UNIVERZA V LJUBLJANI BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Tjaša STARE

PROUČEVANJE DINAMIKE ODZIVA KROMPIRJA (Solanum tuberosum L.) NA OKUŽBO S KROMPIRJEVIM VIRUSOM Y NA RAVNI TRANSKRIPTOMA IN DRUGIH FIZIOLOŠKIH DEJAVNIKOV

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Tjaša STARE

PROUČEVANJE DINAMIKE ODZIVA KROMPIRJA (Solanum tuberosum L.) NA OKUŽBO S KROMPIRJEVIM VIRUSOM Y NA RAVNI TRANSKRIPTOMA IN DRUGIH FIZIOLOŠKIH DEJAVNIKOV

DOKTORSKA DISERTACIJA

DYNAMICS OF POTATO (*Solanum tuberosum* L.) RESPONSE TO POTATO VIRUS Y AT THE LEVEL OF TRANSCRIPTOMICS AND OTHER PHYSIOLOGICAL PARAMETERS

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2016

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa 31. seje Komisije za doktorski študij UL z dne 19. 9. 2012 (po pooblastilu Senata Univerze z dne 20. 1. 2009) je bilo potrjeno, da kandidatka izpolnjuje pogoje za opravljanje doktorata znanosti na Interdisciplinarnem doktorskem študijskem programu Bioznanosti, znanstveno področje: biotehnologija. Za mentorico je bila imenovana prof. dr. Kristina Gruden.

Doktorsko delo je bilo opravljeno na Oddelku za biotehnologijo in sistemsko biologijo Nacionalnega inštituta za biologijo v Ljubljani. Del raziskav je bilo opravljenih v sodelovanju z Odsekom za tehnologije znanja Instituta »Jožef Stefan«, del pa v sodelovanju z Biotehniško fakulteto, Univerze v Ljubljani, Oddelkom za agronomijo.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:	prof. dr. Borut BOHANEC Univerza v Liubliani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomiju				
Član:	prof. dr. Vladimir MEGLIČ Kmetijski inštitut Slovenije, Oddelek za poljedelstvo, vrtnarstvo, genetiko in žlahtnjenje				
Član:	prof. dr. Jernej JAKŠE Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo				

Datum zagovora: 18. 3. 2016

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

Tjaša Stare

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dd

- DK UDK 582.930.11:581.132(043.3)=163.6
- KG virus/krompir/PVY^{NTN}/*Solanum tuberosum* L./modeliranje/transkriptomika/ proteomika/meritve fotosinteze/kaloza/sistemska biologija
- AV STARE, Tjaša, univ. dipl. biokem.
- SA GRUDEN, Kristina (mentor)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni doktorski študij Bioznanosti, področje biotehnologija
- LI 2016 IN PROUČEVANJE DINAMIKE ODZIVA KROMPIRJA (*Solanum tuberosum* L.) NA OKUŽBO S KROMPIRJEVIM VIRUSOM Y NA RAVNI TRANSKRIPTOMA IN DRUGIH FIZIOLOŠKIH DEJAVNIKOV
- TD Doktorska disertacija
- OP XVII, 204 str., 20 pregl., 52 sl., 8 pril., 199 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI S pristopi sistemske biologije smo analizirali dinamični odziv rastline krompirja (Solanum tuberosum L.) na okužbo s patogenim virusom PVY. Izgradili smo model signalizacijskih poti salicilne kisline, jasmonske kisline in etilena, glavnih fitohormonov rastlinskega imunskega odziva. Povezave v modelu smo potrdili in razširili s povezavami, pridobljenimi z Bio3graf metodo Bio3graf za tekstovno rudarjenje, ki smo jo razvili tekom doktorskega dela. Na nivoju komponent smo model razširili s proteinskimi interaktorji navadnega repnjakovca (Arabidopsis thaliana) in ga s pomočjo translacijske biologije prevedli na kulturno rastlino krompir. Vzporedno z izgradnjo modela, smo analizirali dinamični odgovor krompirja na okužbo z virusom PVY. Spremembe celotnega transkriptoma krompirja 'Désirée' ter NahG-Désirée smo spremljali v inokuliranih ter neinokuliranih listih v 0., 1., 3., 4., 5., 7., 8., 9., in 11. dnevu po okužbi (dpi). Analizirali smo spremembe proteoma krompirja genotipov 'Désirée', NahG-Désirée in Désirée coi1-RNAi rastlin 4. dpi. Analizirali smo dinamiko fizioloških sprememb preko pojavov simptomov ter ovrednotili akumulacijo in širjenje virusa v neokužena tkiva. Ovrednotili smo dinamične spremembe aktivnosti fotosinteze ter akumulacije kaloze. Z integracijo obeh pristopov, modeliranja ter bioloških dinamičnih analiz, smo identificirali nove potencialno ključne komponente v odzivu rastline. Vlogo dveh kinaz (StSAPK8, StPK11) ter dveh fosfataz (StPP2C, StAVR9) smo ovrednotili z analizami funkcijske genomike.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Dd

- DC UDC 582.930.11:581.132(043.3)=163.6
- CX virus/potato/PVY^{NTN}/*Solanum tuberosum* L./modelling/transcriptomics/ proteomics/photosynthetic measurements/calose/systems biology/
- AU STARE, Tjaša
- AA GRUDEN, Kristina (supervisor)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdisciplinary Doctoral Programme in Biosciences, scientific field Biotechnology
- PY 2016
- TI DYNAMICS OF POTATO (*SOLANUM TUBEROSUM* L.) RESPONSE TO POTATO VIRUS Y AT THE LEVEL OF TRANSCRIPTOMICS AND OTHER PHYSIOLOGICAL PARAMETERS.
- DT Doctoral Dissertation
- NO XVII, 230 p., 20 tab., 52 fig., 8 ann., 199 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB Systems biology approaches were used to analyze dynamics of potato (Solanum tuberosum L.) response to its pathogen, virus PVY. A model consisting of salicylic acid, jasmonic acid and ethylene, three main phytohormones, responsible for plant immune response signalling network has been constructed. Reactions in the model have been validated and expanded with Bio3Graph, a text mining method, which was developed during this work. We expanded the model with Arabidopsis (Arabidopsis thaliana) protein interactors and translate it to the potato. In parallel with model construction, analysis of dynamic potato response to PVY was evaluated. Whole transcriptome changes of cultivar 'Désirée' and NahG-Désirée were analysed in inoculated and systemically infected leaves following 0, 1, 3, 4, 5, 7, 8, 9, and 11 days after infection (dpi). Potato proteome changes were analyzed in three genotypes 'Désirée', NahG-Désirée and Désirée coi1-RNAi at 4 dpi. Dynamics of physiological changes were evaluated on the level of symptoms development and measuring virus accumulation and spread to uninfected tissue, with dynamical changes of photosynthetic activity and callose accumulation. Integration of both, modelling with experimental data enabled us to identify novel potentially crucial components in plant defense. The role of two kinases (StSAPK8, StPK11) and two phosphatases (StPP2C, StAVR9) has been evaluated with functional analysis.

KAZALO VSEBINE

KLJUČ	NA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III			
KEY W	ORDS DOCUMENTATION	IV			
KAZAI	LO VSEBINE	V			
KAZAI	LO PREGLEDNIC	VIII			
KAZAI	LO SLIK	IX			
KAZAI	LO PRILOG	XII			
OKRAJ	JŠAVE IN SIMBOLI	XIII			
1	UVOD	16			
1.1	CILJI IN HIPOTEZE DOKTORSKE NALOGE				
2	PREGLED OBJAV	19			
2.1	RASTLINE V OKOLJU SO IZPOSTAVLJENE RAZLIČNIM	STRESNIM			
	DEJAVNIKOM				
2.2	MEHANIZMI RASTLINSKE OBRAMBE OB OKUŽBI S PATO	OGENOM 19			
2.2.1	Signalne obrambne poti rastlinskega imunskega odziva				
2.3	RASTLINSKI VIRUSI				
2.3.1	Krompirjev virus Y				
2.4	KROMPIR (Solanum tuberosum 1.)				
2.5	ODZIV KROMPIRJA NA OKUŽBO S KROMPIRJEVIM VIRU	SOM Y 28			
2.5.1	Razvoj simptomov				
2.5.2	Mikroskopske spremembe				
2.5.3	Primarni metabolizem sladkorjev in fotosinteza				
2.5.4	Signalizacijske poti rastlinskih hormonov				
2.5.5	Spremembe na nivoju izražanja genov				
2.5.6	Krompirji sorte 'Désirée' ter transgene rastline NahG-Désirée in Désirée				
	coi1-RNAi				
2.6	REŠEVANJE BIOLOŠKEGA PROBLEMA S POMOČJO S	SISTEMSKE			
	BIOLOGIJE				
2.6.1	Visoko zmogljive metode molekularne biologije za proučevar	ije bioloških			
	sistemov				
2.6.2	Matematično modeliranje v biologiji				
3	MATERIALI IN METODE	41			
3.1	MATERIALI	41			
3.1.1	Seznam uporabljenih pufrov in gojišč	41			
3.1.2	Uporabljeni oligonukleotidni začetniki	42			
3.1.3	Uporabljeni plazmidi	44			
3.2	METODE	47			
3.2.1	Priprava rastlinskega materiala	49			
3.2.2	Izolacija, priprava in analiza RNA	52			

