirée smo uporabili stebelne internodije, čeprav Mlakar Medved (2002) v svojem diplomskem delu navaja, da so za transformacijo te sorte primerni tudi izsečki listov. V večini objavljenih postopkov transformacije na internodijih so uporabljali cele internodije, medtem ko so Beaujean in sod. (1998) internodije vzdolžno prerezali, s čimer so uspešnost transformacije povišali na 88,7 %. V naših poskusih smo uporabili obe tehniki. Izsečke smo transformirali kot Cingel in sod., (2010), ki so jih v bakterijski kulturi namakali med 5 in 10 minut, jih osušili na filter papirju ter prenesli na gojišče brez selekcije. Ob prenosu izsečkov na gojišče so te sprali s sterilno vodo in

cefalotaksimom, mi pa smo imeli cefalotaksim kar v gojišču in zato internodijev nismo spirali. Razlik med petrijevkami nismo opazili, tako da težko opredelimo, ali k uspešnejši transformaciji res pripomorejo prav prerezani internodiji, kjer je izpostavljena površina večja in posledično možnost okužbe z agrobakterijo višja. Obenem nismo opazili razlik med 5- in 10-minutno inkubacijo izsečkov. Verjetno bi preglednejše rezultate dobili, če bi izvedli tudi 30-minutno inkubacijo kot navajajo Beaujean in sod. (1998).

Izsečke smo po inkubaciji v bakterijski suspenziji prestavili na gojišče brez selekcije in jih šele čez dva dni prestavili na gojišče s selekcijo ter tako predvidoma izboljšali učinkovitost transformacije. Visser in sod (1998) namreč trdijo, da je frekvenca transformacije manjša, če izsečke takoj po namakanju v suspenziji bakterijske kulture prestavimo na gojišče s selekcijo. Frekvenca oziroma učinkovitost njihove transformacije je bila do 9-krat višja, če so izsečke dva dni pustili na gojišču brez selekcije.

Za selekcijo transgenih poganjkov, ki vsebujejo plazmid pH7WG, smo uporabili higromicin. Franklin in sod. (2007) so na podlagi testiranja različnih koncentracij (0, 15, 20, 35 in 50 mg/l) higromicina za selekcijo transgenih rastlin ugotovili, da so netransformirani izsečki propadli pri koncentracijah višjih od 15 mg/l. Za optimalno koncentracijo so tako določili 20 mg/l higromicina. V našem poskusu smo izsečke Rywala izpostavili optimalni koncentraciji, vendar pa so izsečki pri tej koncentraciji propadli, zato predvidevamo, da je za kultivar Rywal ta koncentracija že letalna. Poskus smo ponovili z nižjo koncentracijo 15 mg/l pri kultivarju Rywal in 20 mg/l pri kultivarju Désirée. Ker smo pri vseh rastlinah dobili enake rezultate, sklepamo, da je higromicin s koncentracijo 15 mg/l ali višjo za rastlino toksičen. Za selekcijo smo uporabili tudi higromicin s koncentracijo 4 mg/l, ki jo je za transformacijo krompirja kultivarja Désirée v sklopu diplomskega dela uporabila Mohoričeva (2011). Pri tako nizki koncentraciji smo opazili nekaj transgenih poganjkov pri obeh kultivarjev krompirja, hkrati pa je pričakovano zraslo tudi nekaj poganjkov kontrole. O lažno pozitivnih oziroma pobeglih transformantah so poročali Petti in sod. (2009), ko so pri transformaciji kultivarja Désirée na stebelnih internodijih za selekcijo uporabili antibiotik kanamicin v zelo nizki koncentraciji (0,05 mg/l). Ob tako nizki koncentraciji kanamicina se je zmanjšal selekcijski pritisk, posledično pa se je povečala regeneracija transgenih rastlin in frekvenca lažno pozitivnih oziroma pobeglih poganjkov. Možen vzrok za pobege poganjke je lahko tudi majhen stik izsečka s selekcijskim gojiščem, ki zato ni bil izpostavljen zadostni koncentraciji selekcije. Da bi izločili pobege poganjke, bi morali iz poganjkov izolirati DNA in s PCR reakcijo potrditi prisotnost v rastlinski genom vnešenega gena. .

Za selekcijo transgenih poganjkov, ki vsebujejo plazmid pK7WG, smo uporabili kanamicin. Ko je Ishige (1995) preučeval selekcijo transformant z antibiotikom kanamicin in higromicin, je ugotovil, da za uspešno selekcijo potrebujemo 10-krat večjo koncentracijo kanamicina kot higromicina. Kot uspešno koncentracijo higromicina je določil 10 mg/l, ki

je dvakrat nižja v primerjavi z optimalno koncentracijo, ki so jo določili Franklin in sod. (2007), koncentracija kanamicina pa je znašala 100 mg/l. Za transformacijo sorte Désirée smo najprej izbrali to koncentracijo, ki se je izkazala za ustrezno. Koncentracijo smo nato znižali, saj Renata Štrucl (2000) v svojem diplomskem delu opisuje uspešno selekcijo tudi z nižjo koncentracijo (20 mg/l) in dobili enake rezultate kot pri višji koncentraciji. Koncentracijo smo znižali še na 15 in 4 mg/l za transformacijo kultivarja Rywal, vendar so poleg predvidoma transgenih poganjkov zrasle tudi kontrole. Ali je bila transformacija uspešna tudi pri tako nizki koncentraciji ali gre za pobegle poganjke, bi morali preveriti z analizo izolirane DNA.

Pri selekciji s higromicinom je zraslo opazno manj poganjkov kot pri selekciji s kanamicinom. Visoko število dobljenih transformant je lahko zavajajoče. Ibrahim in sod (2002) so po regeneraciji rastlin na selekcijskem gojišču s kanamicinom najprej poročali o 56 % uspešni transformaciji, a so po nadaljnjih genetskih analizah ugotovili, da je uspešno transformiranih le 5 % rastlin.

Uspešnost transformacije je odvisna tudi od uporabe plazmidov, ki jih transformiramo v rastlino. Mi smo konstrukta vnesli v plazmida z enakim ogrođjem in različnima selekcijskima markerjema, saj smo želeli ugotoviti, kateri antibiotik nam omogoča lažjo selekcijo predvidoma transgenih rastlin. Da bi ugotovili, ali na izražanje vpliva tudi pripravljen konstrukt, bi morali vse konstrukte vnesti v plazmide z enakim ogrođjem in enakim selekcijskim markerjem.

Po šestih transformacijah smo dobili številne poganjke, ki smo jih porezali in prestavili v sveže gojišče. Plan za nadaljnje delo je izolacija DNA iz poganjkov in preverjanje prisotnosti vstavljenih genov s PCR.

6 SKLEPI

- Promotorska zaporedja gena PR1b se razlikujejo tako med vrstami kot tudi znotraj vrste.
- Transkripcijo genov PR1b inducirajo INA, in etilen.
- MeJA ne inducira transkripcijo genov PR1b.
- INA aktivira tudi promotor gena TGA2, ki leži višje v signalni poti SA
- Za stabilno transformacijo so uporabni tako listi kot internodiji rastlin iz tkivnih kultur
- Higromicin je v primerjavi s kanamicinom za rastline bolj toksičen in je težje določili ustrezno koncentracijo, ki bi omogočala selekcijo, a pri tem ne bi bila toksična za rastline z vnešenim plazmidom.

7 POVZETEK

Krompir je četrta najpogostejša poljščina na svetu. Njegov pridelek ogrožajo številni škodljivci, med njimi tudi krompirjev virus Y, ki povzroča veliko ekonomsko škodo. Ob okužbi se na mestu okužbe in v preostalih delih rastline kopiči salicilna kislina, kar aktivira odziv SAR (pridobljena sistemska odpornost). Transkripcijski faktor TGA2 z vezavo na PR1b aktivira transkripcijo gena PR1b, ki ga uvrščamo v skupino obrambnih proteinov PR, ki jih povezujejo z odgovorom rastline na okužbo. Zanimala nas je aktivnost promotorjev genov PR1b in TGA2 iz krompirjevih genotipov PW363, Rywal in Désirée. S pomočjo bioinformatičnih baz smo dokazali raznolikost nukleotidnih zaporedij promotorjev PR1b znotraj kultivarja, kot tudi med kultivarji. Posledično imajo različna regulatorna zaporedja, na katere se vežejo različni transkripcijski faktorji. Indukcijo promotorja smo opazovali s pomočjo konfokalne mikroskopije na transformiranih rastlinah. Glede na rezultate prehodne transformacije na *N. benthamiana* sklepamo, da se transkripcijski faktor TGA2 in protein PR1b inducirata s funkcionalnim analogom salicilne kisline INA, kot tudi z rastlinskima hormonoma etilenom in metil-jasmonske kisline. Ugotovili smo, da je izražanje ni takojšnje, saj smo fluorescenco opazili po 24 urah. Ker smo zaznali šibko fluorescenco tudi pri kontrolah, predvidevamo, da je agroinfiltracija invaziven postopek, ki povzroči indukcijo obrambnih genov. Ker smo preučevali promotorje krompirjevih genov, smo izvedli tudi stabilno transformacijo dveh kultivarjev krompirja. Iz transformiranih izsečkov so zrasli predvidoma transgeni poganjki, ki pa jih nismo uspeli analizirati.

8 VIRI

- Ahl P., Cornu A., Gianinazzi S. 1982. Soluble proteins as genetic markers in studies of resistance and phylogeny in *Nicotiana*. *Phytopathology*, 72: 80-85
- Banerjee A. K., Prat S., Hannapel D. J. 2006. Efficient production of transgenic potato (*S. tuberosum* L. ssp. *andigena*) plants via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *Plant Science*, 170, 4: 732–738
- Beaujean A, Sangwan R. S., Lecardonnel A., Sangwan-Norreel B. S. 1998. *Agrobacterium*-mediated transformation of three economically important potato cultivars using sliced internodal explants: an efficient protocol of transformation. *Journal of Experimental Botany*, 49, 326: 1589–1595
- Beczner L., Horváth J., Romhányi I., Förster H. 1984. Studies on the etiology of tuber necrotic ringspot disease in potato. *Potato Research*, 27, 3: 339–352
- Berger P. H., Adams M. J., Barnett O. W., Brunt A. A., Hammond J. 2005. Potyviridae. V: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Fauquet C. M., Mayo M. A., Maniloff J., Desselberger, U. Ball L.A. (ur.). London, Academic Press: 819–841
- Boatwright J. L., Pajeroska-Mukhtar K. 2013. Salicylic acid: An old hormone up to new tricks. *Molecular Plant Pathology*, 14, 6: 623-634
- Bol J. F., Linthorst H. J. M., Cornelissen B. J. C. 1990. Plant pathogenesis-related proteins induced by virus infection. *Annual Review of Phytopathology*, 28: 113-138
- Broekaert W. F., Terras F. R. G., Cammue B. P. A. 2000. Induced and preformed antimicrobial proteins. V: Mechanisms of Resistance to Plant Diseases. 1st ed. Slusarenko A. J, Fraser R. S. S., van Loon L. C (ur.) Dordrecht, Springer Netherlands: 371–477
- Buchanan-Wollaston V., Earl S., Harrison E., Mathas E., Navabpour S. 2003. The molecular analysis of leaf senescence - a genomics approach. *Plant Biotechnology Journal*, 1: 3–22
- Buchel A. S., Linthorst H. J. M., Eds. S., 1999. PR-1: A group of plant proteins induced upon pathogen infection. V: Pathogenesis-related proteins in plants, Datta SK, Muthukrishnan S. (ur.). Boca Raton, CRC Press: 21-47
- Butterbrodt T., Thurow C., Gatz C. 2006. Chromatin immunoprecipitation analysis of the tobacco PR-1a- and the truncated CaMV 35S promoter reveals differences in salicylic acid-dependent TGA factor binding and histone acetylation. *Plant Molecular Biology*, 61, 4-5: 665–674
- Cao H., Glazebrook J., Clarke J. D., Volko S., Dong X. 1997. The Arabidopsis NPR1 gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. *Cell*, 88, 1: 57–63

- Chern M. S., Fitzgerald H. A., Yadav R. C., Canlas P. E., Dong X., Ronald P. C. 2001. Evidence for a disease-resistance pathway in rice similar to the NPR1-mediated signaling pathway in Arabidopsis. *Plant Journal*, 27, 2: 101–113
- Christian S. S., Christian J. S. 1997. The cephalosporin antibiotics. *Primary Care Update for Ob/Gyns*, 4, 5: 161-210
- Chung S. M., Vaidya M., Tzfira, T. 2006. Agrobacterium is not alone: Gene transfer to plants by viruses and other bacteria. *Trends in Plant Science*, 11, 1: 1-4
- Chung B. Y. W., Miller W. A., Atkins J. F., Firth A. E. 2008. An overlapping essential gene in the Potyviridae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 15: 5897–5902
- Cingel A., Vinterhalter B., Vinterhalter D., Čalić-Dragosavac D., Smigocki A., Ninković S. 2010. Agrobacterium-mediated transformation of two Serbian potato cultivars (*Solanum tuberosum* L. cv. Dragačevka and cv. Jelica). *African Journal of Biotechnology*, 9, 30: 4644–4650
- Dangl J. L., Jones J. D. 2001. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*, 411, 6839: 826–833
- Després C., Chubak C., Rochon A., Clark R., Bethunem T., Desveaux D., Fobert P. R. 2003. The Arabidopsis NPR1 Disease Resistance Protein Is a Novel Cofactor That Confers Redox Regulation of DNA Binding Activity to the Basic Domain / Leucine Zipper Transcription Factor TGA1. *The Plant Cell*, 15, 9: 2181–2191
- Després C., DeLong C., Glaze S., Liu E., Fobert P. R. 2000. The Arabidopsis NPR1/NIM1 protein enhances the DNA binding activity of a subgroup of the TGA family of bZIP transcription factors. *The Plant Cell*, 12, 2: 279–290
- Eyal Y., Meller Y., Lev-Yadun S., Fluhr R. 1993. A basic-type PR-1 promoter directs ethylene responsiveness, vascular and abscission zone-specific expression. *The Plant Journal*, 4, 2: 225–234
- FAO. 2008. International Year of the Potato (IYP). Rome, Food and Agricultural Organisation of the United Nations: 20 str.
- Fernández C., Szyperski T., Bruyère T., Ramage P., Mössinger E., Wüthrich K. 1997. NMR solution structure of the pathogenesis-related protein P14a. *Journal of Molecular Biology*, 266, 3: 576–593
- Franklin G., Oliveira M., Dias A. C. P. 2007. Production of transgenic *Hypericum perforatum* plants via particle bombardment-mediated transformation of novel organogenic cell suspension cultures. *Plant Science*, 172, 6: 1193–1203
- Fu Z. Q., Yan S., Saleh A., Wang W., Ruble J., Oka N. 2012. NPR3 and NPR4 are receptors for the immune signal salicylic acid in plants. *Nature*, 486, 7402: 228–232
- Garcion C., Lohmann A., Lamodièrre E., Catinot J., Buchala A., Doermann P., Métraux J. P. 2008. Characterization and biological function of the ISOCHORISMATE SYNTHASE2 gene of Arabidopsis. *Plant Physiology*, 147, 3: 1279–1287