3.2.3	Določanje koncentracije in čistosti nukleinskih kislin
3.2.4	PCR v realnem času
3.2.5	Mikromreže
3.2.6	Meritve vsebnosti klorofila ter fotosintetske aktivnosti
3.2.7	Spremljanje kopičenja kaloze 58
3.2.8	Izgradnja modela signalizacije imunskega odziva pri rastlinah 58
3.2.9	Bioinformatske analize
3.2.10	Funkcionalne analize
4	REZULTATI
4.1	MODEL SIGNALIZACIJSKIH POTI IMUNSKEGA ODZIVA PRI
	RASTLINAH
4.1.1	Izbira primernega formalizma za pripravo modela
4.1.2	Ontologija in hierarhija na nivoju komponent in povezav
4.1.3	Izgradnja modela v Cell Illustratorju72
4.1.4	Shema modela salicilne kisline
4.1.5	Shema modela etilena
4.1.6	Shema modela jasmonske kisline
4.2	RAZŠIRITVE MODELA Z JAVNO DOSTOPNIM ZNANJEM IN PREVOD
	NA KROMPIR
4.2.1	Tekstovno rudarjenje
4.2.2	Formalizem usmerjenega grafa z označenimi povezavami
4.2.3	Validacije Bio3Graf metode
4.2.4	Ekstrakcija tripletov iz literature
4.2.5	Razširjen model z informacijami o med proteinskih interakcijah
	navadnega repnjakovca
4.2.6	Kinetično modeliranje
4.3	DINAMIKA ODZIVA KROMPIRJA NA OKUŽBO S KROMPIRJEVIM
	VIRUSOM Y NA RAZLIČNIH NIVOJIH
4.3.1	Fenotipske spremembe krompirja okuženega z virusom PVY ^{NTN}
4.3.2	Dinamika kopičenje virusa v krompirju sorte 'Désirée' in dveh transgenih
	rastlin NahG-Désirée ter Désirée coi1-RNAi
4.3.3	Dinamika izražanja genov po okužbi z virusom PVY ^{NTN}
4.3.4	Dinamika fotosinteznih parametrov112
4.3.5	Kopičenje kaloze 123
4.3.6	Virusno-povzročene spremembe proteoma 124
4.4	DOLOČITEV KLJUČNIH KOMPONENT ODGOVORU RASTLINE NA
	VIRUSNO OKUŽBO 128
4.4.1	Izbor glede na transkriptomske analize in podatke modela signalizacijskih
	poti odgovora rastline na stres 128
4.4.2	Analiza nukleotidnega zaporedja genov StSAPK8, StPK11, StPP2C in
	StAVR9 krompirja sorte 'Désirée' 131

4.4.3	Izražanje genov StSAPK8, StPK11, StPP2C in StAVR9 v drugih
	krompirjevih sortah 133
4.4.4	Potrditev rezultatov mikromrež za gen StSAPK8 z RT-qPCR 134
4.5	FUNKCIONALNE ANALIZE
4.5.1	Proteinski interaktorji kinaz in fosfataz v navadnem repnjakovcu 137
4.5.2	Prehodno utišanje gena StSAPK8140
4.5.3	Analiza dvohibridnega sistema kvasovk identificira StSAPK8
	interaktorje
4.5.4	Vpliv različnih hormonov na izražanje gena StSAPK8142
5	RAZPRAVA IN SKLEPI144
5.1	RAZPRAVA
5.1.1	Manualna izgradnja modela signalizacijskih poti imunskega odziva 144
5.1.2	Večino novih povezav pridobljenih z Bio3graf metodo je indirektnih 146
5.1.3	Konceptualni pregled nad interakcijami med komponentami signalnih poti
511	
3.1.4	krompir
5.1.5	Odgovor krompirja na okužbo z virusom PVY je zelo dinamičen 152
5.1.6	Virusna okužba povzroči reprogramiranje celičnega metabolizma 153
5.1.7	Virusno inducirano reprogramiranje izražanja genov se le delno
	manifestira v meritvah fotosintetske aktivnosti 157
5.1.8	Vpogled v virusno inducirane spremembe na nivoju proteoma potrdijo
	pomen fotosinteznih komponent v rastlinskem imunskem odzivu 159
5.1.9	Povezava modeliranja in eksperimentalnih podatkov vodi v identifikacijo
	novih komponent imunskega odziva krompirja160
5.1.10	Virusno inducirana kinaza StSAPK8 povezuje biotsko signaliziranje s
	signalizacijsko potjo abscizinske poti163
5.2	SKLEPI
6	POVZETEK169
7	SUMMARY172
8	VIRI
ZAHVA	LA
PRILO	GE

KAZALO PREGLEDNIC

Pregl.	1:	Seznam uporabljenih pufrov in gojišč41					
Pregl.	2:	Oligonukleotidni začetniki in sonde za spremljanje izražanja genov krompirja z RT-aPCR. 42					
Pregl.	3:	Oligonukleotidni začetniki uporabljen pri analizi dvohibridnega sistema kvasovk					
Pregl.	4:	Pogoji pomnoževanja genov s PCR					
Pregl.	5:	PCR za pripravo fragmentov za prekloniranje					
Pregl.	6:	Primer ovrednotenje spreminjanja koncentracije substrata in nastajanja produkta v reakciji fosforilacije proteina					
Pregl.	7:	Primer ovrednotenje spreminjanja koncentracije substrata in nastajanja produkta (diskretne vrednosti) v reakciji transporta molekul					
Pregl.	8:	Analiza učinkovitosti Bio3Graf metode izvedena na 50 anotiranih člankih83					
Pregl.	9:	Število pridobljenih tripletov z Bio3Graf metodo					
Pregl. 1	10:	Statistična analiza sprememb izražanja genov					
Pregl. 1	11:	Kopičenja virusne RNA v lamini in glavni žili v zgornjih sistemskih listih					
		krompirja 'Désirée'					
Pregl. 1	12:	Kopičenja virusne RNA v lamini in glavni žili v zgornjih sistemskih listih					
		krompirja NahG-Désirée					
Pregl. 1	13:	Rezultati analize gensko obogatitvene metode (GSEA) 102					
Pregl. 1	14:	Validacija mikromrežnih podatkov s pomočjo metode RT-qPCR 111					
Pregl. 1	15:	Statistična analiza parametrov fotosintetske aktivnosti po okužbi z virusom PVY v inokuliranih listih					
Pregl. 1	16:	Analiza krompirjevega proteoma po okužbi z virusom 125					
Pregl. 1	17:	Izražanje genov, ki pripadajo proteinom iz preglednice 14 126					
Pregl. 1	18:	Identifikatorji krompirjevih genov StSAPK8, StPK11, StPP2C in StAVR9 in njihovi ortologi v navadnem repnjakovcu					
Pregl. 1	19:	Spremembe izražanja genov StSAPK8, StPK11, StPP2C in StAVR9 po okužbi z virusom					
Pregl. 2	20:	Vrednosti izražanja genov StPK11, StSAPK8, StPP2C in StAVR9 v sortah krompirja 'PW363', 'Rywal' in NahG-Rywal					

KAZALO SLIK

Sl. 1:	Zig-zag model za evolucijo rastlinskega imunskega odziva in rastlinske obrambe na podlagi utišanja proti virusnim in ne-virusnim patogenenom (Zvereva in Pooggin, 2012: 2582)
Sl. 2:	Poenostavljen model molekularne signalizacije vključene v transkripcijsko regulacijo signalizacijske poti SA (A), JA (B), ter antagonizem med SA in JA signalizacijskima potema (C) (Caarls in sod., 2015: 3)
Sl. 3:	Determinante patogeneze mapirane na genom PVY in rekombinacijski vzorec izolatov PVY ^{NTN} in PVY ^N -W (Quenouille in sod., 2013:3)
Sl. 4:	Simptomi, ki jih povzroča virus PVY (Quenouille in sod., 2013:2) 27
Sl. 5:	Shema poteka iterativnega procesa izgradnje razumevanja biološkega problema s pomočjo sistemske biologije
Sl. 6:	Shema signalizacijskih poti SA, JA in ET (Pieterse in sod., 2009: 313) 39
Sl. 7:	Shema pENTR TM 4 Dual plazmida (Thermo Fisher Scientifice)
Sl. 8:	Plazmidna karta vektorja PH7GWIWG2(II) (Karimi in sod., 2002) 45
Sl. 9:	Plazmidna karta vektorja pGEM®-T in pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega)
Sl. 10:	Plazmidna karta vektorjev pGBKT7 (vaba) in pGADT7 (plen) dvohibridnega sistema kvasovke (Clonetech)
Sl. 11:	Shema poteka dela
Sl. 12:	Shema vzorčenja rastlinskega materiala
Sl. 13:	Vzorčenje rastlin krompirja
Sl. 14:	Tipi bioloških reakcij in komponent ter njihova grafična reprezentacija v modelu
Sl. 15:	Hierarhija reakcij (A) in komponent (B)
Sl. 16:	Model signalizacijskih poti imunskega odziva pri navadnem repnjakovcu 73
Sl. 17:	Model biosinteze in signalizacijske poti SA v1.0 (za legendo glej sliko 14) 76
Sl. 18:	Model biosinteze in signalizacijske poti ET v1.0 (za legendo glej sliko 14) 78
Sl. 19:	Model biosinteze in signalizacijske poti JA v 1.0 (zalegendo glej sliko 14) 80
Sl. 20:	Principi prevajanja iz petri net grafa v usmerjen graf z označenimi povezavami.
Sl. 21:	Razširjen model z novimi povezavami dobljenimi z Bio3Graf-om 85

Sl. 22:	Nove direktne povezave pridobljene z Bio3Graf metodo
Sl. 23:	Vizualizacija modela z dodanimi proteini, ki so v interakciji s proteini modela
Sl. 24:	Primer dinamične simulacije modela SA
Sl. 25:	Rastline in listi krompirja sorte 'Désirée' in dveh genotipov NahG-Désirée ter Désirée coi1-RNAi
Sl. 26:	Kopičenje virusne RNA, ki smo jo analizirali s PCR v realnem času
Sl. 27:	Primerjava kopičenja virusne RNA med lamino in žilo
Sl. 28:	Primer elektroforeznega gela celokupne RNA izolirane iz krompirjevih listov (Désirée coi1-RNAi) pred DNAzno reakcijo
Sl. 29:	Venovi diagrami diferencialno izraženih genov za vzorca 'Désirée' NT ter NahG-Désirée v posameznih časovnih točkah
Sl. 30:	Dinamika izražanja genov (log ₂ FC) vključenih v primarni metabolizem 106
Sl. 31:	Transkripti RuBisCO so specifično regulirani v virusno induciranem odzivu
Sl. 32:	Vsebnost klorofila v spodnjih listih krompirja 'Désirée' (NT), NahG-Désirée (NahG) in Désirée coi1-RNAi (coi1-RNAi)
Sl. 33:	Vsebnost klorofila v zgornjih listih krompirja 'Désirée' (NT), NahG-Désirée (NahG) in Désirée coi1-RNAi (coi1-RNAi)
Sl. 34:	Meritve neto fotosinteze (µmol CO2 m-2 s-1) v spodnjih listih krompirja 'Désirée' (NT), NahG-Désirée (NahG) in Désirée coi1-RNAi (coi1-RNAi). 114
Sl. 35:	Prevodnost listnih rež (mol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹) v spodnjih listih krompirja 'Désirée' (NT), NahG-Désirée (NahG) in Désirée coi1-RNAi (coi1-RNAi) 115
Sl. 36:	Transpiracija (mmol H2O m ⁻² s ⁻¹) v spodnjih listih krompirja 'Désirée' (NT), NahG-Désirée (NahG) in Désirée coi1-RNAi (coi1-RNAi)
Sl. 37:	Dejanska fotokemična učinkovitost (Fv'/Fm') v spodnjih listih krompirja 'Désirée' (NT), NahG-Désirée (NahG) in Désirée coi1-RNAi (coi1-RNAi). 117
Sl. 38:	Meritve neto fotosinteze (µmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹) v zgornjih listih krompirja 'Désirée' (NT), NahG-Désirée (NahG) in Désirée coi1-RNAi (coi1-RNAi)
Sl. 39:	Prevodnost listnih rež (mol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹) v zgornjih listih krompirja 'Désirée' (NT), NahG-Désirée (NahG) in Désirée coi1-RNAi (coi1-RNAi) 119
Sl. 40:	Transpiracija (mmol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹) v zgornjih listih krompirja 'Désirée' (NT), NahG-Désirée (NahG) in Désirée coi1-RNAi (coi1-RNAi)
Sl. 41:	Dejanska fotokemična učinkovitost (Fv'/Fm') v zgornjih listih krompirja

	'Désirée' (NT), NahG-Désirée (NahG) in Désirée coi1-RNAi (coi1-RNAi) po okužbi z virusom (PVY) in v slepo inokuliranih rastlinah (MOCK) 121
Sl. 42:	Akumulacija kaloze v listih krompirja 'Désirée' (NT) in NahG-Désirée (NahG) po okužbi z virusom (PVY) in v slepo inokuliranih rastlinah (mock)
Sl. 43:	Poravnava kodirajočih zaporedij krompirjevih genov StSAPK8, StPK11, StPP2C in StAVR9 z referenčnimi zaporedji
Sl. 44:	Primerjava profila izražanja gena StSAPK8 pridobljenega z dvema metodama, mikromrežami cDNA(zgoraj) in z RT-qPCR (spodaj)
Sl. 45:	Filogenetski drevesi kinaz (A) in fosfataz (B) z ortologi v krompirju in navadnem repnjakovcu
Sl. 46:	Poravnava zaporedja krompirjevega proteina StSAPK8 z ortologi navadnjega repnjakovca iz družine SnRK2 in analiza njegovih domen
Sl. 47:	Proteinski interaktorji kinaz AtSnRK2.1, AtSnRK2.2, AtSnRK2.3, AtSnRK2.4, AtSnRK2.6 in AtSnRK2.10
Sl. 48:	Proteinski interaktorji fosfataz PP2C 139
Sl. 49:	Relativno izražanje gena StSAPK8 v vzorcih krompirja 'Désirée' (zgoraj) in NahG-Désirée (spodaj)
Sl. 50:	Shema rezultatov dvohibridnega sistema kvasovk
Sl. 51:	Relativno izražanje gena StSAPK8 po tretiranju rastlin s fitohormoni JA, ET, SA in ABA
Sl. 52:	Model regulacije izražanja gena StSAPK8 s hormoni JA, ET in ABA 165

KAZALO PRILOG

Priloga A:	Povzetek vseh reakcij v manualno izgrajenem modelu			
Priloga B:	Preglednica komponent modela			
Priloga C:	Slovar komponent modela s sinonimi uporabljen za tekstovno rudarjenje 205			
Priloga D:	Primer sinonimov reakcij uporabljenih za Bio3Graf- prikazano za sinonime			
	aktivacije v tvorniškem glagolskem načinu			
Priloga E:	Seznam genov dodanih v model preko proteinskih interakcij (Consortium,			
	2011)			
Priloga F:	Geni iz model s krompirjevimi identifikatorji ter pripadajočimi vrednostmi			
	izražanja			
Priloga G:	Ortologi kinaze StSAPK8 in StPK11 v krompirju in navadnem repnjakovcu			
	(glede na predikcijo PLAZE in šibkih komponent) 226			
Priloga H:	Ortologi fosfataz StPP2C in StAvr9 v krompirju in navadnem repnjakovcu			
	(glede na predikcijo PLAZE in šibkih komponent)			

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

18S	18S rRNA
ABA	abscizinska kislina
BIN	ontološka kategorija
bp	bazni par (<i>base pair</i>)
CAB	klorofil a/b vezavni protein
CaMV	virus cvetačnega mozaika (cauliflower mosaic virus)
cDNA	komplementarna DNA
CMV	virus mozaika kumar <i>(cucumber mosaic virus)</i>
COI1	koreceptor za jasmonil-izolevcin (coronatine-insensitive 1)
COX	citokrom oksidaza
CV.	sorta (<i>cultivar</i>)
CwINV	invertaza celične stene
Cy3	fluorescenčno barvilo cyanine3
Da	dalton, enota za molekulsko maso
Désirée	krompir sorte 'Désirée' (netransgen)
DNAza	deoksiribonukleaza
Dpi	število dni po inokulaciji
E	transpiracija
EDTA	etilendiaminotetraocetna kislina
EF1	elongacijski faktor 1
ET	etilen
ETR	hitrost transporta po tilakoidi (electron transport rate)
FAM	6-karboksi-fluorescein
Fv/Fm	potencialna fotokemična učikovitost
Fv'/Fm'	dejanska fotokemična učikovitost
Glu I	β-glukanaze skupine I
Glu II	β-glukanaze skupine II
gs	prevodnost listnih rež
GSEA	obogatitvena analiza genskih skupin (gene set enrichment analysis)
HFPN	Hibridne petri mreže (hybrid functional petri nets)
ITAG	mednarodna skupina za gensko anotacijo paradižnika (International
	Tomato Annotation Group)
JA	jasmonska kislina
LB	Lauria-Bertani bogato gojišče
logFC	logaritem spremembe izražanja gena (<i>log fold change</i>)
mRNA	informacijska RNA (<i>messenger RNA</i>)
MS	Murashige in Skoog gojišče
NahG	salicilat-hidroksilaza

NCBI	Nacinalni center za biotehnološke informacije (<i>National Center for</i> <i>Biotechnology Information</i>)			
OmniMAX PCR pENTR PGSC	laboratorijski sev bakterije E. coli verižna reakcija s polimerazo plazmidni vector konzorcij določanja zaporedja genoma krompirja (<i>Potato Genome</i> <i>Sequencing Consortium</i>)			
pH PH7GWIWG2 Pn POCI	negativni logaritem koncentracije vodikovih ionov binarni plazmidni vektor neto fotosinteza pobuda za pripravo mikromreže krompirja (<i>Potato Oligo Chip</i> <i>Initiative mikromreža</i>)			
PR proteini PTNRD	Proteini povezani s patogenezo (pathogenesis-related protein) obročkasta nekroza gomoljev (<i>potato tuber necrotic ringspot disease</i>)			
PVX	krompirjev virus X (potato virus X)			
PVY	krompirjev virus Y (potato virus Y)			
PVYNTN	nekrotični različek krompirjevega virusa Y			
qPCR	PCR v realnem času			
RA	RuBisCO aktivaza			
RNA	ribonukleinska kislina			
RSN RT-PCR	robustna normalizaciia (robust spline normalization) obratna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo			
SA	salicilna kislina			
StAVR9	Avr9/Cf-9 rapidly elicited protein 284 v krompirju			
StPK11	serin /treoninska kinaza v krompirju			
StPP2C	proteiinska fosfataza 2C v krompirju			
StGI	genski indeks transkriptov krompirja Inštituta Dana Faber (Solanum			
	tuberosum Gene Index)			
StSAPK8	serin /treoninska kinaza v krompirju			
TAE	raztopina Trisa, acetata in EDTA			
TAMRA	6-karboksi-tetrametilrodamin			
TuMV	virus mozaika repe (turnip mosaic virus)			
Y2H	dvohibridni sistem kvasovke (yeast two hybrid system)			