- Gianinazzi S., 1982. Antiviral agents and inducers of virus resistance: analogies with interferon. V: Active defence mechanisms in plants. Wood R.K.S. (ur.). New York, Plenum Press: 275-298
- Hammerschmidt R. (2009). Chapter 5 Systemic Acquired Resistance. *Advances in Botanical Research*, 51: 173–222
- Hammond-Kosack K. E., Jones J. D. 1996. Resistance gene-dependent plant defense responses. *The Plant Cell*, 8, 10: 1773–1791
- Hoegen E., Strömberg A., Pihlgren U., Kombrink E. 2002. Primary structure and tissue-specific expression of the pathogenesis-related protein PR-1b in potato. *Molecular Plant Pathology*, 3, 5: 329–345
- Hoffman T., Schmidt J., Zheng X., Bent A. 1999. Isolation of ethylene-insensitive soybean mutants that are altered in pathogen susceptibility and gene-for-gene disease resistance. *Plant Physiology*, 119, 3: 935–950
- Horvaishigh E., Szalai G., Janda, T. 2007. Induction of abiotic stress tolerance by salicylic acid signaling. *Journal of Plant Growth Regulation*, 36, 3: 290-300
- Ibrahim M., Metry E., Osman Y., Madkour M. 2002. Genetically modified potato (*Solanum tuberosum* L.) resistant to potato tuber moth (*Phthorimeaea operculella*). *Arab Journal of Biotechnology*, 5, 1: 1-10
- Ishige T. 1995. Somatic cell fusion between diploid potato (*Solanum tuberosum*) lines using transformed antibiotic selection markers. *Plant Science*, 112, 2: 231-238
- Jakoby M., Weisshaar B., Dröge-Laser W., Vicente-Carbajosa J., Tiedemann J., Kroj T., Parcy F. 2002. bZIP transcription factors in Arabidopsis. *Trends in Plant Science*, 7, 3: 106-111
- Janda M., Ruelland, E. 2014. Magical mystery tour: Salicylic acid signalling. *Environmental and Experimental Botany*, 114: 117–128
- Jones H. D., Doherty A., Sparks C. A. 2009. Transient transformation of plants. *Methods in Molecular Biology*, 513: 131-152
- Karasev A. V, Gray S. M. 2013. Continuous and emerging challenges of Potato virus Y in potato. *Annual Review of Phytopathology*, 51: 571–586
- Kerlan C., & Moury B. 2008. Potato Virus Y. V: *Encyclopedia of Virology*. 3rd ed. Mahy B. W.J., van Regenmortel M. H.V. (ur.) London, Academic Press: 287–296
- Kesarwani M., Yoo J., Dong X. 2007. Genetic Interactions of TGA Transcription Factors in the Regulation of Pathogenesis-Related Genes and Disease Resistance in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 144, 1: 336–346
- Kinkema M., Fan W., Dong X. 2000. Nuclear localization of NPR1 is required for activation of PR gene expression. *The Plant Cell*, 12, 12: 2339–2350
- Kuc J. 1982. Induced Immunity to Plant Disease. *BioScience*, 32, 11: 854–860
- Kunkel B.N., Brooks D.M. 2002. Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Current Opinion in Plant Biology*, 5, 4: 325–331

- Kunz W., Staub T., Metraux J.-P., Hoegerle K., Nyfeler R., Ahl P. 1988. A method for protecting plants against diseases. European Patent EP 0268775 A1
- Lawton K. A., Potter S. L., Uknes S., Ryals J. 1994. Acquired resistance signal transduction in Arabidopsis is ethylene independent. *The Plant Cell*, 6, 5: 581–588
- Lebel E., Heifetz P., Thorne L., Uknes S., Ryals J., Ward E. 1998. Functional analysis of regulatory sequences controlling PR-1 gene expression in Arabidopsis. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 16, 2: 223–233
- Lu H. 2009. Dissection of salicylic acid-mediated defense signaling networks. *Plant Signaling & Behavior*, 4, 8: 713–717
- Mauch F., Mauch-Mani B., Gaille C., Kull B., Haas D., Reimann C. 2001. Manipulation of salicylate content in Arabidopsis thaliana by the expression of an engineered bacterial salicylate. *Plant Journal*, 25, 1: 67–77
- Meuwly P., Molders W., Buchala A., Metraux J. P. 1995. Local and Systemic Biosynthesis of Salicylic Acid in Infected Cucumber Plants. *Plant Physiology*, 109, 3: 1107–1114
- Mlakar Medved M. 2002. Regeneracija in transformacija krompirja *Solanum tuberosum* L. in vitro. Diplomski naloga. Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani: 75 str.
- Mohorič B. 2011. Postopki regeneracije pri genski transformaciji. Diplomski naloga. Meddelčni študij biotehnologije, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani: 89 str.
- Mosher R. A., Durrant W. E., Wang D., Song J., Dong X. 2006. A comprehensive structure-function analysis of Arabidopsis SN1 defines essential regions and transcriptional repressor activity. *The Plant Cell*, 18, 7: 1750–1765
- Mou Z., Fan W., Dong, X. 2003. Inducers of plant systemic acquired resistance Regulate NPR1 function through redox changes. *Cell*, 113, 7: 935–944
- Niki T., Mitsuhashi I., Seo S., Ohtsubo N., Ohashi Y. 1998. Antagonistic Effect of Salicylic Acid and Jasmonic Acid on the Expression of Pathogenesis-Related (PR) Protein Genes in Wounded Mature Tobacco Leaves. *Plant and Cell Physiology*, 39, 5: 500–507
- Nolte P., Whitworth J. L., Thornton M. K., McIntosh C. S. 2004. Effects of Seedborne *Potato virus Y* on Performance of Russet Burbank, Russet Norkotah, and Shepody Potato. *Plant Disease*, 88, 3: 248–252
- Pena-Cortés H., Albrecht T., Prat S., Weiler E. W., Willmitzer L. 1993. Aspirin prevents wound-induced gene expression in tomato leaves by blocking jasmonic acid biosynthesis. *Planta*, 191, 1: 123–128
- Petti C., Wendt T., Meade C., Mullins E. 2009. Evidence of genotype dependency within *Agrobacterium tumefaciens* in relation to the integration of vector backbone sequence in transgenic *Phytophthora infestans*-tolerant potato. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 107, 3: 301–306

- Pieterse C. M., van Wees S. C., Hoffland E., van Pelt J. A., van Loon, L. C. 1996. Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. *The Plant Cell*, 8, 8: 1225–1237
- Ryals J. A., Neuenschwander U. H., Willits M. G., Molina A., Steiner H. Y., Hunt M. D. 1996. Systemic Acquired Resistance. *The Plant Cell*, 8, 10: 1809–1819
- Ryals J., Weymann K., Lawton K., Friedrich L., Ellis D., Steiner H. Y., Uknes, S. 1997. The *Arabidopsis* NIM1 protein shows homology to the mammalian transcription factor inhibitor I kappa B. *The Plant Cell*, 9, 3: 425–439
- Scholthof K. B. G., Adkins S., Czosnek H., Palukaitis P., Jacquot E., Hohn T., Foster G. D. 2011. Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 12, 9: 938–954
- Schweizer P., Buchala A., Mettraux, J. P. 1997. Gene-Expression Patterns and Levels of Jasmonic Acid in Rice Treated with the Resistance Inducer 2,6-Dichloroisonicotinic Acid. *Plant Physiology*, 115, 1: 61–70
- Seo H. S., Song J. T., Cheong J. J., Lee Y. H., Lee Y. W., Hwang I., Choi Y. D. 2001. Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: a key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, 8: 4788–4793
- Serrano M., Wang B., Aryal B., Garcion C., Abou-Mansour E., Heck S., Geisler M., Mauch F., Nawrath C., Métraux J. P. 2013. Export of salicylic acid from the chloroplast requires the multidrug and toxin extrusion-like transporter EDS5. *Plant Physiology*, 162, 4: 1815–1821
- Shulaev V., Leon J., Raskin I. 1995. Is Salicylic Acid a Translocated Signal of Systemic Acquired Resistance in Tobacco? *The Plant Cell*, 7, 10: 1691–1701
- Sidorov V. A., Kasten D., Pang S. Z., Hajdukiewicz P. T. J., Staub J. M., Nehra N. S. 1999. Stable chloroplast transformation in potato: Use of green fluorescent protein as a plastid marker. *Plant Journal*, 19, 2: 209–216
- Silva J. A. T., Fukai S., Margaret P. 2001. The impact of carbenicillin, cefotaxime and vancomycin on chrysanthemum and tobacco TCL morphogenesis and *Agrobacterium* growth. *Journal of Applied Horticulture*, 3, 1: 3–12
- Spoel S. H., Koornneef A., Claessens S. M. C., Korzelius J. P., Van Pelt J. A., Mueller M. J., Pieterse C. M. J. 2003. NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *The Plant Cell*, 15, 3: 760–770
- Stachel S. E., Nester E. W., Zambryski P. C. 1986. A plant cell factor induces *Agrobacterium tumefaciens* vir gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83: 379–383
- Štrucl R. 2000. Transformacija tobaka (*Nicotiana tabacum*) cv. Samsun in krompirja (*Solanum tuberosum* L.) cv. Igor. Diplomska naloga. Oddelek za biologijo, Biotehniška

fakulteta, Univerza v Ljubljani: 57 str.

- Tzfira T., Citovsky V. 2006. Agrobacterium-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 17, 2: 147-154
- van Loon LC. 1999. Occurrence and properties of plant pathogenesis-related proteins. V: *Pathogenesis-related Proteins in Plants*. Datta SK, Muthukrishnan S. (ur.). Boca Raton, CRC Press: 1–19
- van Loon L. C., Geraats B. P. J., Linthorst H. J. M. 2006. Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. *Trends in Plant Science*, 11, 4: 189-191
- van Loon L. C., Pierpoint W. S., Boller T., Conejero V. 1994. Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. *Plant Molecular Biology Reporter*, 12, 3: 245–264
- van Loon L. C., Rep M., Pieterse C. M. J. 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology*, 44: 135–162
- van Loon L. C., van Strien E. A. 1999. The Families of Pathogenesis-Related Proteins, Their Activities, and Comparative Analysis of PR-1 Type Proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 55: 85–97
- van Loon L.C., van Kammen A. 1970. Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. “Samsun” and “Samsun NN” II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. *Virology*, 40: 199-211
- Vanacker H., Lu H., Rate D. N., Greenberg J. T. 2001. A role for salicylic acid and NPR1 in regulating cell growth in *Arabidopsis*. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 28, 2: 209–216
- Visser R. G. F., Jacobsen E., Hesselting-Meinders A., Schans M. J., Witholt B., Feenstra W. J. 1989. Transformation of homozygous diploid potato with an *Agrobacterium tumefaciens* binary vector system by adventitious shoot regeneration on leaf and stem segments. *Plant Molecular Biology*, 12, 3: 329–337
- Vlot A. C., Dempsey D. A., Klessig D. F. 2009. Salicylic Acid, a Multifaceted Hormone to Combat Disease. *Annual Review of Phytopathology*, 47, 1: 177–206
- War A. R., Paulraj M. G., War M. Y., Ignacimuthu S. 2011. Role of salicylic acid in induction of plant defense system in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Plant Signaling & Behavior*, 6, 11: 1787-1792
- Wildermut M. C., Dewdney J., Wu G., Ausubel F. M. 2001. Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature*, 414, 6863: 562–565
- Wu Y., Zhang D., Chu J. Y., Boyle P., Wang Y., Brindle I. D., Després C. 2012. The *Arabidopsis* NPR1 Protein Is a Receptor for the Plant Defense Hormone Salicylic Acid. *Cell Reports*, 1, 6: 639–647
- Xiang C., Miao Z., Lam E. 1997. DNA-binding properties, genomic organization and expression pattern of TGA6, a new member of the TGA family of bZIP transcription factors in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, 34, 3: 403–415

- Xu Y., Chang P., Liu D., Narasimhan M. L., Raghothama K. G., Hasegawa P. M., Bressan R. A. 1994. Plant defense genes are synergistically induced by ethylene and methyl jasmonate. *The Plant Cell*, 6: 1077-1085
- Yu D., Chen C., Chen Z. 2001. Evidence for an important role of WRKY DNA binding proteins in the regulation of NPR1 gene expression. *The Plant Cell*, 13, 7: 1527–1540
- Zhang Y., Fan W., Kinkema M., Li X., Dong X. 1999. Interaction of NPR1 with basic leucine zipper protein transcription factors that bind sequences required for salicylic acid induction of the PR-1 gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 11: 6523–6528
- Zhang Y., Tessaro M. J., Lassner M., Li X. 2003. Knockout analysis of Arabidopsis transcription factors TGA2, TGA5, and TGA6 reveals their redundant and essential roles in systemic acquired resistance. *The Plant Cell*, 15, 11: 2647–2653
- Zhou J. M., Trifa Y., Silva H., Pontier D., Lam E., Shah J., Klessig D. F. 2000. NPR1 differentially interacts with members of the TGA/OBF family of transcription factors that bind an element of the PR-1 gene required for induction by salicylic acid. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13, 2: 191–202

ZAHVALA

Magistrsko delo je zaključek šestih let študija, ki so mi ga omogočili starši z vsestransko podporo, za kar se jim iz srca zahvaljujem. Hkrati se ob tem zahvaljujem vsem osebam, ki so v tem času na kakršen koli način pripomogle k moji osebni rasti in znanstvenemu pogledu na svet.