А	adenin	R	G ali A	Н	A ali C ali T
С	citozin	Y	C ali T	В	G ali T ali C
G	gvanin	М	A ali C	V	G ali C ali A
Т	timin	Κ	G ali T	D	G ali A ali T
U	uracil	S	G ali C	Ν	A, C, G ali T
		W	A ali T		

Standardne kratice za nukleotide:

Standardne enočrkovne in tričrkovne kratice za aminokisline:

А	Ala	alanin
R	Arg	arginin
Ν	Asn	asparagin
D	Asp	asparaginska kislina
С	Cys	cistein
Е	Glu	glutaminska kislina
Q	Gln	glutamin
G	Gly	glicin
Н	His	histidin
Ι	Ile	izolevcin
L	Leu	levcin
Κ	Lys	lizin
М	Met	metionin
F	Phe	fenilalanin
Р	Pro	prolin
S	Ser	serin
Т	Thr	treonin
W	Trp	triptofan
Y	Tyr	tirozin
V	Val	valin

1 UVOD

Kljub intenzivni uporabi kemičnih sredstev povzročitelji bolezni rastlin v svetovnem merilu povzročajo velike izgube pridelka v kmetijstvu. Za zagotavljanje dolgotrajnih in okolju prijaznih načinov za zaščito rastlin je nujno razumevanje interakcije med rastlinami in njihovimi patogeni.

Na tem področju pa ostaja še veliko nejasnosti, saj je odziv rastlin na okužbo s patogeni zelo kompleksen proces. Rastline so razvile številne obrambne mehanizme, s katerimi prepoznajo povzročitelja bolezni in se pred njim branijo (Mysore in Ryu, 2004). Obramba je funkcionalno, prostorsko in časovno natančno regulirana. Funkcionalna kompleksnost se začne z zunanjimi signali, ki jih tvorijo povzročitelji bolezni ter se nadaljuje se s specifičnim zaznavanjem signalov ter njihovim prenosom, kar končno vodi v obsežno spreminjanje celičnega metabolizma, sprožitev kompleksnih metabolnih in signalnih poti z aktivacijo transkripcijskih faktorjev, ki reprogramirajo izražanje genov. Tako se celica celostno reprogramira in namesto rutinskih celičnih potreb prednjačijo obrambni mehanizmi, ki končno vodijo v produkcijo obrambnih molekul (Buckhout in Thimm, 2003). Specifičnost reprogramiranja je predvsem odvisna od aktivnosti ter medsebojnega delovanja ključnih rastlinskih hormonov salicilne kisline (SA), jasmonske kisline (JA) in etilena (ET) (Pieterse, 2009).

Spremembe so prostorsko specifične. Tako na mestu infekcije potekajo drugi procesi kot sistemsko v celi rastlini, signali so lahko omejeni zgolj na znotrajcelične organele, na celice ali pa na posamezna tkiva, ki obdajajo mesto okužbe. Prav tako je odgovor tudi močno časovno reguliran (Somissich in Hahlbrock, 1998). Za učinkovito obrambo pred patogeni mora biti aktivacija hitra (Moore, 2011). Večina raziskav analizira spremembe v različnih statičnih časovnih točkah po okužbi, vendar pa je za razumevanje rastlinskega odziva nujno potrebna dinamična analiza.

Pristopi sistemske biologije omogočajo celostno razumevanje procesov v kompleksnih bioloških sistemih s povezovanjem različnih nivojev informacij: transkriptomskih (izražanje vseh genov v neki celici oziroma tkivu), proteomskih (sestava proteinov in njihove aktivnosti), metabolomskih (sestava metabolitov), interaktomskih (povezava med proteini, njihove interakcije) z matematičnim modeliranjem (Fernie in Stitt, 2012; Yonekura-Sakakibara in sod., 2012). Sistemska biologije različne vrste podatkov integrira v model, ki opiše preučevani biološki sistem in na podlagi katerega lahko generiramo nove hipoteze. Biološko potrjene hipoteze razširijo znanja o proučevanem sistemu (Chuang in sod., 2010).

Na področju odgovora rastlin na povzročitelje bolezni je najbolj proučena rastlinska vrsta navadni repnjakovec (*Arabidopsis thaliana*). Je cvetoča majhna rastlina, ki se oprašuje sama in je primerna za gojenje v laboratorijih. Ima majhen genom (125 Mbp) s 25 500 geni na petih kromosomih in je prva rastlina, ki so ji določili celotno nukleotidno zaporedje (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Navadni repnjakovec se je zaradi svoje primernosti za genetske študije v devetdesetih letih prejšnjega stoletja, čeprav nima agronomskega pomena, uveljavil kot modelni organizem rastlinske biologije (Koornneef in Meinke, 2010).

Translacijska biologija prenaša biološka znanja iz modelne rastline na ekonomsko in kmetijsko pomembne rastline, s končnim ciljem izboljšanja kvalitete in količine pridelka (Alfred in sod., 2014). Krompir ima velik gospodarski pomen, saj spada, poleg riža, koruze in žita, med štiri najpomembnejše poljščine na svetu (Kus, 1994). V letu 2013 se je pridelalo kar 370 milijonov ton krompirja (FAOSTAT, 2013), svetovna produkcija gomoljev pa celo kontinuirno narašča s 4,5 odstotki na leto (Scholthof in sod., 2011).

Krompirjev virus Y (PVY) iz družine Potyviridae je ekonomsko najbolj pomemben virusni patogen krompirja in je razširjen po celem svetu. Okužuje mnoge različne poljščine, na lestvici desetih najpomembnejših rastlinskih virusov na svetu zaseda PVY peto mesto predvsem zaradi ekonomskega vpliva v proizvodnji krompirja, tobaka ter paprike in paradižnika (Scholthof in sod., 2011). Ocenjujejo da lahko v svetovni proizvodnji krompirja povzroči tudi do 90% izgube pridelka (Scholthof in sod., 2011).. Nekaj dni po okužbi se na listih občutljive sorte krompirja z najbolj agresivnim sevom PVY^{NTN} pojavijo primarni simptomi, ki se izrazijo kot kloroze in nekrotične lezije. Kasneje, ko se virus razširi po celi rastlini, se razvijejo tudi sistemski simptomi na neinokuliranih listih. Okužba z virusom PVY^{NTN} ne vpliva le na zmanjšanje pridelka, temveč zmanjša kvaliteto pridelka, saj povzroča tudi nekroze na gomoljih, zato taki gomolji niso primerni za prodajo. Virus PVY je razširjen v po celem svetu, v naravi pa ga prenaša vsaj 40 vrst listnih uši (Karasev in Gray, 2013).

1.1 CILJI IN HIPOTEZE DOKTORSKE NALOGE

Spremljali bomo kopičenje krompirjevega virusa PVY in spremembe na nivoju izražanja genov v listih krompirja. Pričakujemo, da so te spremembe odvisne od časa, ki je potekel od virusne okužbe ter so tudi lokalizacijsko specifične. Pričakujemo, da se listi, ki so bili direktno podvrženi virusni okužbi drugače odzivajo, kot tisti, pri katerih gre za sistemski odziv rastline na okužbo. Prav tako pričakujemo, da igra vlogo tudi oddaljenost listov od mesta okužbe ter njihov položaj.

Izgradili bomo model, ki opisuje interakcijo rastlina - virus. Pričakujemo, da lahko zgradimo in z nadgradnjo izboljšamo model do te mere, da odraža približek realnega stanja v rastlini po okužbi. Pričakujemo, da bo model dovolj realističen, da bi lahko z njim simulirali določene laboratorijske eksperimente.

S pomočjo obeh pristopov bomo določili ključne gene v odgovoru rastline na virusno okužbo. Pričakujemo, da imajo določene signalizacijske komponente in povezave večjo vlogo pri odgovoru rastline na patogen ter razvoj tolerance. Le-te želimo identificirati in analizirati.

2 PREGLED OBJAV

2.1 RASTLINE V OKOLJU SO IZPOSTAVLJENE RAZLIČNIM STRESNIM DEJAVNIKOM

Rastline so v naravnem okolju izpostavljene številnim povzročiteljem bolezni, kljub temu pa redko pride do razvoja bolezni, saj so razvile številne obrambne mehanizme, s katerimi prepoznajo povzročitelja bolezni in se pred njim branijo (Mysore in Ryu, 2004). Rastline nimajo specializiranih imunskih celic, kljub temu pa je obramba pred povzročitelji bolezni v rastlinah funkcionalno, prostorsko in časovno natančno regulirana (Andolfo in Ercolano, 2015). Funkcionalna kompleksnost se začne z zunanjimi signali, ki jih tvorijo povzročitelji bolezni, nadaljuje se z zaznavanjem signalov in njihovim prenosom, kar končno vodi v obsežno spreminjanje celičnega metabolizma, vključno z številčnimi spremembami na nivoju izražanja genov (Moore in sod., 2011; Yang in sod., 2007; Zheng in sod., 2007).