Zahvala gre mentorici prof. dr. Kristini Gruden, ki mi je omogočila opravljanje magistrskega dela ter mi pri tem pomagala z nasveti in spodbudnimi besedami.

Posebna zahvala gre Tjaši Lukan, ki me je naučila, kako se spopasti z znanstvenim problemom, mi dala vse potrebne napotke, ki sem jih med delom potrebovala, in bila ob težavah vedno pripravljena pomagati. Po končanem laboratorijskem delu si je vzela čas tudi za analizo pisnega izdelka in s tem pripomogla h končnemu izdelku magistrske naloge.

Zahvaljujem sem tudi Inštitutu za Biologijo, oddelku FITO, kjer so me sprejeli medse in mi večkrat priskočili na pomoč. Priučili so me dodatnih metod, ki niso bile del mojega magistrskega dela, ter s tem nadgradili moje znanje in ob tem izkazali zaupanje v moje sposobnosti.

PRILOGE

PRILOGA A

Nukleotidna zaporedja promotorja PR1b iz genotipov PW363, Rywal in Désirée na podlagi katerih smo načrtovali začetne oligonukleotide

		Section 1						
		(1)	10	20	30	48		
PR1b_gDNA	(1)	-----AAANTAGAAAGTCAAG-AAAAAACTCTCCAAATTAC						
PR1b_(PW.1)_R	(1)	--CTTCTAGAAGATAAANTAGAAAGTCAA-GNAAAACTCTCCAAATTAC						
PR1b_(PW.1)_F	(1)							
PR1b_(PW.2)_F	(1)	-----GAGTTTTNNGCAGATGAAGTCAAGNAAAAAACTCTCCAAATTAC						
PR1b_(PW.2)_R	(1)							
PR1b_(PW.3)_F	(1)	GTTTTNAGCAGATNAAATAG-AGTCAAGAAAAAACTCTCCAAATTAC						
PR1b_(PW.3)_R	(1)							
PR1b_(Rywal.1)_F	(1)	---TTNAGCAGATNAAATAG-AGTCAAGAAAAAACTCTCCAAATTAC						
PR1b_(Rywal.1)_R	(1)							
PR1b_(Rywal.2)_F	(1)	-----AGCAGATNAAATAG-AGTCAAGAAAAAACTCTCCAAATTAC						
PR1b_(Rywal.2)_R	(1)							
PR1b_(Rywal.3)_F	(1)	GTTTTNAGCAGATAAATAG-AGTCAAGAAAAAACTCTCCAAATTAC						
PR1b_(Rywal.3)_R	(1)							
PR1b_(Desiree.1)_R	(1)	--CTTCTAGAAGATAAANTAGAAAGTCAAGAAAAAACTCTCCAAATTAC						
PR1b_(Desiree.1)_F	(1)							
PR1b_(Desiree.2)_F	(1)	---TTNAGCAGATNAAATAG-AGTCAAGAAAAAACTCTCCAAATTAC						
PR1b_(Desiree.2)_R	(1)							
PR1b_(Desiree.3)_F	(1)	GTTTTNAGCAGATAAATAG-AGTCAAGAAAAAACTCTCCAAATTAC						
PR1b_(Desiree.3)_R	(1)							
		Section 2						
		(49)	49	60	70	80	96	
PR1b_gDNA	(34)	GTGATGGAAACAGGAATTCACCGCAGCGGTGACTAGTGGCAGAGCCATG						
PR1b_(PW.1)_R	(46)	GTGATGGAAACAGGAATTCACCGCAGCGGTGACTAGTGGCAGAGCCATG						
PR1b_(PW.1)_F	(1)							
PR1b_(PW.2)_F	(43)	GTGATGGAAACAGGAATTCACCGCAGCGGTGACTAGTGGCAGAGCCATG						
PR1b_(PW.2)_R	(1)							
PR1b_(PW.3)_F	(48)	GTGATGGAAACAGGAATTCACCGCAGCGGTGACTAGTGGCAGAGCCATG						
PR1b_(PW.3)_R	(1)							
PR1b_(Rywal.1)_F	(46)	GTGATGGAAACAGGAATTCACCGCAGCGGTGACTAGTGGCAGAGCCATG						
PR1b_(Rywal.1)_R	(1)							
PR1b_(Rywal.2)_F	(41)	GTGATGGAAACAGGAATTCACCGCAGCGGTGACTAGTGGCAGAGCCATG						
PR1b_(Rywal.2)_R	(1)							
PR1b_(Rywal.3)_F	(48)	ATGATGGAAACAGGAATTCACCGCAGCGGTGACTAGTGGCAGAGCCATG						
PR1b_(Rywal.3)_R	(1)							
PR1b_(Desiree.1)_R	(47)	GTGATGGAAACAGGAATTCACCGCAGCGGTGACTAGTGGCAGAGCCATG						
PR1b_(Desiree.1)_F	(1)							
PR1b_(Desiree.2)_F	(46)	GTGATGGAAACAGGAATTCACCGCAGCGGTGACTAGTGGCAGAGCCATG						
PR1b_(Desiree.2)_R	(1)							
PR1b_(Desiree.3)_F	(48)	GTGATGGAAACAGGAATTCACCGCAGCGGTGACTAGTGGCAGAGCCATG						
PR1b_(Desiree.3)_R	(1)							
		Section 3						
		(97)	97	110	120	130	144	
PR1b_gDNA	(82)	ATTTTCAATAAGAGGGGTTCAAATTCGAAAGGATTAACATACGAACTA						
PR1b_(PW.1)_R	(94)	ATTTTCAATAAGAGGGGTTCAAATTCGAAAGGATTAACATACGAACTA						
PR1b_(PW.1)_F	(1)							
PR1b_(PW.2)_F	(91)	ATTTTCAATAAGAGGGGTTCAAATTCGAAAGGATTAACATACGAACTA						
PR1b_(PW.2)_R	(1)							
PR1b_(PW.3)_F	(96)	ATTTTCAATAAGAGGGGTTCAAATTCGAAAGGATTAACATACGAACTA						
PR1b_(PW.3)_R	(1)							
PR1b_(Rywal.1)_F	(94)	ATTTTCAATAAGAGGGGTTCAAATTCGAAAGGATTAACATACGAACTA						
PR1b_(Rywal.1)_R	(1)							
PR1b_(Rywal.2)_F	(89)	ATTTTCAATAAGAGGGGTTCAAATTCGAAAGGATTAACATACGAACTA						
PR1b_(Rywal.2)_R	(1)							
PR1b_(Rywal.3)_F	(96)	ATTTTCAATAAGAGGGGTTCAAATTCGAAAGGATTAACATACGAACTA						
PR1b_(Rywal.3)_R	(1)							
PR1b_(Desiree.1)_R	(95)	ATTTTCAATAAGAGGGGTTCAAATTCGAAAGGATTAACATACGAACTA						
PR1b_(Desiree.1)_F	(1)							
PR1b_(Desiree.2)_F	(94)	ATTTTCAATAAGAGGGGTTCAAATTCGAAAGGATTAACATACGAACTA						
PR1b_(Desiree.2)_R	(1)							
PR1b_(Desiree.3)_F	(96)	ATTTTCAATAAGAGGGGTTCAAATTCGAAAGGATTAACATACGAACTA						
PR1b_(Desiree.3)_R	(1)							
		Section 4						
		(145)	145	150	160	170	180	192
PR1b_gDNA	(129)	GTCGAAGGGGGG--TTCGACATCTATTATATACATCTAAAAAATATTT						
PR1b_(PW.1)_R	(142)	GTCGAAGGGGGG--TTCGACATCTATTATATACATCTAAAAAATATTT						
PR1b_(PW.1)_F	(1)							
PR1b_(PW.2)_F	(139)	GTCGAAGGGGGG--TTCGACATCTATTATATACATCTAAAAAATATTT						
PR1b_(PW.2)_R	(1)							
PR1b_(PW.3)_F	(144)	GTCGAAGGGGGG--TTCGACATCTATTATATACATCTAAAAAATATTT						
PR1b_(PW.3)_R	(1)							
PR1b_(Rywal.1)_F	(134)	GT-----TATT-----A-----						
PR1b_(Rywal.1)_R	(1)							
PR1b_(Rywal.2)_F	(129)	GT-----TATT-----A-----						
PR1b_(Rywal.2)_R	(1)							
PR1b_(Rywal.3)_F	(144)	GCCGAAGGGGGG--TTCGACATCTATTATATACATCTAAAAAATATTT						
PR1b_(Rywal.3)_R	(1)							
PR1b_(Desiree.1)_F	(143)	GTCGAAGGGGGG--TTCGACATCTATTATATACATCTAAAAAATATTT						
PR1b_(Desiree.1)_R	(1)							
PR1b_(Desiree.2)_F	(142)	GTCGAAGGGGGG--TTCGACATCTATTATATACATCTAAAAAATATTT						
PR1b_(Desiree.2)_R	(1)							
PR1b_(Desiree.3)_F	(144)	GTCGAAGGGGGG--TTCGACATCTATTATATACATCTAAAAAATATTT						
PR1b_(Desiree.3)_R	(1)							

Se nadaljuje

Nadaljevanje slike A1: Nukleotidna zaporedja promotorja PR1b iz genotipov PW363, Rywal in Désirée, na podlagi katerih smo načrtovali začetne oligonukleotide

		Section 5						
		(193)	193	200	210	220	230	240
PR1b_gDNA	(176)	TAACCATGATATATATAGTAATATTTCCACCCAAAAGGGATTCGGATGA						
PR1b_(PW.1)_R	(188)	TAACCATGATATATATAGTAATATTTCCCGTCGAAAAGGGTTTGGATGA						
PR1b_(PW.1)_F	(1)	-----						
PR1b_(PW.2)_F	(185)	TAACCATGATATATATAGTAATATTTCCCGTCGAAAAGGGTTTGGATGA						
PR1b_(PW.2)_R	(1)	-----						
PR1b_(PW.3)_F	(190)	TAACCATGATATATATAGTAATATTTCCCGTCGAAAAGGGTTTGGATGA						
PR1b_(PW.3)_R	(1)	-----						
PR1b_(Rywal.1)_F	(141)	-----ATGTCCTCGAGATCCGATACGACCGAANGCTTTTCAAAGG						
PR1b_(Rywal.1)_R	(1)	-----						
PR1b_(Rywal.2)_F	(136)	-----ATGTCCTCGAGATCCGATACGACCGAANGCTTTTCAAAGG						
PR1b_(Rywal.2)_R	(1)	-----						
PR1b_(Rywal.3)_F	(192)	TAGCCATGATATATATAGTAATATTTCCCGTCGAAAAGGGTTTGGATGA						
PR1b_(Rywal.3)_R	(1)	-----						
PR1b_(Desirée.1)_R	(189)	TAACCATGATATATATAGTAATATTTCCCGTCGAAAAGGGTTTGGATGA						
PR1b_(Desirée.1)_F	(1)	-----						
PR1b_(Desirée.2)_F	(188)	TAACCATGATATATATAGTAATATTTCCCGTCGAAAAGGGTTTGGATGA						
PR1b_(Desirée.2)_R	(1)	-----						
PR1b_(Desirée.3)_F	(190)	TAACCATGATATATATAGTAATATTTCCCGTCGAAAAGGGTTTGGATGA						
PR1b_(Desirée.3)_R	(1)	-----						
		Section 6						
		(241)	241	250	260	270	280	
PR1b_gDNA	(224)	ACCCCTAAAGACATGCTGGCTCCTCCCTGGCGGTGACCTA-TTGAAA						
PR1b_(PW.1)_R	(236)	ACCCCTAAAGACATGCTGGCTCCTCCCTGGCGGTGACCTA-TTGAAA						
PR1b_(PW.1)_F	(1)	-----						
PR1b_(PW.2)_F	(233)	ACCCCTAAAGACATGCTGGCTCCTCCCTGGCGGTGACCTA-TTGAAA						
PR1b_(PW.2)_R	(1)	-----						
PR1b_(PW.3)_F	(238)	ACCCCTAAAGACATGCTGGCTCCTCCCTGGCGGTGACCTA-TTGAAA						
PR1b_(PW.3)_R	(1)	-----						
PR1b_(Rywal.1)_F	(180)	ATT-----AAACATACGAACTAGTCGAAGGGGGT-----TCGACA						
PR1b_(Rywal.1)_R	(1)	-----						
PR1b_(Rywal.2)_F	(175)	ATT-----AAACATACGAACTAGTCGAAGGGGGT-----TCGACA						
PR1b_(Rywal.2)_R	(1)	-----						
PR1b_(Rywal.3)_F	(240)	ACCCCTAAAGACATGCTGGCTCCTCCCTGGCGGTGACCTA-TTGAAA						
PR1b_(Rywal.3)_R	(1)	-----						
PR1b_(Desirée.1)_R	(237)	ACCCCTAAAGACATGCTGGCTCCTCCCTGGCGGTGACCTA-TTGAAA						
PR1b_(Desirée.1)_F	(1)	-----						
PR1b_(Desirée.2)_F	(236)	ACCCCTAAAGACATGCTGGCTCCTCCCTGGCGGTGACCTA-TTGAAA						
PR1b_(Desirée.2)_R	(1)	-----						
PR1b_(Desirée.3)_F	(238)	ACCCCTAAAGACATGCTGGCTCCTCCCTGGCGGTGACCTA-TTGAAA						
PR1b_(Desirée.3)_R	(1)	-----						
		Section 7						
		(289)	289	300	310	320	336	
PR1b_gDNA	(271)	ACTTTTATCGAAAAATTATACTTTATATGTAAAATATTATATGAAGTA						
PR1b_(PW.1)_R	(282)	ACTTTTATCGAAAAATTATACTTTATATGTAAAATATTATATGAAGTA						
PR1b_(PW.1)_F	(1)	-----						
PR1b_(PW.2)_F	(279)	ACTTTTATCGAAAAATTATACTTTATATGTAAAATATTATATGAAGTA						
PR1b_(PW.2)_R	(1)	-----						
PR1b_(PW.3)_F	(284)	ACTTTTATCGAAAAATTATACTTTATATGTAAAATATTATATGAAGTA						
PR1b_(PW.3)_R	(1)	-----						
PR1b_(Rywal.1)_F	(216)	TCT-----A--TTATA---TACATTTAAAAATAATTTTAA---						
PR1b_(Rywal.1)_R	(1)	-----						
PR1b_(Rywal.2)_F	(211)	TCT---A-----TTATA---TACATTTAAAAATAATTTTAA---						
PR1b_(Rywal.2)_R	(1)	-----						
PR1b_(Rywal.3)_F	(287)	ACTTTTATCGAAAAATTATACTTTATATGTAAAATATTATATGAAGTA						
PR1b_(Rywal.3)_R	(1)	-----						
PR1b_(Desirée.1)_R	(283)	ACTTTTATCGAAAAATTATACTTTATATGTAAAATATTATATGAAGTA						
PR1b_(Desirée.1)_F	(1)	-----						
PR1b_(Desirée.2)_F	(282)	ACTTTTATCGAAAAATTATACTTTATATGTAAAATATTATATGAAGTA						
PR1b_(Desirée.2)_R	(1)	-----						
PR1b_(Desirée.3)_F	(284)	ACTTTTATCGAAAAATTATACTTTATATGTAAAATATTATATGAAGTA						
PR1b_(Desirée.3)_R	(1)	-----						
		Section 8						
		(337)	337	350	360	370	384	
PR1b_gDNA	(319)	CATTCGTCAGGAACACTTTAGGTGCACATATATTTATTAAGCATATC						
PR1b_(PW.1)_R	(330)	CATTCGTCAGGAACACTTTAGGTGCACATATATTTATTAAGCATATC						
PR1b_(PW.1)_F	(1)	-----						
PR1b_(PW.2)_F	(327)	CATTCGTCAGGAACACTTTAGGTGCACATATATTTATTAAGCATATC						
PR1b_(PW.2)_R	(1)	-----						
PR1b_(PW.3)_F	(332)	CATTCGTCAGGAACACTTTAGGTGCACATATATTTATTAAGCATATC						
PR1b_(PW.3)_R	(1)	-----						
PR1b_(Rywal.1)_F	(247)	-----C-----CATGTATATATAGTAA---TATC						
PR1b_(Rywal.1)_R	(1)	-----						
PR1b_(Rywal.2)_F	(243)	-----CATGTATATATAGTAA---TATC						
PR1b_(Rywal.2)_R	(1)	-----						
PR1b_(Rywal.3)_F	(335)	CATTCGTCAGGAACACTTTAGGTGCACATATATTTATTAAGCATATC						
PR1b_(Rywal.3)_R	(1)	-----						
PR1b_(Desirée.1)_R	(331)	CATTCGTCAGGAACACTTTAGGTGCACATATATTTATTAAGCATATC						
PR1b_(Desirée.1)_F	(1)	-----						
PR1b_(Desirée.2)_F	(330)	CATTCGTCAGGAACACTTTAGGTGCACATATATTTATTAAGCATATC						
PR1b_(Desirée.2)_R	(1)	-----						
PR1b_(Desirée.3)_F	(332)	CATTCGTCAGGAACACTTTAGGTGCACATATATTTATTAAGCATATC						
PR1b_(Desirée.3)_R	(1)	-----						

Se nadaljuje

Nadaljevanje slike A1: Nukleotidna zaporedja promotorja PR1b iz genotipov PW363, Rywal in Désirée, na podlagi katerih smo načrtovali začetne oligonukleotide

		Section 9						
		(385)	385	390	400	410	420	432
PR1b_gDNA	(367)	AAATTATTTAT	TCTCTATTTAATACTTATTTAAACATGTAACATATTTA					
PR1b_(PW.1)_R	(378)	AAATTATTTAT	TCTCTATTTAATACTTATTTAAACATGTAACATATTTA					
PR1b_(PW.1)_F	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
PR1b_(PW.2)_F	(375)	AAATTATTTAT	TCTCTATTTAATACTTATTTAAACATGTAACATATTTA					
PR1b_(PW.2)_R	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
PR1b_(PW.3)_F	(380)	AAATTATTTAT	TCTCTATTTAATACTTATTTAAACATGTAACATATTTA					
PR1b_(PW.3)_R	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
PR1b_(Rywal.1)_F	(268)	AAATTATTTAT	CCTCTATTTAATACTTATTTAAACATGTAACATATTTA					
PR1b_(Rywal.1)_R	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
PR1b_(Rywal.2)_F	(263)	AAATTATTTAT	CCTCTATTTAATACTTATTTAAACATGTAACATATTTA					
PR1b_(Rywal.2)_R	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
PR1b_(Rywal.3)_F	(383)	AAATTATTTAT	CCTCTATTTAATACTTATTTAAACATGTAACATATTTA					
PR1b_(Rywal.3)_R	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
PR1b_(Desiree.1)_R	(379)	AAATTATTTAT	TCTCTATTTAATACTTATTTAAACATGTAACATATTTA					
PR1b_(Desiree.1)_F	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
PR1b_(Desiree.2)_F	(378)	AAATTATTTAT	TCTCTATTTAATACTTATTTAAACATGTAACATATTTA					
PR1b_(Desiree.2)_R	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
PR1b_(Desiree.3)_F	(380)	AAATTATTTAT	TCTCTATTTAATACTTATTTAAACATGTAACATATTTA					
PR1b_(Desiree.3)_R	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
		Section 10						
		(433)	433	440	450	460	470	480
PR1b_gDNA	(415)	TTTCGTAARATTC	CAACTTCAACCCCTTAAAAACGTTTAAAAAATTAATAAT					
PR1b_(PW.1)_R	(426)	TTTCGTAARATTC	CAACTTCAACCCCTTAAAAACGTTTAAAAAATTAATAAT					
PR1b_(PW.1)_F	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
PR1b_(PW.2)_F	(423)	TTTCGTAARATTC	CAACTTCAACCCCTTAAAAACGTTTAAAAAATTAATAAT					
PR1b_(PW.2)_R	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
PR1b_(PW.3)_F	(428)	TTTCGTAARATTC	CAACTTCAACCCCTTAAAAACGTTTAAAAAATTAATAAT					
PR1b_(PW.3)_R	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
PR1b_(Rywal.1)_F	(316)	TTTCGTAARATTC	CAACTTCAACCCCTTAAAAACGTTTAAAAAATTAATAAT					
PR1b_(Rywal.1)_R	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
PR1b_(Rywal.2)_F	(311)	TTTCGTAARATTC	CAACTTCAACCCCTTAAAAACGTTTAAAAAATTAATAAT					
PR1b_(Rywal.2)_R	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
PR1b_(Rywal.3)_F	(431)	TTTCGTAARATTC	CAACTTCAACCCCTTAAAAACGTTTAAAAAATTAATAAT					
PR1b_(Rywal.3)_R	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
PR1b_(Desiree.1)_R	(427)	TTTCGTAARATTC	CAACTTCAACCCCTTAAAAACGTTTAAAAAATTAATAAT					
PR1b_(Desiree.1)_F	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
PR1b_(Desiree.2)_F	(426)	TTTCGTAARATTC	CAACTTCAACCCCTTAAAAACGTTTAAAAAATTAATAAT					
PR1b_(Desiree.2)_R	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
PR1b_(Desiree.3)_F	(428)	TTTCGTAARATTC	CAACTTCAACCCCTTAAAAACGTTTAAAAAATTAATAAT					
PR1b_(Desiree.3)_R	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
		Section 11						
		(481)	481	490	500	510	528	
PR1b_gDNA	(463)	TCTCATTCGAAGCT	GCCAGGATGTGAGGCCAGTTAATTTCTACAGAAAG					
PR1b_(PW.1)_R	(474)	TTTCATACGAAGCT	GCCAGGATGTGAGGCCAGTTAATTTCTACAGAAAG					
PR1b_(PW.1)_F	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
PR1b_(PW.2)_F	(471)	TTTCATACGAAGCT	GCCAGGATGTGAGGCCAGTTAATTTCTACAGAAAG					
PR1b_(PW.2)_R	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
PR1b_(PW.3)_F	(476)	TTTCATACGAAGCT	GCCAGGATGTGAGGCCAGTTAATTTCTACAGAAAG					
PR1b_(PW.3)_R	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
PR1b_(Rywal.1)_F	(364)	TCTCATTCGAAGCT	GCCAGGATGTGAGGCCAGTTAATTTCTACAGAAAG					
PR1b_(Rywal.1)_R	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
PR1b_(Rywal.2)_F	(359)	TCTCATTCGAAGCT	GCCAGGATGTGAGGCCAGTTAATTTCTACAGAAAG					
PR1b_(Rywal.2)_R	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
PR1b_(Rywal.3)_F	(479)	TCTCATTCGAAGCT	GCCAGGATGTGAGGCCAGTTAATTTCTACAGAAAG					
PR1b_(Rywal.3)_R	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
PR1b_(Desiree.1)_R	(475)	TTTCATACGAAGCT	GCCAGGATGTGAGGCCAGTTAATTTCTACAGAAAG					
PR1b_(Desiree.1)_F	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
PR1b_(Desiree.2)_F	(474)	TTTCATACGAAGCT	GCCAGGATGTGAGGCCAGTTAATTTCTACAGAAAG					
PR1b_(Desiree.2)_R	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
PR1b_(Desiree.3)_F	(476)	TTTCATACGAAGCT	GCCAGGATGTGAGGCCAGTTAATTTCTACAGAAAG					
PR1b_(Desiree.3)_R	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
		Section 12						
		(529)	529	540	550	560	576	
PR1b_gDNA	(511)	GACC-AAATATTTGT	-CCTGGTTTATGTGTCCATCA-CCTTGGTTTATT					
PR1b_(PW.1)_R	(522)	GACC-AAATATTTGT	-CCTGGTTTATGTGTCCATCA-CCTTGGTTTATT					
PR1b_(PW.1)_F	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
PR1b_(PW.2)_F	(519)	GACC-AAATATTTGT	-CCTGGTTTATGTGTCCATCA-CCTTGGTTTATT					
PR1b_(PW.2)_R	(26)	GNCCCAATATTTNN	NCCCTGGTTTAAANTGTCCATCANCTTGGTTTATT					
PR1b_(PW.3)_F	(524)	GACC-AAATATTTGT	-CCTGGTTTATGTGTCCATCA-CCTTGGTTTATT					
PR1b_(PW.3)_R	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
PR1b_(Rywal.1)_F	(412)	GACC-AAATATTTGT	-CCTGGTTTATGTGTCCATCA-CCTTGGTTTATT					
PR1b_(Rywal.1)_R	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
PR1b_(Rywal.2)_F	(407)	GACC-AAATATTTT	-CCTGGTT----GTCCATCA-CCTTGGTTTATT					
PR1b_(Rywal.2)_R	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
PR1b_(Rywal.3)_F	(527)	GACC-AAATATTTT	-CCTGGTT----GTCCATCA-CCTTGGTTTATT					
PR1b_(Rywal.3)_R	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
PR1b_(Desiree.1)_R	(523)	GACC-AAATATTTGT	-CCTGGTTTATGTGTCCATCA-CCTTGGTTTATT					
PR1b_(Desiree.1)_F	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
PR1b_(Desiree.2)_F	(522)	GACC-AAATATTTGT	-CCTGGTTTATGTGTCCATCA-CCTTGGTTTATT					
PR1b_(Desiree.2)_R	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
PR1b_(Desiree.3)_F	(524)	GACC-AAATATTTGT	-CCTGGTTTATGTGTCCATCA-CCTTGGTTTATT					
PR1b_(Desiree.3)_R	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	

Se nadaljuje

Nadaljevanje slike A1: Nukleotidna zaporedja promotorja PR1b iz genotipov PW363, Rywal in Désirée, na podlagi katerih smo načrtovali začetne oligonukleotide