Raziskave odgovora rastline na abiotski in biotski stres kažejo na sprožitev kompleksnih metabolnih in signalnih poti (Bolouri Moghaddam in Van den Ende, 2012; Bolton, 2009; Pitzschke in sod., 2009). Poleg tega je imunski odgovor pri rastlini odvisen od aktivacije transkripcijskih faktorjev, ki reprogramirajo izražanje genov, tako da namesto rutinskih celičnih potreb prednjačijo obrambni mehanizmi, poleg regulacije na nivoju izražanja genov pa se regulira tudi delovanje in aktivnost obstoječih encimov. Aktivnost regulatorjev transkripcije je predvsem odvisna od aktivnosti ter medsebojnega delovanja ključnih rastlinskih hormonov SA, JA in ET (Halim in sod., 2006; Pieterse in sod., 2012; Vos in sod., 2015). Za učinkovito obrambo pred patogeni mora biti aktivacija hitra in vključevati reprogramiranje aktivnosti in izražanja velikega števila genov (Moore in sod., 2011).

2.2 MEHANIZMI RASTLINSKE OBRAMBE OB OKUŽBI S PATOGENOM

Rastlinske celice zaznajo vdor patogena ali poškodbo tkiva s pomočjo receptorjev PRR (ang. PRR pattern recognition receptor), ki se nahajajo v vsaki rastlinski celici in se aktivirajo s prepoznavo sprožilcev odgovora (elicitorjev) (Andolfo in Ercolano, 2015). Receptorji prepoznajo s patogenom povezane molekulske vzorce (PAMP, ang. pathogen-associated molecular patterns) oziroma gostiteljeve molekule poškodbe (DAMP, ang. damage-associated molecules) (Albert, 2013) in sprožijo imunski odziv imenovan PTI (ang. PAMP- trigered imunity) (Schwessinger in Ronald, 2012). Do sedaj so identificirali že kar nekaj PAMP-ov, med njimi bakterijski flageline, polisaharide in elongacijski faktor Tu, glivni hitin ter oomicetne kaloza-vezavne proteine (Albert, 2013; Schwessinger in

Ronald, 2012). Receptorji aktivirajo signalne kaskade z mitogenom aktiviranih proteinskih kinaz (MAPK), povzročijo depolarizacijo celične membrane ter aktivacijo od kalcija odvisnih proteinskih kinaz (CDPK) in posledično sintezo fitohormonov. Le-ti aktivirajo specifične transkripcijske faktorje in omogočijo izražanje obrambnih genov, katerih produkti imajo neposreden učinek na škodljivce (Popescu in sod., 2009). Nekateri patogeni pa se kljub vsemu izognejo prvemu nivoju obrambe (PTI) in v apoplast oziroma citosol gostiteljske celice spustijo majhne efektorske proteine, kar vodi v t.im. ETS (ang. effector trigered suceptibility). Rastline so se naučile prepoznati take efektorske molekule napadalcev (Love in sod., 2012) preko drugega nivoja obrambnega mehanizma imenovanega ETI (ang. effector trigered immunity) (Jones in Dangl, 2006). To strategijo imunskega odziva rastlin zaradi podobnosti s imunskim sistemom sesalcev imenujemo prirojena imunost in jo opisujemo s tako imenovanim zig-zag modelom (Slika 1). Le-ta je učinkovit proti širokemu naboru patogenov (glivam, bakterijam in virusom) in škodljivcev.

Rastlinske celice pa so razvile tudi drugi način obrambe in sicer preko RNA utišanja (RNA silencing), ki predstavlja najpomembnejši protivirusni mehanizem obrambe (Nakahara in Masuta, 2014). To obrambo stimulirajo dvojno-verižne RNA molekule, ki igrajo analogno vlogo PAMP/DAMP molekulam v zig-zag modelu obrambe (Zvereva in Pooggin, 2012). Gostiteljska celica jih prepozna in s pomočjo ribonukleaz DCL (ribonuclease type II DICER-like) procesira v male 21-24 nt dolge sRNA, ki se vežejo v kompleks RISC (ang. RNA induced citoplasmic complex). RISK z vstavljeno malo vsRNA (ang. virus derived sRNA) targetira virusne nukleinsko kislino in jo onesposobi preko razgradnje (Nicaise, 2014). Hkrati male RNA tvorijo tudi mobilni signal za utišanje, ki se širi preko plazmodezem v sosednje celice in preko floema v bolj oddaljena tkiva (Pumplin in Voinnet, 2013). V odgovor temu mehanizmu virusi namesto razvoja efektorjev izražajo supresorje RNA utišanja (ang. RNA silencing suppressors, RSS), ki ovirajo biološko pot mehanizma utišanja. RSS nato prepoznavajo receptorjem podobni proteini, kot v klasičnem zig-zag modelu (Zvereva in Pooggin, 2012).



Slika 1: Zig-zag model za evolucijo rastlinskega imunskega odziva in rastlinske obrambe na podlagi utišanja proti virusnim in ne-virusnim patogenenom (Zvereva in Pooggin, 2012: 2582).

Figure 1: Zig-zag model for evolution of innate immunity and silencing-based plant defense against viral and non-viral pathogens (Zvereva in Pooggin, 2012: 2582).

2.2.1 Signalne obrambne poti rastlinskega imunskega odziva

Po napadu patogena, se v najzgodnejšem odzivu na mestu vdora napadalca sproži kaskada sprememb (Andolfo in Ercolano, 2015), ki vključuje spremembe v toku ionov, nastajanje reaktivnih kisikovih spojin (ROS) (Love in sod., 2005), spremembo organizacije citoskeleta, fosforilacijo in defosforilacijo proteinov med drugimi tudi transkripcijskih faktorjev, sintezo dušikovega oksida in v nekaterih primerih tudi indukcijo programirane celične smrti (Alazem in Lin, 2015; Bilgin in sod., 2010; Mur in sod., 2013). Vse navedene zgodnje spremembe so neodvisne od prepisovanja in temeljijo na aktivaciji encimov in drugih kemijskih reakcijah. S temi spremembami poskuša rastlina upočasniti širjenje patogena (Kogovsek in Ravnikar, 2013; Mandadi in Scholthof, 2013). Prav tako so raziskave pokazale, da se po okužbi v rastlini spremeni izražanje velikega števila genov (Baebler in sod., 2009; Bilgin in sod., 2010).

Signalne obrambne poti so medsebojno regulirane preko biosinteze fitohormonov (Alazem in Lin, 2015; Alazem in sod., 2014; Andolfo in Ercolano, 2015), aktivacije in deaktivacije signalnih proteinov (pogosto preko proteasomske razgradnje) ter na nivoju regulacije transkripcije (Coppola in sod., 2013; Pacheco in sod., 2012; Pandey in Somssich, 2009).



Slika 2: Poenostavljen model molekularne signalizacije vključene v transkripcijsko regulacijo signalizacijske poti SA (A), JA (B), ter antagonizem med SA in JA signalizacijskima potema (C) (Caarls in sod., 2015: 3).

Salicilna kislina aktivira protein NPR1 preko redukcije in monomerizacije proteina, ki aktivira izražanje genov v jedru. Geni inducirani z JA so regulirani preko JAZ represorjev. Ob povišani koncentraciji JA se aktivirajo MYC in ERF transkripcijski faktorji in omogočajo izražanje JA-odzivnih genov, vendar samo ob odsotnosti SA. Aktivacija obeh JA in SA poti privede do antagonističnega efekta na JA-odzivne gene.

Figure 2: Simplified model of the molecular machinery involved in the transcriptional regulation of the SA signaling pathway (A), the JA signaling pathway (B), or the antagonism of SA on the JA signaling pathway (C) (Caarls in sod., 2015: 3).

By inducing reduction and monomerization of NPR1, SA activates NPR1, which then triggers gene expression in the nucleus. JA-responsive genes are kept in check by JAZ repressors in the absence of JA. In the presence of JA, MYC or ERF transcription factors activate JA-responsive genes, but only if SA is absent. Activation of both the SA and JA signaling.

Glavni fitohormoni udeleženi v obrambnem odgovoru rastlin so SA, JA in ET (Alazem in Lin, 2015; Kazan in Manners, 2013). Biokemijske in fiziološke spremembe, so pogojene z vrsto gostitelja ter tudi vrsto povzročitelja, saj različni povzročitelji vplivajo na različne signalne poti (Vos in sod., 2015). Biotrofični patogeni minimalno poškodujejo rastlinsko tkivo in so načeloma bolj občutljivi na obrambo regulirano s SA (Pallas in García, 2011). Rastlinojede žuželke in nekrotrofni patogeni, ki se hranijo z odmrlim tkivom, pa so bolj občutljivi na obrambo regulirano z JA in ET (Wang in Li, 2002; Windram in Denby, 2015). V večini interakcij med rastlino in škodljivcem se je izkazalo, da sta obrambna odziva JA in SA medsebojno nasprotujoča (Slika 2) (Collum in Culver, 2016; A. Koornneef in Pieterse, 2008), vendar pa nekatere študije poročajo tudi o

sinergističnem učinku JA in SA (Shamsul in Alyemeni, 2013; Shang in sod., 2011). Vse več raziskav kaže, da je signalizacijska mreža zelo kompleksna in da obstajajo med komponentami signalizacijskih poti fitohormonov pozitivne in negativne interakcije ter povratne zanke (Andolfo in Ercolano, 2015; Collum in Culver, 2016). Hkratno tretiranje rastlin z JA in SA sproži v nizkih koncentracijah sinergistično izražanje markerskih genov obrambe JA in SA. Tako aplikacija SA in JA sinergistično poveča izražanje gena PR1, do večjih koncentracije hormonov pa imajo nasprotujoč, antagonističen učinek in sprožijo tudi produkcijo ROS (Mur in sod., 2006). Pomembno vlogo v interakcijah med signalizacijo SA in JA imata tudi čas med posameznimi odzivi in redoks potencial v celici (Koornneef in Pieterse, 2008).