		Section 13					
		577	580	600	610	624	
PR1b_gDNA	(577)	577	580	600	610	624	
PR1b_(PW.1)_R	(567)	TTTTGTTTTC	ATTATATTCAAAATGCTTTCAATGACTAACAAAATTCT				
PR1b_(PW.1)_F	(11)	TTTTGTTTTC	ATTNNNTTCAAATGCTTTCAATGACTAACAAAATTCT				
PR1b_(PW.2)_F	(564)	TTTTGTTTTC	ATTATATTCAAAATGCTTTCAATGACTAACAAAATTCT				
PR1b_(PW.2)_R	(74)	TNNGTTTTCCATENTATTCAAAATGCTTTCAATGACTAACAAAATTCT					
PR1b_(PW.3)_F	(569)	TTTTGTTTTC	ATTATATTCAAAATGCTTTCAATGACTAACAAAATTCT				
PR1b_(PW.3)_R	(1)	-----	ATTATATTCAAAATGCTTTCAATGACTAACAAAATTCT				
PR1b_(Rywal.1)_F	(457)	TTTTGTTTTC	ATTATATTCAAAATGCTTTCAATGACTAACAAAATTCT				
PR1b_(Rywal.1)_R	(1)	-----	ATTNNNTTCAAATGCTTTCAATGACTAACAAAATTCT				
PR1b_(Rywal.2)_F	(447)	TTTTGTTTTC	ATTATATTCAAAATGCTTTCAATGCTAACAAAATTCT				
PR1b_(Rywal.2)_R	(1)	-----	ATTCAAATGCTNTCAATGGCTAACAAAATTCT				
PR1b_(Rywal.3)_F	(567)	TTTTGTTTTC	ATTATATTCAAAATGCTTTCAATGGCTAACAAAATTCT				
PR1b_(Rywal.3)_R	(1)	-----	ATTATATTCAAAATGCTTTCAATGGCTAACAAAATTCT				
PR1b_(Desiree.1)_R	(568)	TTTTGTTTTC	ATTATATTCAAAATGCTTTCAATGACTAACAAAATTCT				
PR1b_(Desiree.1)_F	(1)	-----	ATTATATTCAAAATGCTTTCAATGACTAACAAAATTCT				
PR1b_(Desiree.2)_R	(567)	TTTTGTTTTC	ATTATATTCAAAATGCTTTCAATGACTAACAAAATTCT				
PR1b_(Desiree.2)_R	(33)	TTTTGTTTNC	ATTATATTCAAAATGCTTTCAATGACTAACAAAATTCT				
PR1b_(Desiree.3)_F	(569)	TTTTGTTTTC	ATTATATTCAAAATGCTTTCAATGACTAACAAAATTCT				
PR1b_(Desiree.3)_R	(1)	-----	ATTGCTTTCNANGACTAACAAAATTNT				
		Section 14					
		625	630	640	650	660	672
PR1b_gDNA	(603)	CACTCTTCTCT	CTCGTACAATAAATTTTCT	CCC	CAATAGATT	TAGGGC	
PR1b_(PW.1)_R	(614)	CACTCTTCTCT	CTCGTACAATAAATTTTCT	CTC	CAATAGATT	TAGGGC	
PR1b_(PW.1)_F	(58)	CNNNNNTNNT	TNNGTACAATAAATTTTNT	CTC	CAATAGATT	TAGGGC	
PR1b_(PW.2)_F	(611)	CACTCTTCTCT	CTCGTACAATAAATTTTCT	CTC	CAATAGATT	TAGGGC	
PR1b_(PW.2)_R	(122)	CACTCTTCTCT	CTCGTACAATAAATTTTCT	CTC	CAATAGATT	TAGGGC	
PR1b_(PW.3)_F	(616)	CACTCTTCTCT	CTCGTACAATAAATTTTCT	CTC	CAATAGATT	TAGGGC	
PR1b_(PW.3)_R	(38)	CACNNNTNNT	NFCGTACAATAAATTTTCT	CTC	CAATAGATT	TAGGGC	
PR1b_(Rywal.1)_F	(504)	CACTCTTCTCT	CTCGTACAATAAATTTTCT	CCC	CAATAGATT	TAGGGC	
PR1b_(Rywal.1)_R	(28)	CACTCTTCTCT	CTCGTACAATAAATTTTCT	CCC	CAATAGATT	TAGGGC	
PR1b_(Rywal.2)_F	(494)	CACTCTTCTCT	CTCGTACAATAAATTTTCT	CCC	CAATAGATT	TAGGGC	
PR1b_(Rywal.2)_R	(33)	NANNTNNTNNT	TNCGTACAATAAATTTTNT	CCC	CAATAGATT	TAGGGC	
PR1b_(Rywal.3)_F	(614)	CACTCTTCTCT	CTCGTACAATAAATTTTCT	CCC	CAATAGATT	TAGGGC	
PR1b_(Rywal.3)_R	(1)	-----	TNCGTACAATAAATTTTNTN	CCC	CAATAGATT	TAGGGC	
PR1b_(Desiree.1)_R	(615)	CACTCTTCTCT	CTCGTACAATAAATTTTCT	CTC	CAATAGATT	TAGGGC	
PR1b_(Desiree.1)_F	(1)	-----	TTCNTTCGTACAATAAATTTTNTN	CCC	CAATAGATT	TAGGGC	
PR1b_(Desiree.2)_F	(614)	CACTCTTCTCT	CTCGTACAATAAATTTTCT	CTC	CAATAGATT	TAGGGC	
PR1b_(Desiree.2)_R	(80)	CACNNNTNNT	TNCGTACAATAAATTTTNT	CTC	CAATAGATT	TAGGGC	
PR1b_(Desiree.3)_F	(616)	CACTCTTCTCT	CTCGTACAATAAATTTTCT	CTC	CAATAGATT	TAGGGC	
PR1b_(Desiree.3)_R	(27)	CACNTNNTNNT	TNCGTACAATAAATTTTNT	CTC	CAATAGATT	TAGGGC	
		Section 15					
		673	680	690	700	710	720
PR1b_gDNA	(649)	GGCTCA--AT	AATATCGATGGCCTAAAATCATT	TTTTCCATGAAATAT			
PR1b_(PW.1)_R	(660)	GGCTCAAAAT	AATATCGATGGCCTAAAATCATT	TTTTCCATGANATAT			
PR1b_(PW.1)_F	(104)	GGCTCAAAAT	AATATCGATGGCCTAAAATCATT	TTTTCCATGAAATAT			
PR1b_(PW.2)_F	(657)	GGCTCAAAAT	AATATCGATGGCCTAAAATCATT	TTTTCCATGANATAT			
PR1b_(PW.2)_R	(169)	GGCTCAAAAT	AATATCGATGGCCTAAAATCATT	TTTTCCATGAAATAT			
PR1b_(PW.3)_F	(662)	GGCTCAAAAT	AATATCGATGGCCTAAAATCATT	TTTTCCATGAAATAT			
PR1b_(PW.3)_R	(84)	GGCTCAAAAT	AATATCGATGGCCTAAAATCATT	TTTTCCATGAAATAT			
PR1b_(Rywal.1)_F	(550)	GGTTC--AT	AATATCGATGGCTAAAATCATT	TTTTCCATGAAATAT			
PR1b_(Rywal.1)_R	(76)	GGTTC--AT	AATATCGATGGCTAAAATCATT	TTTTCCATGAAATAT			
PR1b_(Rywal.2)_F	(540)	GGCTCA--AT	AATATCGATGGCCTAAAATCATT	TTTTCCATGAAATAT			
PR1b_(Rywal.2)_R	(80)	GGCTCA--AT	AATATCGATGGCCTAAAATCATT	TTTTCCATGAAATAT			
PR1b_(Rywal.3)_F	(660)	GGCTCA--AT	AATATCGATGGCCTAAAATCATT	TTTTCCATGAAATAT			
PR1b_(Rywal.3)_R	(38)	GGCTCA--AT	AATATCGATGGCCTAAAATCATT	TTTTCCATGAAATAT			
PR1b_(Desiree.1)_R	(661)	GGCTCAAAAT	AATATCGATGGCCTAAAATCATT	TTTTCCATGAAATAT			
PR1b_(Desiree.1)_F	(42)	GGCTCAAAAT	AATATCGATGGCCTAAAATCATT	TTTTCCATGAAATAT			
PR1b_(Desiree.2)_F	(660)	GGCTCAAAAT	AATATCGATGGCCTAAAATCATT	TTTTCCATGAAATAT			
PR1b_(Desiree.2)_R	(127)	GGCTCAAAAT	AATATCGATGGCCTAAAATCATT	TTTTCCATGAAATAT			
PR1b_(Desiree.3)_F	(662)	GGCTCAAAAT	AATATCGATGGCCTAAAATCATT	TTTTCCATGAAATAT			
PR1b_(Desiree.3)_R	(74)	GGCTCAAAAT	AATATCGATGGCCTAAAATCATT	TTTTCCATGAAATAT			
		Section 16					
		721	730	740	750	768	
PR1b_gDNA	(694)	TTTAAAGTAAACACTGAATCGCATCCTCTCTTGATCAGAGGTTCCAT					
PR1b_(PW.1)_R	(707)	TTTAAAGTAAACACTGAATCGCATCCTCTCTTGATCAGAGGTTCCAT					
PR1b_(PW.1)_F	(151)	TTTAAAGTAAACACTGAATCGCATCCTCTCTTGATCAGAGGTTCCAT					
PR1b_(PW.2)_F	(704)	TTTAAAGTAAACACTGAATCGCATCCTCTCTTGATCAGAGGTTCCAT					
PR1b_(PW.2)_R	(216)	TTTAAAGTAAACACTGAATCGCATCCTCTCTTGATCAGAGGTTCCAT					
PR1b_(PW.3)_F	(709)	TTTAAAGTAAACACTGAATCGCATCCTCTCTTGATCAGAGGTTCCAT					
PR1b_(PW.3)_R	(131)	TTTAAAGTAAACACTGAATCGCATCCTCTCTTGATCAGAGGTTCCAT					
PR1b_(Rywal.1)_F	(595)	TTTAAAGTAAACACTGAATCGCATCCTCTCTTGATCAGAGGTTCCAT					
PR1b_(Rywal.1)_R	(121)	TTTAAAGTAAACACTGAATCGCATCCTCTCTTGATCAGAGGTTCCAT					
PR1b_(Rywal.2)_F	(585)	TTTAAAGTAAACACTGAATCGCATCCTCTCTTGATCAGAGGTTCCAT					
PR1b_(Rywal.2)_R	(125)	TTTAAAGTAAACACTGAATCGCATCCTCTCTTGATCAGAGGTTCCAT					
PR1b_(Rywal.3)_F	(705)	TTTAAAGTAAACACTGAATCGCATCCTCTCTTGATCAGAGGTTCCAT					
PR1b_(Rywal.3)_R	(83)	TTTAAAGTAAACACTGAATCGCATCCTCTCTTGATCAGAGGTTCCAT					
PR1b_(Desiree.1)_R	(708)	TTTAAAGTAAACACTGAATCGCATCCTCTCTTGATCAGAGGTTCCAT					
PR1b_(Desiree.1)_F	(90)	TTTAAAGTAAACACTGAATCGCATCCTCTCTTGATCAGAGGTTCCAT					
PR1b_(Desiree.2)_F	(707)	TTTAAAGTAAACACTGAATCGCATCCTCTCTTGATCAGAGGTTCCAT					
PR1b_(Desiree.2)_R	(174)	TTTAAAGTAAACACTGAATCGCATCCTCTCTTGATCAGAGGTTCCAT					
PR1b_(Desiree.3)_F	(709)	TTTAAAGTAAACACTGAATCGCATCCTCTCTTGATCAGAGGTTCCAT					
PR1b_(Desiree.3)_R	(121)	TTTAAAGTAAACACTGAATCGCATCCTCTCTTGATCAGAGGTTCCAT					

Se nadaljuje

Nadaljevanje slike A1: Nukleotidna zaporedja promotorja PR1b iz genotipov PW363, Rywal in Désirée, na podlagi katerih smo načrtovali začetne oligonukleotide

Section 17							
	(769)	769	780	790	800	816	
PR1b_gDNA	(742)	GTTCGAATCCTAAAATGAAAATAAAGACTGCTAGATAGAACTTCCCTT					
PR1b_(PW.1)_R	(755)	GTTCGAATCCTAAAATGATAATAAATACTGCTAGATAGAACTTCCCTT					
PR1b_(PW.1)_F	(199)	GTTCGAATCCTAAAATGATAATAAATACTGCTAGATAGAACTTCCCTT					
PR1b_(PW.2)_F	(752)	GTTCGAATCCTAAAATGATAATAAATACTGCTAGATAGAACTTCCCTT					
PR1b_(PW.2)_R	(264)	GTTCGAATCCTAAAATGATAATAAATACTGCTAGATAGAACTTCCCTT					
PR1b_(PW.3)_F	(757)	GTTCGAATCCTAAAATGATAATAAATACTGCTAGATAGAACTTCCCTT					
PR1b_(PW.3)_R	(179)	GTTCGAATCCTAAAATGATAATAAATACTGCTAGATAGAACTTCCCTT					
PR1b_(Rywal.1)_F	(643)	GTTCGAATCCTAAAATGAAAATAAATACTGCTAGATAGAACTTCCCTT					
PR1b_(Rywal.1)_R	(169)	GTTCGAATCCTAAAATGAAAATAAATACTGCTAGATAGAACTTCCCTT					
PR1b_(Rywal.2)_F	(633)	GTTCGAATCCTAAAATGAAAATAAATAATTGCTAAAATAGAACTTCCCTT					
PR1b_(Rywal.2)_R	(173)	GTTCGAATCCTAAAATGAAAATAAATAATTGCTAAAATAGAACTTCCCTT					
PR1b_(Rywal.3)_F	(753)	GTTCGAATCCTAAAATGAAAATAAATACTGCTAAAATAGAACTTCCCTT					
PR1b_(Rywal.3)_R	(131)	GTTCGAATCCTAAAATGAAAATAAATACTGCTAAAATAGAACTTCCCTT					
PR1b_(Desirée.1)_R	(756)	GTTCGAATCCTAAAATGATAATAAATACTGCTAGATAGAACTTCCCTT					
PR1b_(Desirée.1)_F	(138)	GTTCGAATCCTAAAATGATAATAAATACTGCTAGATAGAACTTCCCTT					
PR1b_(Desirée.2)_F	(755)	GTTCGAATCCTAAAATGATAATAAATACTGCTAGATAGAACTTCCCTT					
PR1b_(Desirée.2)_R	(222)	GTTCGAATCCTAAAATGATAATAAATACTGCTAGATAGAACTTCCCTT					
PR1b_(Desirée.3)_F	(757)	GTTCGAATCCTAAAATGATAATAAATACTGCTAGATAGAACTTCCCTT					
PR1b_(Desirée.3)_R	(169)	GTTCGAATCCTAAAATGATAATAAATACTGCTAGATAGAACTTCCCTT					
Section 18							
	(817)	817	830	840	850	864	
PR1b_gDNA	(790)	TAAAGGTACTTATGTGACATAAATCAAATTAATTAGGACTCCAGTACA					
PR1b_(PW.1)_R	(803)	TAAAGGTACTTATGTGACATANATCAAATTAATTAGGACTCCAGTACA					
PR1b_(PW.1)_F	(247)	TAAAGGTACTTATGTGACATAAATCAAATTAATTAGGACTCCAGTACA					
PR1b_(PW.2)_F	(800)	TAAAGGTACTTATGTGACATANATCAAATTAATTAGGACTCCAGTACA					
PR1b_(PW.2)_R	(312)	TAAAGGTACTTATGTGACATAAATCAAATTAATTAGGACTCCAGTACA					
PR1b_(PW.3)_F	(805)	TAAAGGTACTTATGTGACATAAATCAAATTAATTAGGACTCCAGTACA					
PR1b_(PW.3)_R	(227)	TAAAGGTACTTATGTGACATAAATCAAATTAATTAGGACTCCAGTACA					
PR1b_(Rywal.1)_F	(691)	TAAAGGTACTTATGTGACATAAATCAAATTAATTAGGACTCCAGTACA					
PR1b_(Rywal.1)_R	(217)	TAAAGGTACTTATGTGACATAAATCAAATTAATTAGGACTCCAGTACA					
PR1b_(Rywal.2)_F	(681)	TAAAGGTACTTATGTGACATAAATCAAATTAATTAGGACTCCAGTACA					
PR1b_(Rywal.2)_R	(221)	TAAAGGTACTTATGTGACATAAATCAAATTAATTAGGACTCCAGTACA					
PR1b_(Rywal.3)_F	(801)	TAAAGGTACTTATGTGACATANATCAAATTAATTAGGACTCCAGTACA					
PR1b_(Rywal.3)_R	(179)	TAAAGGTACTTATGTGACATAAATCAAATTAATTAGGACTCCAGTACA					
PR1b_(Desirée.1)_R	(804)	TAAAGGTACTTATGTGACATAAATCAAATTAATTAGGACTCCAGTACA					
PR1b_(Desirée.1)_F	(186)	TAAAGGTACTTATGTGACATAAATCAAATTAATTAGGACTCCAGTACA					
PR1b_(Desirée.2)_F	(803)	TAAAGGTACTTATGTGACATAAATCAAATTAATTAGGACTCCAGTACA					
PR1b_(Desirée.2)_R	(270)	TAAAGGTACTTATGTGACATAAATCAAATTAATTAGGACTCCAGTACA					
PR1b_(Desirée.3)_F	(805)	TAAAGGTACTTATGTGACATAAATCAAATTAATTAGGACTCCAGTACA					
PR1b_(Desirée.3)_R	(217)	TAAAGGTACTTATGTGACATAAATCAAATTAATTAGGACTCCAGTACA					
Section 19							
	(865)	865	870	880	890	900	912
PR1b_gDNA	(838)	CACCCTAAGACAT---TGTATAAGAAAAGTTTATTCAGACCCCT					
PR1b_(PW.1)_R	(851)	CACCCTAAGACAT---TGTATAAGAAAAGTTTATTCAGACCCCT					
PR1b_(PW.1)_F	(295)	CACCCTAAGACAT---TGTATAAGAAAAGTTTATTCAGACCCCT					
PR1b_(PW.2)_F	(848)	CACCCTAAGACAT---TGTATAAGAAAAGTTTATTCAGACCCCT					
PR1b_(PW.2)_R	(360)	CACCCTAAGACAT---TGTATAAGAAAAGTTTATTCAGACCCCT					
PR1b_(PW.3)_F	(853)	CACCCTAAGACAT---TGTATAAGAAAAGTTTATTCAGACCCCT					
PR1b_(PW.3)_R	(275)	CACCCTAAGACAT---TGTATAAGAAAAGTTTATTCAGACCCCT					
PR1b_(Rywal.1)_F	(739)	CACCCTAAGACAT---TGTATAAGAAAAGTTTATTCAGACCCCT					
PR1b_(Rywal.1)_R	(265)	CACCCTAAGACAT---TGTATAAGAAAAGTTTATTCAGACCCCT					
PR1b_(Rywal.2)_F	(729)	CACCCTAAGACAT---TGTATAAGAAAAGTTTATTCAGACCCCT					
PR1b_(Rywal.2)_R	(269)	CACCCTAAGACAT---TGTATAAGAAAAGTTTATTCAGACCCCT					
PR1b_(Rywal.3)_F	(849)	CACCCTAAGACATGATGTCATTAAGAAAAGTTTATTCAGACCCCT					
PR1b_(Rywal.3)_R	(227)	CACCCTAAGACATGATGTCATTAAGAAAAGTTTATTCAGACCCCT					
PR1b_(Desirée.1)_R	(852)	CACCCTAAGACAT---TGTATAAGAAAAGTTTATTCAGACCCCT					
PR1b_(Desirée.1)_F	(234)	CACCCTAAGACAT---TGTATAAGAAAAGTTTATTCAGACCCCT					
PR1b_(Desirée.2)_F	(851)	CACCCTAAGACAT---TGTATAAGAAAAGTTTATTCAGACCCCT					
PR1b_(Desirée.2)_R	(318)	CACCCTAAGACAT---TGTATAAGAAAAGTTTATTCAGACCCCT					
PR1b_(Desirée.3)_F	(853)	CACCCTAAGACAT---TGTATAAGAAAAGTTTATTCAGACCCCT					
PR1b_(Desirée.3)_R	(265)	CACCCTAAGACAT---TGTATAAGAAAAGTTTATTCAGACCCCT					
Section 20							
	(913)	913	920	930	940	950	960
PR1b_gDNA	(883)	ATAATTTTGGAGCCTAAAGCCCTTATTTAGCTGCTTCACCATTTGGT					
PR1b_(PW.1)_R	(895)	ATAATTTTGGAGCCTAAAGCCCTTATTTAGCTGCTTCACCATTTGGT					
PR1b_(PW.1)_F	(339)	ATAATTTTGGAGCCTAAAGCCCTTATTTAGCTGCTTCACCATTTGGT					
PR1b_(PW.2)_F	(882)	ATAATTTTGGAGCCTAAAGCCCTTATTTAGCTGCTTCACCATTTGGT					
PR1b_(PW.2)_R	(404)	ATAATTTTGGAGCCTAAAGCCCTTATTTAGCTGCTTCACCATTTGGT					
PR1b_(PW.3)_F	(897)	ATAATTTTGGAGCCTAAAGCCCTTATTTAGCTGCTTCACCATTTGGT					
PR1b_(PW.3)_R	(319)	ATAATTTTGGAGCCTAAAGCCCTTATTTAGCTGCTTCACCATTTGGT					
PR1b_(Rywal.1)_F	(784)	ATAATTTTGGAGCCTAAAGCCCTTATTTAGCTGCTTCACCATTTGGT					
PR1b_(Rywal.1)_R	(310)	ATAATTTTGGAGCCTAAAGCCCTTATTTAGCTGCTTCACCATTTGGT					
PR1b_(Rywal.2)_F	(774)	ATAATTTTGGAGCCTAAAGCCCTTATTTAGCTGCTTCACCATTTGGT					
PR1b_(Rywal.2)_R	(314)	ATAATTTTGGAGCCTAAAGCCCTTATTTAGCTGCTTCACCATTTGGT					
PR1b_(Rywal.3)_F	(897)	ATAATTTTGGAGCCTAAAGCCCTTATTTAGCTGCTTCACCATTTGGT					
PR1b_(Rywal.3)_R	(275)	ATAATTTTGGAGCCTAAAGCCCTTATTTAGCTGCTTCACCATTTGGT					
PR1b_(Desirée.1)_R	(896)	ATAATTTTGGAGCCTAAAGCCCTTATTTAGCTGCTTCACCATTTGGT					
PR1b_(Desirée.1)_F	(278)	ATAATTTTGGAGCCTAAAGCCCTTATTTAGCTGCTTCACCATTTGGT					
PR1b_(Desirée.2)_F	(895)	ATAATTTTGGAGCCTAAAGCCCTTATTTAGCTGCTTCACCATTTGGT					
PR1b_(Desirée.2)_R	(362)	ATAATTTTGGAGCCTAAAGCCCTTATTTAGCTGCTTCACCATTTGGT					
PR1b_(Desirée.3)_F	(897)	ATAATTTTGGAGCCTAAAGCCCTTATTTAGCTGCTTCACCATTTGGT					
PR1b_(Desirée.3)_R	(309)	ATAATTTTGGAGCCTAAAGCCCTTATTTAGCTGCTTCACCATTTGGT					

Se nadaljuje

Nadaljevanje slike A1: Nukleotidna zaporedja promotorja PR1b iz genotipov PW363, Rywal in Désirée, na podlagi katerih smo načrtovali začetne oligonukleotide

Section 21							
	(961)	961	970	980	990	1008	
PR1b_gDNA	(931)	CACGTC	CCATG	CTTCA	CGAGG	CTGTAGA	
PR1b_(PW.1)_R	(943)	CACGTC	CCATG	CTTCA	CGAGG	CTGTAGA	
PR1b_(PW.1)_F	(387)	CACGTC	CCATG	CTTCA	CGAGG	CTGTAGA	
PR1b_(PW.2)_F	(940)	CACGTC	CCATG	CTTCA	CGAGG	CTGTAGA	
PR1b_(PW.2)_R	(452)	CACGTC	CCATG	CTTCA	CGAGG	CTGTAGA	
PR1b_(PW.3)_F	(945)	CACGTC	CCATG	CTTCA	CGAGG	CTGTAGA	
PR1b_(PW.3)_R	(367)	CACGTC	CCATG	CTTCA	CGAGG	CTGTAGA	
PR1b_(Rywal.1)_F	(832)	CACGTC	CCATG	CTTCA	CGAGG	CTGTAGA	
PR1b_(Rywal.1)_R	(358)	CACGTC	CCATG	CTTCA	CGAGG	CTGTAGA	
PR1b_(Rywal.2)_F	(822)	CACGTC	CCATG	CTTCA	CGAGG	CTGTAGA	
PR1b_(Rywal.2)_R	(362)	CACGTC	CCATG	CTTCA	CGAGG	CTGTAGA	
PR1b_(Rywal.3)_F	(945)	CATGTC	CCATG	CTTCA	CGAGG	CTGTAGA	
PR1b_(Rywal.3)_R	(323)	CATGTC	CCATG	CTTCA	CGAGG	CTGTAGA	
PR1b_(Desirée.1)_R	(944)	CACGTC	CCATG	CTTCA	CGAGG	CTGTAGA	
PR1b_(Desirée.1)_F	(326)	CACGTC	CCATG	CTTCA	CGAGG	CTGTAGA	
PR1b_(Desirée.2)_F	(943)	CACGTC	CCATG	CTTCA	CGAGG	CTGTAGA	
PR1b_(Desirée.2)_R	(410)	CACGTC	CCATG	CTTCA	CGAGG	CTGTAGA	
PR1b_(Desirée.3)_F	(945)	CACGTC	CCATG	CTTCA	CGAGG	CTGTAGA	
PR1b_(Desirée.3)_R	(357)	CACGTC	CCATG	CTTCA	CGAGG	CTGTAGA	
Section 22							
	(1009)	1009	1020	1030	1040	1056	
PR1b_gDNA	(978)	ATGGAAA	AAAAAT	TATACAT	CTTTAT	GCTTCCAG	
PR1b_(PW.1)_R	(990)	ATGGAAA	AAAAAT	TATACAT	CTTTAT	GCTTCCAG	
PR1b_(PW.1)_F	(434)	ATGGAAA	AAAAAT	TATACAT	CTTTAT	GCTTCCAG	
PR1b_(PW.2)_F	(987)	ATGGAAA	AAAAAT	TATACAT	CTTTAT	GCTTCCAG	
PR1b_(PW.2)_R	(499)	ATGGAAA	AAAAAT	TATACAT	CTTTAT	GCTTCCAG	
PR1b_(PW.3)_F	(992)	ATGGAAA	AAAAAT	TATACAT	CTTTAT	GCTTCCAG	
PR1b_(PW.3)_R	(414)	ATGGAAA	AAAAAT	TATACAT	CTTTAT	GCTTCCAG	
PR1b_(Rywal.1)_F	(880)	ATGGAAA	AAAAAT	TATACAT	CTTTAT	GCTTCCAG	
PR1b_(Rywal.1)_R	(406)	ATGGAAA	AAAAAT	TATACAT	CTTTAT	GCTTCCAG	
PR1b_(Rywal.2)_F	(870)	ATGGAAA	AAAAAT	TATACAT	CTTTAT	GCTTCCAG	
PR1b_(Rywal.2)_R	(410)	ATGGAAA	AAAAAT	TATACAT	CTTTAT	GCTTCCAG	
PR1b_(Rywal.3)_F	(993)	ATGGAAA	AAAAAT	TATACAT	CTTTAT	GCTTCCAG	
PR1b_(Rywal.3)_R	(371)	ATGGAAA	AAAAAT	TATACAT	CTTTAT	GCTTCCAG	
PR1b_(Desirée.1)_R	(991)	ATGGAAA	AAAAAT	TATACAT	CTTTAT	GCTTCCAG	
PR1b_(Desirée.1)_F	(373)	ATGGAAA	AAAAAT	TATACAT	CTTTAT	GCTTCCAG	
PR1b_(Desirée.2)_F	(990)	ATGGAAA	AAAAAT	TATACAT	CTTTAT	GCTTCCAG	
PR1b_(Desirée.2)_R	(457)	ATGGAAA	AAAAAT	TATACAT	CTTTAT	GCTTCCAG	
PR1b_(Desirée.3)_F	(992)	ATGGAAA	AAAAAT	TATACAT	CTTTAT	GCTTCCAG	
PR1b_(Desirée.3)_R	(404)	ATGGAAA	AAAAAT	TATACAT	CTTTAT	GCTTCCAG	
Section 23							
	(1057)	1057	1070	1080	1090	1104	
PR1b_gDNA	(1026)	TGTGAG	CCCCAT	CTAATA	GAAAAA	ATATAT	
PR1b_(PW.1)_R	(1037)	TGTGAG	CCCCAT	CTAATA	GAAAAA	ATATAT	
PR1b_(PW.1)_F	(481)	TGTGAG	CCCCAT	CTAATA	GAAAAA	ATATAT	
PR1b_(PW.2)_R	(1034)	TGTGAG	CCCCAT	CTAATA	GAAAAA	ATATAT	
PR1b_(PW.2)_F	(546)	TGTGAG	CCCCAT	CTAATA	GAAAAA	ATATAT	
PR1b_(PW.3)_F	(1039)	TGTGAG	CCCCAT	CTAATA	GAAAAA	ATATAT	
PR1b_(PW.3)_R	(461)	TGTGAG	CCCCAT	CTAATA	GAAAAA	ATATAT	
PR1b_(Rywal.1)_F	(927)	TGTGAG	CCCCAT	CTAATA	GAAAAA	ATATAT	
PR1b_(Rywal.1)_R	(453)	TGTGAG	CCCCAT	CTAATA	GAAAAA	ATATAT	
PR1b_(Rywal.2)_F	(917)	TGTGAG	CCCCAT	CTAATA	GAAAAA	ATATAT	
PR1b_(Rywal.2)_R	(457)	TGTGAG	CCCCAT	CTAATA	GAAAAA	ATATAT	
PR1b_(Rywal.3)_F	(1041)	TGTGAG	CCCCAT	CTAATA	GAAAAA	ATATAT	
PR1b_(Rywal.3)_R	(419)	TGTGAG	CCCCAT	CTAATA	GAAAAA	ATATAT	
PR1b_(Desirée.1)_R	(1038)	TGTGAG	CCCCAT	CTAATA	GAAAAA	ATATAT	
PR1b_(Desirée.1)_F	(420)	TGTGAG	CCCCAT	CTAATA	GAAAAA	ATATAT	
PR1b_(Desirée.2)_R	(1037)	TGTGAG	CCCCAT	CTAATA	GAAAAA	ATATAT	
PR1b_(Desirée.2)_F	(504)	TGTGAG	CCCCAT	CTAATA	GAAAAA	ATATAT	
PR1b_(Desirée.3)_F	(1039)	TGTGAG	CCCCAT	CTAATA	GAAAAA	ATATAT	
PR1b_(Desirée.3)_R	(451)	TGTGAG	CCCCAT	CTAATA	GAAAAA	ATATAT	
Section 24							
	(1105)	1105	1110	1120	1130	1140	1152
PR1b_gDNA	(1073)	AGTCTT	CTTAT	GTTC	TATA	GACTTT	
PR1b_(PW.1)_R	(1084)	AGTCTT	CTTAT	GTTC	TATA	GACTTT	
PR1b_(PW.1)_F	(528)	AGTCTT	CTTAT	GTTC	TATA	GACTTT	
PR1b_(PW.2)_F	(1081)	AGTCTT	CTTAT	GTTC	TATA	GACTTT	
PR1b_(PW.2)_R	(593)	AGTCTT	CTTAT	GTTC	TATA	GACTTT	
PR1b_(PW.3)_F	(1086)	AGTCTT	CTTAT	GTTC	TATA	GACTTT	
PR1b_(PW.3)_R	(508)	AGTCTT	CTTAT	GTTC	TATA	GACTTT	
PR1b_(Rywal.1)_F	(974)	AGTCTT	CTTAT	GTTC	TATA	GACTTT	
PR1b_(Rywal.1)_R	(500)	AGTCTT	CTTAT	GTTC	TATA	GACTTT	
PR1b_(Rywal.2)_F	(965)	AGTCTT	CTTAT	GTTC	TATA	GACTTT	
PR1b_(Rywal.2)_R	(505)	AGTCTT	CTTAT	GTTC	TATA	GACTTT	
PR1b_(Rywal.3)_F	(1088)	AGTCTT	CTTAT	GTTC	TATA	GACTTT	
PR1b_(Rywal.3)_R	(466)	AGTCTT	CTTAT	GTTC	TATA	GACTTT	
PR1b_(Desirée.1)_R	(1085)	AGTCTT	CTTAT	GTTC	TATA	GACTTT	
PR1b_(Desirée.1)_F	(467)	AGTCTT	CTTAT	GTTC	TATA	GACTTT	
PR1b_(Desirée.2)_F	(1084)	AGTCTT	CTTAT	GTTC	TATA	GACTTT	
PR1b_(Desirée.2)_R	(551)	AGTCTT	CTTAT	GTTC	TATA	GACTTT	
PR1b_(Desirée.3)_F	(1086)	AGTCTT	CTTAT	GTTC	TATA	GACTTT	
PR1b_(Desirée.3)_R	(498)	AGTCTT	CTTAT	GTTC	TATA	GACTTT	