Kot modelna rastlina je tudi na področju odgovora rastlin na virusno okužbo najbolj proučena rastlinska vrsta navadni repnjakovec (*Arabidopsis thaliana*). Do danes je že kar nekaj signalnih poti odgovora navadnega repnjakovca na patogene dobro opisanih, številne povezave med signalnimi potmi pa še vedno niso potrjene (Kazan in Manners, 2013).

2.3 RASTLINSKI VIRUSI

Rastlinski virusi so obligatni intracelularni paraziti, ki so za napad rastline in lastno razmnoževanje popolnoma odvisni od gostiteljeve celice (Pallas in García, 2011). Rastline se pred virusi zavarujejo z naravnimi barierami, kot sta kutikula in celična stena, zato virusi za vstop v rastlinsko celico izkoriščajo poškodbe rastlinskega tkiva ali pa se prenašajo z vektorji, kot so insekti, nematode in glive (Chandra-Shekara in sod., 2004; Clemente-Moreno in sod., 2013; Fridborg in sod., 2003; Kogovšek in sod., 2010; Mandadi in Scholthof, 2013). Virusi povzročajo epidemije bolezni pri vseh agronomsko pomembnejših rastlinskih kulturah, kar pomeni veliko svetovno gospodarsko škodo, ocenjeno na 30 milijard dolarjev letno (Sasaya in sod., 2014). Kurativni pristopi zdravljenja rastlin s kemikalijami so zaradi narave virusov nemogoče. Edini efektivni pristopi vključujejo preventivno kontrolo rastlinskega materiala, odstranjevanje obolelih rastlin ter obsežen vnos pesticidov za omejevanje populacije vektorjev, s katerimi se rastlinski virusi širijo (Karasev in Gray, 2013). Eden izmed najpomembnejših ekološko bolj sprejemljivih pristopov pa sloni na uporabi sort z genetsko rezistenco proti dotičnim virusom. Razumevanje molekularnih mehanizmov odgovora rastline na virusno okužbo je torej ključno pri boju proti virusnim okužbam agronomsko pomembnih rastlinskih kultur (Nicaise, 2014).

Tako kot pri drugih patogenih je tudi na nivoju virusne okužbe s fitohormoni-vzpodbujen odgovor rastline ključen za obrambo (Collum in Culver, 2016; Zvereva in Pooggin, 2012).

2.3.1 Krompirjev virus Y

Krompirjev virus Y (PVY) je RNA virus predstavnik rodu *Potyvirus* družine Potyviridae, katerega virusni delec je sestavljen iz približno 10 kbp dolge enoverižne pozitivno usmerjene RNA molekule, obdane s cca. 2000 molekulami proteina plašča (Karasev in Gray, 2013). Virusna RNA kodira 340-360 kDa velik poli-protein, ki se po translaciji avtoproteolitsko razreže na 10 manjših proteinov s pomočjo treh virusnih proteinaz: protein P1 (P1), proteinaza s pomožno komponento (ang. helper component proteinase, HC-Pro), protein P3 (P3), 6-kDa protein 1 (6K1), cilindrično vključitveno telo (ang. cylindrical inclusion body, CI), 6-kDa protein 2 (6K2), protein povezan z virusnim genomom (ang. viral genome-linked protein, VPg), jedrni vključitveni protein a (ang. nuclear inclusion protein a, NIa), jedrni vključitveni protein b (ang. nuclear inclusion protein komponent (ang. coat protein, CP). Dodatni protein je izražen produciran z zamikom bralnega okvirja P3 cistrona in fuzije na N-konec P3. Novonastali protein so poimenovali P3N-PIPO (Slika 3) (Quenouille in sod., 2013).

Proteini sodelujejo pri cepitvi vezi v poliproteinu (P1, HC-Pro, NIa), razmnoževanju virusa (P3, NIa), premikanju virusa (CI, NIa) in vezavi na rastlinsko RNA (NIb). Plaščni protein (CP) tvori plašč virusne RNA. Pri okužbi se plaščni protein veže na rastlinsko celico, in tako določa specifičnost gostiteljev. Vključen je tudi v premikanje virusa po rastlini, bodisi preko uravnavanja velikosti plazmodezm ali kot gibalni protein, v prenos z listnimi ušmi in regulacijo pomnoževanja virusa. HC-Pro zavira delovanje obrambnega sistema rastline, usmerjenega proti virusni RNA ali pomnoževanju virusa in sodeluje pri prenosu iz rastline v rastlino z listnimi ušmi ter zmanjša količino kloroplastne ATP sintaze v okuženi rastlini (Kogovsek in Ravnikar, 2013; Quenouille in sod., 2013; Tu in sod., 2015).



Slika 3: Determinante patogeneze mapirane na genom PVY in rekombinacijski vzorec izolatov PVY^{NTN} in PVY^N-W (Quenouille in sod., 2013:3).

a) Faktorji PVY in različne mutacije pomembne za interakcijo z rezistenčnimi geni so prikazane pod genomom. Dominantni geni so označeni z veliko začetnico, gostitelj v oklepajih, recesivni pa z malo začetnico. Nad genomom so označene determinante virulence PVY oziroma deli odgovorni za prenos virusa z rastlinskimi ušmi. b) Shematična predstavitev različnih vzorcev rekombinacije med različkoma PVY^O (svetlo siva) in PVY^N (temno siva), ki vodijo v najbolj virulentne različke virusa.

Figure 3: Determinants of pathogenicity mapped in the Potato virus Y (PVY) genome and recombination pattern of PVY^{NTN} and PVY^N-W isolates (Quenouille in sod., 2013:3).

a) PVY factors and/or mutations involved in resistance breakdown are indicated below the genome scheme. The dominant genes are specified with a capital letter and the host is indicated in parentheses. Above the genome scheme, PVY determinants of virulence or aphid transmission are noted. b) Schematic representation of the different recombination patterns between PVY^O (light grey) and PVY^N (dark grey) clades, that lead to the most

Virus PVY ima širok krog gostiteljskih rastlin, večinoma iz družine razhudnikovk (Solanaceae), med katerimi sta ekonomsko najpomembnejši vrsti krompir in tobak (*Nicotiana tabaccum*). Virus PVY je razširjen po celem svetu, v naravi ga prenaša vsaj 40 vrst listnih uši (primarna okužba), poleg tega se preko gomoljev prenaša še z materinske na hčerinsko rastlino (sekundarna okužba) in mehansko z rastlinskim sokom (Karasev in Gray, 2013). Virus PVY okužuje mnoge različne poljščine, na lestvici desetih najpomembnejših rastlinskih virusov na svetu zaseda virus PVY peto mesto predvsem zaradi ekonomskega vpliva v proizvodnji krompirja, tobaka ter paprike in paradižnika

(Scholthof in sod., 2011). Ocenjujejo da lahko v svetovni proizvodnji krompirja povzroči tudi do 90% izgube pridelka (Scholthof in sod., 2011).

Virus PVY na krompirju povzroča številna bolezenska znamenja, katerih videz in jakost sta močno odvisna od kultivarja krompirja, različka virusa, ki ga okužuje, tipa okužbe, ali je ta bodisi primarna (z žuželčjim vektorjem v rastni sezoni) ali sekundarna (preko okuženih semenskih gomoljev), pojavnost znamenj pa je odvisna tudi od klimatskih pogojev. Tipični simptomi so prikazani na Sliki 4. Najpogostejša bolezenska znamenja so: mozaik, pegavost, nagubanost in nepravilna rast listov, lokalne in sistemske nekroze na listih, ki jih pogosto spremlja rumenenje in odpadanje listov. Rast rastlin je lahko zmanjšana in zakrnela. Nekateri različki povzročajo tudi nekroze na površini gomoljev, ki so značilno obročkaste oblike, v začetni fazi izbočene, nato pa močno vbočene. Bolezen imenujemo obročkasta nekroza gomoljev krompirja (ang. Potato Tuber Necrotic Ringspot Disease ali PTNRD), zaradi katere so gomolji neuporabni za prodajo (Karasev in Gray, 2013). Pojav PTNRD je podobno kot bolezenska znamenja na listih močno odvisen od kultivarja in od pogojev rasti (R. P. Singh in sod., 2008), pogosto pa se pojavi šele med skladiščenjem gomoljev. Molekularne metode detekcije virusa igrajo zato pomembno vlogo pri preventivnih ukrepih za odstranjevanje ne simptomatskih okuženih gomoljev. Virus PVY močno vpliva na proizvodnjo krompirja, saj zmanjša obseg pridelka za 40-70% (Nolte in sod., 2004) vrednost preostalega pridelka pa je lahko še dodatno zmanjšana zaradi bolezenskih znamenj (Karasev in Gray, 2013).

Glede na analize genomov delimo virus PVY na 5 glavnih skupin: C1, C2, O, N in Chile (Quenouille in sod., 2013) med katerimi so najbolj razširjene skupine C1, N in O. Izolati C se od izolatov O ločijo po hipersenzitivni reakciji, ki jo vzpodbudijo v sortah krompirja, ki nosijo zapis za rezistenčni gen Nc. Izolati O povzročajo mozaike na listih krompirja ter posledično veliko agronomsko škodo v sortah, ki ne nosijo zapis za glavne rezistenčne gene. Izolati virus PVY C povzročajo na krompirju sicer bolj mile simptome, vendar pa povzročajo močne nekroze ter zmanjšanje pridelka nekaterih drugih poljščin kot je paprika. PVY N izolati povzročajo močne nekroze na rastlinah tobaka, na rastlinah krompirja pa v primerjavi z izolati O na krompirju povzročajo bolj mile simptome. Sredi 70-ih so detektirali nove, rekombinantne izolate med različkoma N in O (PVY^{NTN} ter PVY^N –W) (Slika 3 b). Prevalenca obeh se je močno povečala v Evropi in severni Ameriki, od 90ih let naprej. Rekombinantni izolati imajo namreč veliko prednost pred izolati O, saj lahko okužujejo tudi rastline krompirja z rezistentnim Ny genom. Čeprav še ni znano zakaj, pa so tudi bolj infektivni kot izolati N (Quenouille in sod., 2013). Virus PVY^{NTN} je najbolj agresiven različek krompirjevega virusa, ki na občutljivih sortah krompirja povzroča simptome a listih ter bolezen imenovano obročkasta nekroza gomoljev (PTNRD) (Karasev in Gray, 2013).



Slika 4: Simptomi, ki jih povzroča virus PVY (Quenouille in sod., 2013:2) a) žilna nekroza krompirjevih listov b) nekrotični obročki na gomoljih krompirja c) mozaik na papriki d) elektronska mikrografija virusih delcev. Merilo označuje 200 nm.

Figure 4: Symptoms induced by PVY (Quenouille in sod., 2013: 2)

a) vein necrosis in potato leaf b) necrotic rings on potato tubers c) Leaf mosaic on pepper d) electron micrograph of PVY virions. The scale bar corresponds to 200 nm.

2.4 KROMPIR (Solanum tuberosum L.)

Krompir je prehransko tretja najpomembnejša poljščina, takoj za rižem in pšenico ter najpomembnejša gomoljnica (Centro Internacional de la Papa, 2010). Bruto vrednost proizvodnje krompirja je bila samo v državah Evropske unije leta 2011 višja od 15,5 milijard ameriških dolarjev svetovna pridelava je leta 2013 znašala 370 milijonov ton, v Sloveniji pa smo isto leto pridelali 62 tisoč ton, kar je več kot polovica manj kot leta 2001 (15 tisoč ton) (Food and Agriculture Organisation, 2014). Krompir odlikuje široko podnebno območje pridelave. Uspeva namreč od najjužnejših področij Južne Amerike do Grenlandije, od regij tik nad morsko gladino pa vse do 4700 m nadmorske višine v izvornem področju gorovja Andov (Centro Internacional de la Papa, 2010). Poleg

paradižnika, paprike, jajčevca, petunije in tobaka spada v splošno ekonomsko pomembno družino razhudnikovk (Solanaceae).

Pridelava krompirja potrebuje do kar sedemkrat manj vode v primerjavi z žiti, krompir pa ima tudi bogato hranilno vrednost. Kuhan krompir je odličen vir ogljikovih hidratov z nizko vsebnostjo maščob ter relativno visoko vsebnostjo proteinov (2,1 odstotek sveže mase, kar je več kot koruza), vitamina C, kalcija, železa in drugih esencialnih mikroelementov ter vlaknin. Pridelava krompirja postaja globalno vse pomembnejša, saj je krompir temeljni element prehranske varnosti v razvijajočih se državah Južne Amerike, Afrike in Azije (Centro Internacional de la Papa, 2010).

Pridelavo krompirja ogroža širok spekter bolezni in škodljivcev, od koloradskega hrošča (*Leptinotarsa decemlineata*), ogorčic (*Globodera pallida* in *G. rostochiensis*), gliv (*Phytophthora infestans*), bakterijskih gnilob (*Ralstonia solanacearum, Clavibacter michiganensis*) in virusnih okužb (Centro Internacional de la Papa, 2010). V tej doktorski nalogi smo preučevali kompleksno problematiko enega izmed najpomembnejših virusnih patogenov krompirja, krompirjevega virusa Y (PVY).

Tekom doktorskega dela (2011) je bil objavljen visoko kvaliteten osnutek krompirjevega genoma (The Potato Genome Sequencing Consortium, 2011), ki je močno vplival na naše raziskave. Genom je bil sestavljen na osnovi rezultatov sekvenciranja naslednje generacije NGS) homozigotne sorte krompirja iz genotipa *S. tuberosum* Phureja, t.i. dvojni monoploid (doubled monoploid, DM). Na podlagi sekvenciranih zaporedij sta bila napovedana dva genomska modela PGSC (The Potato Genome Sequencing Consortium, 2011) ter ITAG (The Tomato Genome Consortium, 2012). PGSC genski model šteje 39,031 napovedanih genov, ITAG genski model pa 35,004 genov.

2.5 ODZIV KROMPIRJA NA OKUŽBO S KROMPIRJEVIM VIRUSOM Y

Poznanih je več različno virulentnih tipov virusa kot tudi več različno občutljivih sort krompirja. Tak sistem je idealen za študijo molekularnih mehanizmov koevolucije rastline in patogena. V doktorskem je poudarek na tipu virusa PVY^{NTN}, ki povzroča obročkaste nekroze gomoljev in bistveno vpliva tako na donose kot na kvaliteto pridelka (Kogovsek in Ravnikar, 2013; Pompe-Novak in sod., 2005).

Gostiteljske rastline lahko z virusom PVY vzpostavijo kompatibilne ali nekompatibilne interakcije. V rastlini, kjer se virus ne more pomnoževati na mestu infekcije niti širiti po rastlini v neokužene liste pravimo, da je rastlina z virusom v nekompatibilni interakciji, torej neobčutljiva oziroma odporna. Če se v gostitelju virus lahko pomnožuje in širi, pa

temu pravimo kompatibilna interakcija (R. P. Singh in sod., 2008), rastlina je za okužbo z virusom dovzetna. Rastline, dovzetne za okužbo, so lahko tolerantne in ne razvijejo bolezenskih simptomov (npr. 'Pentland Squire', 'Désirée'), ali pa so občutljive in simptome razvijejo (npr. 'Igor'). V tolerantnih rastlinah se lahko virus neovirano razmnožuje, vendar v rastlini bolezni ne bo povzročil.

Pri krompirju poznamo dva tipa odpornosti na virus PVY, ekstremno rezistenco (ER) in preobčutljivostni odgovor (HR). V obeh primerih se razvijejo nekrotične lezije, ki omejijo širjenje virusa, v nasprotju z nekrozami, ki se razvijejo pri kompatibilni interakciji in ki ne omejijo virusnega širjenja (Hinrichs-Berger in sod., 1999). Posledica ekstremne rezistence je omejitev pomnoževanja virusa v zgolj prvotno okuženih celicah, omejitev širjenja na zgolj nekaj sosednjih celic ter malo ali nobenih bolezenskih simptomov. Za ekstremno rezistenco na virus PVY je odgovoren gen Ry, ki se pojavlja v treh različnih vrstah rodu *Solanum: S. tuberosum andigena* (Ry_{adg}), *S. stoloniferum* (Ry_{sto}) in *S. chacoense* (Ry_{chc}). Vsi rezistentni geni so zelo pomembni za vzgojo novih odpornih sort (Kogovsek in Ravnikar, 2013).

Za preobčutljivostni odziv na virus PVY je odgovoren gen Ny-1, ki sproži HR po okužbi z virusnimi različki PVY^O, PVY^N, PVY^N-Wi in PVY^{NTN}. S preobčutljivostnim odgovorom na PVY se odzove krompir sorte 'Rywal', kjer je omejeno pomnoževanje in širjenje virusa. Odziv je odvisen tudi od temperature, saj rast rastlin pri višjih temperaturah (28 °C) prepreči HR in omogoči virusu sistemsko širjenje (Baebler in sod., 2014).