Se nadaljuje

Nadaljevanje slike A1: Nukleotidna zaporedja promotorja PR1b iz genotipov PW363, Rywal in Désirée, na podlagi katerih smo načrtovali začetne oligonukleotide

		Section 25						
		(1153)	1153	1160	1170	1180	1190	1200
PR1b_gDNA	(1120)	ATTAATCTTGTTTAAACCTTATTTT	GATAATATAATTTG	----	AAAA			
PR1b_(PW.1)_R	(1131)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
PR1b_(PW.1)_F	(575)	ATTAATCTTGTTTAAACCTTATTTT	GATAATATAATTTT	----	CGAA			
PR1b_(PW.2)_F	(1128)	ATTANNC	-----	-----	-----	-----	-----	-----
PR1b_(PW.2)_R	(640)	ATTAATCTTGTTTAAACCTTATTTT	GATAATATAATTTT	----	CGAA			
PR1b_(PW.3)_F	(1133)	ATTAATCTTGTTTAAACCTTATTTT	GANANNANNANTTT	----	TGNA			
PR1b_(PW.3)_R	(555)	ATTAATCTTGTTTAAACCTTATTTT	GATAATATAATTTT	----	CGAA			
PR1b_(Rywal.1)_F	(1021)	ATTAATCTTGTTTAAACCTTATTTT	GATAATATAATTTT	----	GAAA			
PR1b_(Rywal.1)_R	(547)	ATTAATCTTGTTTAAACCTTATTTT	GATAATATAATTTT	----	GAAA			
PR1b_(Rywal.2)_F	(1012)	ATTAATCTTGTTTAAACCTTATTTT	GATAATGNATTTT	----	AA			
PR1b_(Rywal.2)_R	(552)	ATTAATCTTGTTTAAACCTTATTTT	GATAATGTTT	----	AA			
PR1b_(Rywal.3)_F	(1135)	ANTNAGCC	-----	-----	-----	-----	-----	-----
PR1b_(Rywal.3)_R	(513)	ATTAATCTTGTTTAAACCTTATTTT	GATAATATAATTTT	----	GAAAAA			
PR1b_(Desiree.1)_R	(1132)	ATTAATCTTGTTTAAACCTTATTTT	GN	----	-----			
PR1b_(Desiree.1)_F	(514)	ATTAATCTTGTTTAAACCTTATTTT	GATAATATAATTTT	----	CGAA			
PR1b_(Desiree.2)_F	(1131)	ATTAANNNTTGGT	-----	-----	-----	-----	-----	-----
PR1b_(Desiree.2)_R	(598)	ATTAATCTTGTTTAAACCTTATTTT	GATAATATAATTTT	----	CGAA			
PR1b_(Desiree.3)_F	(1134)	ATTAATCNTG	-----	-----	-----	-----	-----	-----
PR1b_(Desiree.3)_R	(545)	ATTAATCTTGTTTAAACCTTATTTT	GATAATATAATTTT	----	CGAA			
		Section 26						
		(1201)	1201	1210	1220	1230	1248	
PR1b_gDNA	(1163)	AAAAACAAGAATTACCTAGATTAAAGTATGACATATTCCTTAAAGGATA						
PR1b_(PW.1)_R	(1131)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
PR1b_(PW.1)_F	(618)	AAAAACAAGAATTACCTAGATTAAAGTATGATGATATTCCTTAAAGGATA						
PR1b_(PW.2)_F	(1135)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
PR1b_(PW.2)_R	(683)	AAAAACAAGAATTACCTAGATTAAAGTATGATGATATTCCTTAAAGGATA						
PR1b_(PW.3)_F	(1176)	AAAAACAANAATTACCTAAA	-----	-----	-----	-----	-----	
PR1b_(PW.3)_R	(598)	AAAAACAAGAATTACCTAGATTAAAGTATGATGATATTCCTTAAAGGATA						
PR1b_(Rywal.1)_F	(1066)	AAAAACAAGAATTACCTAGATTAAAGTATGACATATTCCTTAAAGGATA						
PR1b_(Rywal.1)_R	(593)	AAAAACAAGAATTACCTAGATTAAAGTATGACATATTCCTTAAAGGATA						
PR1b_(Rywal.2)_F	(1053)	AAAAACAAGAATTACCTAGATTAAAGTATGACATATTCCTTAAAGGATA						
PR1b_(Rywal.2)_R	(593)	AAAAACAAGAATTACCTAGATTAAAGTATGACATATTCCTTAAAGGATA						
PR1b_(Rywal.3)_F	(1143)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
PR1b_(Rywal.3)_R	(561)	AAAAACAAGAATTACCTAGATTAAAGTATGACATATTCCTTAAAGGATA						
PR1b_(Desiree.1)_R	(1159)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
PR1b_(Desiree.1)_F	(557)	AAAAACAAGAATTACCTAGATTAAAGTATGATGATATTCCTTAAAGGATA						
PR1b_(Desiree.2)_F	(1143)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
PR1b_(Desiree.2)_R	(641)	AAAAACAAGAATTACCTAGATTAAAGTATGATGATATTCCTTAAAGGATA						
PR1b_(Desiree.3)_F	(1144)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
PR1b_(Desiree.3)_R	(588)	AAAAACAAGAATTACCTAGATTAAAGTATGATGATATTCCTTAAAGGATA						
		Section 27						
		(1249)	1249	1260	1270	1280	1296	
PR1b_gDNA	(1211)	TAGTATTCATGAATCACACGACATGCAR	---	GGTACTAATCACATTT				
PR1b_(PW.1)_R	(1131)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
PR1b_(PW.1)_F	(666)	TAGTATTCATGAATCACACGACATGCAR	---	GGTACTAATCACATTT				
PR1b_(PW.2)_F	(1135)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
PR1b_(PW.2)_R	(731)	TAGTATTCATGAATCACACGACATGCAR	---	GGTACTAATCACATTT				
PR1b_(PW.3)_F	(1196)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
PR1b_(PW.3)_R	(646)	TAGTATTCATGAATCACACGACATGCAR	---	GGTACTAATCACATTT				
PR1b_(Rywal.1)_F	(1114)	TAGTATTCATGAATCACACGACATGCAR	---	GGTACTAATCACATTT				
PR1b_(Rywal.1)_R	(641)	TAGTATTCATGAATCACACGACATGCAR	---	GGTACTAATCACATTT				
PR1b_(Rywal.2)_F	(1101)	TAGTATTCATGAATCACACGACATGCAR	---	GGTACTAATCACATTT				
PR1b_(Rywal.2)_R	(641)	TAGTATTCATGAATCACACGACATGCAR	---	GGTACTAATCACATTT				
PR1b_(Rywal.3)_F	(1143)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
PR1b_(Rywal.3)_R	(609)	TAGTATTCATGAATCACACGACATGCAR	---	GGTACTAATCACATTT				
PR1b_(Desiree.1)_R	(1159)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
PR1b_(Desiree.1)_F	(605)	TAGTATTCATGAATCACACGACATGCAR	---	GGTACTAATCACATTT				
PR1b_(Desiree.2)_F	(1143)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
PR1b_(Desiree.2)_R	(689)	TAGTATTCATGAATCACACGACATGCAR	---	GGTACTAATCACATTT				
PR1b_(Desiree.3)_F	(1144)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
PR1b_(Desiree.3)_R	(636)	TAGTATTCATGAATCACACGACATGCAR	---	GGTACTAATCACATTT				
		Section 28						
		(1297)	1297	1310	1320	1330	1344	
PR1b_gDNA	(1256)	GAATTTTCTTAAATGAAAAATAAATCCACAATGTTTAAATTTAAC						
PR1b_(PW.1)_R	(1131)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
PR1b_(PW.1)_F	(714)	GAATTTTCTTAAATGAAAAATAAATCCACAATGTTTAAATTTAAC						
PR1b_(PW.2)_F	(1135)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
PR1b_(PW.2)_R	(779)	GAATTTTCTTAAATGAAAAATAAATCCACAATGTTTAAATTTAAC						
PR1b_(PW.3)_F	(1196)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
PR1b_(PW.3)_R	(694)	GAATTTTCTTAAATGAAAAATAAATCCACAATGTTTAAATTTAAC						
PR1b_(Rywal.1)_F	(1130)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
PR1b_(Rywal.1)_R	(686)	GAATTTTCTTAAATGAAAAATAAATCCACAATGTTTAAATTTAAC						
PR1b_(Rywal.2)_F	(1146)	GAATTT	-----	-----	-----	-----	-----	
PR1b_(Rywal.2)_R	(686)	GAATTTTCTTAAATGAAAAATAAATCCACAATGTTTAAATTTAAC						
PR1b_(Rywal.3)_F	(1143)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
PR1b_(Rywal.3)_R	(654)	GAATTTTCTTAAATGAAAAATAAATCCACAATGTTTAAATTTAAC						
PR1b_(Desiree.1)_R	(1159)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
PR1b_(Desiree.1)_F	(653)	GAATTTTCTTAAATGAAAAATAAATCCACAATGTTTAAATTTAAC						
PR1b_(Desiree.2)_F	(1143)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
PR1b_(Desiree.2)_R	(737)	GAATTTTCTTAAATGAAAAATAAATCCACAATGTTTAAATTTAAC						
PR1b_(Desiree.3)_F	(1144)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
PR1b_(Desiree.3)_R	(684)	GAATTTTCTTAAATGAAAAATAAATCCACAATGTTTAAATTTAAC						

Se nadaljuje

Nadaljevanje slike A1: Nukleotidna zaporedja promotorja PR1b iz genotipov PW363, Rywal in Désirée, na podlagi katerih smo načrtovali začetne oligonukleotide

		Section 29						
		(1345)	1345	1350	1360	1370	1380	1392
PR1b_gDNA	(1304)	AATCAAAGTTT	GATAAAAAATCTAATCAAGAT	AAAAAATGCTCATT				
PR1b_(PW.1)_R	(1131)	-----						
PR1b_(PW.1)_F	(762)	AATCAAAGTTT	GATAAAAAATCTAATCAAG--	ATAAAAAATGCTCATT				
PR1b_(PW.2)_F	(1135)	-----						
PR1b_(PW.2)_R	(827)	AATCAAAGTTT	GATAAAAAATCTAATCAAG--	ATAAAAAATGCTCATT				
PR1b_(PW.3)_F	(1196)	-----						
PR1b_(PW.3)_R	(742)	AATCAAAGTTT	GATAAAAAATCTAATCAAG--	ATAAAAAATGCTCATT				
PR1b_(Rywal.1)_F	(1130)	-----						
PR1b_(Rywal.1)_R	(734)	AATCAAAGTTT	GATAAAAAATCTAATCAAGAT	AAAAAATGTTTCATT				
PR1b_(Rywal.2)_F	(1152)	-----						
PR1b_(Rywal.2)_R	(734)	AATCAAAGTTT	GATAAAAAATCTAATCAAGAT	AAAAAATGCTCATT				
PR1b_(Rywal.3)_F	(1143)	-----						
PR1b_(Rywal.3)_R	(702)	AATCAAAGTTT	GATAAAAAATCTAATCAAGAT	AAAAAATGTTTCATT				
PR1b_(Desiree.1)_R	(1159)	-----						
PR1b_(Desiree.1)_F	(701)	AATCAAAGTTT	GATAAAAAATCTAATCAAG--	ATAAAAAATGCTCATT				
PR1b_(Desiree.2)_F	(1143)	-----						
PR1b_(Desiree.2)_R	(785)	AATCAAAGTTT	GATAAAAAATCTAATCAAG--	ATAAAAAATGCTCATT				
PR1b_(Desiree.3)_F	(1144)	-----						
PR1b_(Desiree.3)_R	(732)	AATCAAAGTTT	GATAAAAAATCTAATCAAG--	ATAAAAAATGCTCATT				
		Section 30						
		(1393)	1393	1400	1410	1420	1430	1440
PR1b_gDNA	(1352)	TTTGAAAAA-	CTTAAAGGACCGAAAGTAATTA	CTTCTAAAACAATTTGAA				
PR1b_(PW.1)_R	(1131)	-----						
PR1b_(PW.1)_F	(808)	TTTGAAAAA-	CTTAAAGGACCGAAAGTAATTA	CTTCTAAAACAATTTGAA				
PR1b_(PW.2)_F	(1135)	-----						
PR1b_(PW.2)_R	(873)	TTTGAAAAA-	CTTAAAGGACCGAAAGTAATTA	CTTCTAAAACAATTTGAA				
PR1b_(PW.3)_F	(1196)	-----						
PR1b_(PW.3)_R	(788)	TTTGAAAAA-	CTTAAAGGACCGAAAGTAATTA	CTTCTAAAACAATTTGAA				
PR1b_(Rywal.1)_F	(1130)	-----						
PR1b_(Rywal.1)_R	(781)	TTTGAAAAA-	CTTAAAGGACCGAAAGTAATTA	CTTCTAAAACAATTTGAA				
PR1b_(Rywal.2)_F	(1152)	-----						
PR1b_(Rywal.2)_R	(782)	TTTGAAAAA-	CTTAAAGGACCGAAAGTAATTA	CTTCTAAAACAATTTGAA				
PR1b_(Rywal.3)_F	(1143)	-----						
PR1b_(Rywal.3)_R	(749)	TTTGAAAAA-	CTTAAAGGACCGAAAGTAATTA	CTTCTAAAACAATTTGAA				
PR1b_(Desiree.1)_R	(1159)	-----						
PR1b_(Desiree.1)_F	(747)	TTTGAAAAA-	CTTAAAGGACCGAAAGTAATTA	CTTCTAAAACAATTTGAA				
PR1b_(Desiree.2)_F	(1143)	-----						
PR1b_(Desiree.2)_R	(831)	TTTGAAAAA-	CTTAAAGGACCGAAAGTAATTA	CTTCTAAAACAATTTGAA				
PR1b_(Desiree.3)_F	(1144)	-----						
PR1b_(Desiree.3)_R	(778)	TTTGAAAAA-	CTTAAAGGACCGAAAGTAATTA	CTTCTAAAACAATTTGAA				
		Section 31						
		(1441)	1441	1450	1460	1470	1488	
PR1b_gDNA	(1399)	GGACAAAAT	GGCTCAACGAAATACACACGAGACT	ATTTTGAACCTAC				
PR1b_(PW.1)_R	(1131)	-----						
PR1b_(PW.1)_F	(855)	GGACAAAAT	GGCTCAACGAAATACACACGAGACT	ATTTTGAACCTAC				
PR1b_(PW.2)_F	(1135)	-----						
PR1b_(PW.2)_R	(920)	GGACAAAAT	GGCTCAACGAAATACACACGAGACT	ATTTTGAACCTAC				
PR1b_(PW.3)_F	(1196)	-----						
PR1b_(PW.3)_R	(835)	GGACAAAAT	GGCTCAACGAAATACACACGAGACT	ATTTTGAACCTAC				
PR1b_(Rywal.1)_F	(1130)	-----						
PR1b_(Rywal.1)_R	(829)	GGACAAAAT	GGCTCAACGAAATACACACGAGACT	ATTTTGAACCTAC				
PR1b_(Rywal.2)_F	(1152)	-----						
PR1b_(Rywal.2)_R	(829)	GGACAAAAT	GGCTCAACGAAATACACACGAGACT	ATTTTGAACCTAC				
PR1b_(Rywal.3)_F	(1143)	-----						
PR1b_(Rywal.3)_R	(797)	GGACAAAAT	GGCTCAACGAAATACACACGAGACT	ATTTTGAACCTAC				
PR1b_(Desiree.1)_R	(1159)	-----						
PR1b_(Desiree.1)_F	(794)	GGACAAAAT	GGCTCAACGAAATACACACGAGACT	ATTTTGAACCTAC				
PR1b_(Desiree.2)_F	(1143)	-----						
PR1b_(Desiree.2)_R	(878)	GGACAAAAT	GGCTCAACGAAATACACACGAGACT	ATTTTGAACCTAC				
PR1b_(Desiree.3)_F	(1144)	-----						
PR1b_(Desiree.3)_R	(825)	GGACAAAAT	GGCTCAACGAAATACACACGAGACT	ATTTTGAACCTAC				
		Section 32						
		(1489)	1489	1500	1510	1520	1536	
PR1b_gDNA	(1447)	TATCAAAGATA	AAGAGACCATTTTATCATTTCCCTCTACTAATTTCCCT					
PR1b_(PW.1)_R	(1131)	-----						
PR1b_(PW.1)_F	(903)	TATCAAAGATA	AAGAGACCATTTTATCATTTCCCTCTACTAATTTCCCT					
PR1b_(PW.2)_F	(1135)	-----						
PR1b_(PW.2)_R	(968)	TATCAAAGATA	AAGAGACCATTTTATCATTTCCCTCTACTAATTTCCCT					
PR1b_(PW.3)_F	(1196)	-----						
PR1b_(PW.3)_R	(883)	TATCAAAGATA	AAGAGACCATTTTATCATTTCCCTCTACTAATTTCCCT					
PR1b_(Rywal.1)_F	(1130)	-----						
PR1b_(Rywal.1)_R	(877)	TATCAAAGATA	AAGAGACCATTTTATCATTTCCCTCTACTAATTTCCCT					
PR1b_(Rywal.2)_F	(1152)	-----						
PR1b_(Rywal.2)_R	(877)	TATCAAAGATA	AAGAGACCATTTTATCATTTCCCTCTACTAATTTCCCT					
PR1b_(Rywal.3)_F	(1143)	-----						
PR1b_(Rywal.3)_R	(845)	TATCAAAGATA	AAGAGACCATTTTATCATTTCCCTCTACTAATTTCCCT					
PR1b_(Desiree.1)_R	(1159)	-----						
PR1b_(Desiree.1)_F	(842)	TATCAAAGATA	AAGAGACCATTTTATCATTTCCCTCTACTAATTTCCCT					
PR1b_(Desiree.2)_F	(1143)	-----						
PR1b_(Desiree.2)_R	(926)	TATCAAAGATA	AAGAGACCATTTTATCATTTCCCTCTACTAATTTCCCT					
PR1b_(Desiree.3)_F	(1144)	-----						
PR1b_(Desiree.3)_R	(873)	TATCAAAGATA	AAGAGACCATTTTATCATTTCCCTCTACTAATTTCCCT					

Se nadaljuje

Nadaljevanje slike A1: Nukleotidna zaporedja promotorja PR1b iz genotipov PW363, Rywal in Désirée, na podlagi katerih smo načrtovali začetne oligonukleotide

		Section 33					
		(1537)	1537	1550	1560	1570	1584
PR1b_gDNA (1495)		T	G	A	A	T	T
PR1b_(PW.1)_R (1131)		-----	-----	-----	-----	-----	-----
PR1b_(PW.1)_F (951)		T	A	A	A	T	T
PR1b_(PW.2)_F (1135)		-----	-----	-----	-----	-----	-----
PR1b_(PW.2)_R (1016)		T	A	A	A	T	T
PR1b_(PW.3)_F (1196)		-----	-----	-----	-----	-----	-----
PR1b_(PW.3)_R (931)		T	A	A	A	T	T
PR1b_(Rywal.1)_F (1130)		-----	-----	-----	-----	-----	-----
PR1b_(Rywal.1)_R (925)		T	G	A	A	T	T
PR1b_(Rywal.2)_F (1152)		-----	-----	-----	-----	-----	-----
PR1b_(Rywal.2)_R (925)		T	G	A	A	T	T
PR1b_(Rywal.3)_F (1143)		-----	-----	-----	-----	-----	-----
PR1b_(Rywal.3)_R (893)		T	G	A	A	T	T
PR1b_(Desiree.1)_R (1159)		-----	-----	-----	-----	-----	-----
PR1b_(Desiree.1)_F (890)		T	G	A	A	T	T
PR1b_(Desiree.2)_F (1143)		-----	-----	-----	-----	-----	-----
PR1b_(Desiree.2)_R (974)		T	A	A	A	T	T
PR1b_(Desiree.3)_F (1144)		-----	-----	-----	-----	-----	-----
PR1b_(Desiree.3)_R (921)		T	A	A	A	T	T
		Section 34					
		(1585)	1585	1590	1600	1610	1620
PR1b_gDNA (1543)		T	A	T	A	A	T
PR1b_(PW.1)_R (1131)		-----	-----	-----	-----	-----	-----
PR1b_(PW.1)_F (999)		T	A	T	A	A	T
PR1b_(PW.2)_F (1135)		-----	-----	-----	-----	-----	-----
PR1b_(PW.2)_R (1064)		T	A	T	A	A	T
PR1b_(PW.3)_F (1196)		-----	-----	-----	-----	-----	-----
PR1b_(PW.3)_R (979)		T	A	T	A	A	T
PR1b_(Rywal.1)_F (1130)		-----	-----	-----	-----	-----	-----
PR1b_(Rywal.1)_R (970)		T	A	T	A	A	T
PR1b_(Rywal.2)_F (1152)		-----	-----	-----	-----	-----	-----
PR1b_(Rywal.2)_R (973)		T	A	T	A	A	T
PR1b_(Rywal.3)_F (1143)		-----	-----	-----	-----	-----	-----
PR1b_(Rywal.3)_R (938)		T	A	T	A	A	T
PR1b_(Desiree.1)_R (1159)		-----	-----	-----	-----	-----	-----
PR1b_(Desiree.1)_F (938)		T	A	T	A	A	T
PR1b_(Desiree.2)_F (1143)		-----	-----	-----	-----	-----	-----
PR1b_(Desiree.2)_R (1022)		T	A	T	A	A	T
PR1b_(Desiree.3)_F (1144)		-----	-----	-----	-----	-----	-----
PR1b_(Desiree.3)_R (969)		T	A	T	A	A	T
		Section 35					
		(1633)	1633	1640	1650	1660	1670
PR1b_gDNA (1591)		T	A	T	T	T	T
PR1b_(PW.1)_R (1131)		-----	-----	-----	-----	-----	-----
PR1b_(PW.1)_F (1047)		T	A	T	T	T	T
PR1b_(PW.2)_F (1135)		-----	-----	-----	-----	-----	-----
PR1b_(PW.2)_R (1112)		T	A	T	T	T	T
PR1b_(PW.3)_F (1196)		-----	-----	-----	-----	-----	-----
PR1b_(PW.3)_R (1027)		T	A	T	T	T	T
PR1b_(Rywal.1)_F (1130)		-----	-----	-----	-----	-----	-----
PR1b_(Rywal.1)_R (1018)		T	A	T	T	T	T
PR1b_(Rywal.2)_F (1152)		-----	-----	-----	-----	-----	-----
PR1b_(Rywal.2)_R (1021)		T	A	T	T	T	T
PR1b_(Rywal.3)_F (1143)		-----	-----	-----	-----	-----	-----
PR1b_(Rywal.3)_R (986)		T	A	T	T	T	T
PR1b_(Desiree.1)_R (1159)		-----	-----	-----	-----	-----	-----
PR1b_(Desiree.1)_F (986)		T	A	T	T	T	T
PR1b_(Desiree.2)_F (1143)		-----	-----	-----	-----	-----	-----
PR1b_(Desiree.2)_R (1070)		T	A	T	T	T	T
PR1b_(Desiree.3)_F (1144)		-----	-----	-----	-----	-----	-----
PR1b_(Desiree.3)_R (1017)		T	A	T	T	T	T
		Section 36					
		(1681)	1681	1690	1700	1710	1720
PR1b_gDNA (1639)		C	A	T	T	G	T
PR1b_(PW.1)_R (1131)		-----	-----	-----	-----	-----	-----
PR1b_(PW.1)_F (1095)		C	A	T	T	G	T
PR1b_(PW.2)_F (1135)		-----	-----	-----	-----	-----	-----
PR1b_(PW.2)_R (1160)		C	A	T	T	G	T
PR1b_(PW.3)_F (1196)		-----	-----	-----	-----	-----	-----
PR1b_(PW.3)_R (1075)		C	A	T	T	G	T
PR1b_(Rywal.1)_F (1130)		-----	-----	-----	-----	-----	-----
PR1b_(Rywal.1)_R (1066)		C	A	T	T	G	T
PR1b_(Rywal.2)_F (1152)		-----	-----	-----	-----	-----	-----
PR1b_(Rywal.2)_R (1069)		C	A	T	T	G	T
PR1b_(Rywal.3)_F (1143)		-----	-----	-----	-----	-----	-----
PR1b_(Rywal.3)_R (1034)		C	A	T	T	G	T
PR1b_(Desiree.1)_R (1159)		-----	-----	-----	-----	-----	-----
PR1b_(Desiree.1)_F (1034)		C	A	T	T	G	T
PR1b_(Desiree.2)_F (1143)		-----	-----	-----	-----	-----	-----
PR1b_(Desiree.2)_R (1118)		C	A	T	T	G	T
PR1b_(Desiree.3)_F (1144)		-----	-----	-----	-----	-----	-----
PR1b_(Desiree.3)_R (1065)		C	A	T	T	G	T

Se nadaljuje

Slika A1: Vsaka različica promotorjev iz kultivarjev PW, Rywal in Désirée je bila sekvencirana iz 5' (F) in 3' (R) konca, zaporedji v sredini nalegata. Svetlo sivo označeni deli predstavljajo ujemajoče nukleotidno zaporedje, temno sivi pa večinsko ujemanje.