2.5.1 Razvoj simptomov

Virus v rastlino vstopi preko listnih uši, ki se hranijo s sokom rastlin oziroma preko mehanske poškodbe. V občutljivih sortah se po rastlini širi v ostale dele rastline, v neinokulirane liste ter gomolje in povzroči sistemsko okužbo. Rastline, ki zrastejo iz okuženih gomoljev imenujemo sekundarno okužene rastline. Simptomi, ki se razvijejo na listih, kjer je virus vstopil v rastlino imenujemo lokalni simptomi, medtem ko simptome izražene na neinokuliranih listih imenujemo sistemski. Na lokalnih listih se pojavijo klorotični obročki, točkovne in žilne nekroz ter rumenenje in odpadanje listov. Količina in vrsta simptomov je odvisna od sorte krompirja in virusnega različka ter okoljskih faktorjev (kot so intenziteta svetlobe, temperatura, vlažnost..) ter direktno korelira z občutljivostjo kultivarja. Močno občutljiva sorta 'Igor' razvije močne klorotične obročke na inokuliranih listih 5. dpi okužbi z virusom PVY^{NTN}, ki se naslednjih dneh razvijejo v nekrotične lezije v in še kasneje vodijo v odpadanje listov ter k t.im palminem efektu. Približno 10 dan po okužbi, rastlinam ostanejo samo še zgornji listi, ki razvijejo mozaike

in listno kodravost (Kogovsek in Ravnikar, 2013; Mehle in sod., 2004). Sorta 'Rywal', se na okužbo odzove s HR, ki se odraža v obliki nekrotičnih lezij na inokuliranih listih 3. dpi. HR omeji virusno razmnoževanje in širjenje po rastlini, neinokulirani listi pa ostanejo nesimptomatski (Baebler in sod., 2014). Na tolerantni sorti 'Pentland Squire' in ekstremno rezistentni 'Santé' pa virus PVY^{NTN} ne povzroči simptomov (Mehle in sod., 2004).

2.5.2 Mikroskopske spremembe

Svetlobna mikroskopija je razkrila močno autofluorescenco listov občutljive sorte 'Quarta' v območju nekrotičnih lezij. Barvanje z anilin modrim je razkrilo fluorescirajoče območje v celicah, ki obkrožajo nekrotične celice, kar nakazuje na akumulacijo lignina in ostalih polifenolov ter kalozne depozite (Hinrichs-Berger in sod., 1999). Pri krompirjevi sorti 'Rywal', so opazili nalaganje kaloze že 3. dan po okužbi, v večji meri pa 6. dan po okužbi (Baebler in sod., 2014).

Virus PVY^{NTN} okužba močno vpliva na ultrastrukturo kloroplastov v okuženih listih občutljive sorte 'Igor' (Pompe-Novak in sod., 2001). Kloroplasti nesimptomatskega dela okuženih listov so manjši v primerjavi s kloroplasti zdravih rastlin, njihova velikost pa se še manjša z bližino nekrotičnega tkiva. V središču nekroze se tilakoidne strukture razpustijo in kloroplasti kondenzirajo, citoplazma se zgosti, vakuole pa ni več prisotne, celica se skrči, celična stena oviha, medcelični prostor pa je povečan. Elektronska mikroskopija ultrastruktur okuženega tkiva je razkrila celično uničenje, odebeljeno celično steno, uničenje peroksisomov in kloroplastov znotraj nekrotične lezije. Predvidevajo, da so spremembe v ultra strukturi lahko del apoptotičnega procesa, ki vodi v celično smrt in razvoj simptomov (Kogovsek in Ravnikar, 2013).

2.5.3 Primarni metabolizem sladkorjev in fotosinteza

Nastanek bolezenskih znamenj po virusni okužbi in njihov razvoj so v več primerih povezali s spremembami v količini topnih sladkorjev ali netopnih ogljikovih hidratov. Pri rastlinah okuženih z virusom je največkrat na mestu nastanka bolezenskih znamenj opaziti kopičenje topnih sladkorjev, kot so ksiloza, saharoza (Shalitin, 2000), glukoza in fruktoza ter netopni škrob (Arias in sod., 2003; Handford in Carr, 2007). Vloga sprememb v količini sladkorjev in ogljikovih hidratov je nejasna, poznan pa je vpliv povečanja količine sladkorjev in škroba na pigmentacijo in delovanje hormonov, kar posledično vpliva na nastanek mozaika in zmanjšanje rasti. Zaradi zmanjšanja fotosinteze in nastajanja sladkorjev v okuženih celicah se z namenom zmanjšanja izgube v sosednjih celicah poveča proizvodnja zelenih pigmentov. To vidimo kot nastanek bolj in manj

zeleno obarvanih predelov lista, ki jih prepoznamo kot mozaik ali kloroze (Carr in sod., 2010).

Sestava topnih sladkorjev v rastlini se po okužbi spremeni. V zdravih rastlinah se saharoza, ki nastane kot produkt fotosinteze transportira preko celične stene v floem, po katerem potuje v druge dele rastline. Pod vplivom virusne okužbe pa se saharoza v celični steni s pomočjo invertaze pretvori v heksozo, ki se kopiči v celicah mezofila, kar vpliva na znižanje nivoju fotosinteze in sprožitev obrambnega odgovora rastline (Bolouri Moghaddam in Van den Ende, 2012; Herbers in sod., 2000).

Vpliv virusov na fotosintezo, vsebnost klorofila in izražanje genov povezanih s fotosintezo je eden izmed bolj proučenih vidikov interakcije rastlina-virus (Clemente-Moreno in sod., 2013; Herbers in sod., 2000; Milavec in sod., 2001; Pompe-Novak in sod., 2005; Sajnani in sod., 2007). Meritve fluorescence klorofila v različnih rastlinah po okužbi z virusi kažejo na zmanjšanje delovanja fotosistema. Jakost vpliva okužbe na fotosintezo je odvisna od razvoja in pogojev rasti rastline pa tudi od starosti lista, kjer je prišlo do okužbe in različka virusa, s katerim je rastlina okužena (Sajnani in sod., 2007).

Okužba z virusom PVY^{NTN} je pri sortah 'Désirée' in 'Pentland Squire', gojenih v tkivni kulturi, znižala vsebnost fotosintetskih pigmentov, medtem ko pri sorti 'Igor' ni bilo razlik v vsebnosti klorofilov in karotenoidov med okuženimi in neokuženimi rastlinami. V rastlinah, gojenih v pesku, se je celokupna količina fotosintetskih pigmentov pri sorti 'Igor' znižala, kar sovpada s pojavom bolezenskih znakov in namnožitvijo virusa v rastlini (Mehle in sod., 2004).

Okužba rastlin tobaka z virusom PVY zmanjša aktivnost fotosinteze za kar naj bi bila odgovorna direktna interakcija kloroplastnih komponent (kloroplastne ATP sintaze) z virusnimi proteini (HC-Pro) (Tu in sod., 2015). V nasprotju s pričakovanim generalnim znižanjem fotosintetske aktivnosti pa je v hitrem odgovoru rastline 30 min po okužbi z virusom PVY^{NTN} zaznati povišano fotosintetsko aktivnost. Povečano izražanje fotosintetskih genov so zaznali tako pri občutljivi sorti 'Igor' kot tudi pi rezistentni sorti 'Santé' (Baebler in sod., 2009). Indukcija genov je lahko rastlinski odziv na povišane energetske potrebe za boj proti patogenu. V naslednji fazi so bili fotosintezni geni manj izraženi pri obeh sortah krompirja (Baebler in sod., 2009). V rastlinah sorte 'Rywal' so 1. dan po okužbi z virusom PVY zaznali tako zvišano kot znižano izražanje genov povezanih s fotosintezo, 3. dpi se je izražanje fotosinteznih genov po večini znižalo, medtem, ko je bilo 6. dpi le malo genov povezanih s fotosintezo odzivnih. Po drugi strani pa so v rastlinah NahG-Rywal, ki so onesposobljene v signalizacijski poti SA, so zaznali

veliko zmanjšanje v izražanju genov povezanih s fotosintezo v 6. dpi (Baebler in sod., 2014).

2.5.4 Signalizacijske poti rastlinskih hormonov

Študije rastlinskih hormonov v interakciji krompir-PVY so pokazale različne spremembe v koncentraciji SA. Krompir se od tobaka in navadnega repnjakovca razlikuje po tem, da ima do 100-krat višji bazalni nivo SA v vseh tkivih, kar pogojuje tudi visok bazalni nivo izražanja gena PR1 pri krompirju (Baebler in sod., 2014; Coquoz in sod., 1998). Pomen tega za imunski odziv krompirja pa trenutno še ni razumljen.

Predvidevajo, da je SA vpletena v vsaj tri nivoje odgovora rastline na virusno okužbo. Sodeluje pri omejevanju virusnega razmnoževanje, pri širjenju virusa po rastlini skozi plazmodezme v sosednje celice in v procesu sistemskega širjenja virusa po rastlin, vendar lahko mehanizmi variirajo odvisno od gostitelja ter tipa virusa (D. P. Singh in sod., 2004). SA je tudi ključni hormon, ki sodeluje pri rezistenci povzročeni z R geni. Marsikatere raziskave so pokazale, da zmanjšanje v endogeni koncentraciji SA oziroma motnja v signalizacijski poti SA poškoduje obrambni odgovor rastline in povzroči občutljivost na virusno okužbo (Collum in Culver, 2016).

Pri rezistentni sorti 'Santé' so zaznali nižji bazalni nivo SA, kot v občutljivi sorti 'Igor', kar pomeni, da bazalni nivo SA ne korelira z občutljivostjo rastline. Še več pri občutljivi sorti 'Igor' se 24 h po okužbi z virusom PVY^{NTN} v inokuliranih in sistemskih listih koncentracija SA poviša, vendar to povečanje ni dovolj za omejitev virusnega širjenja (Krecic-Stres in sod., 2005), kar je lahko posledica nezmožnosti prenosa signala ali pomanjkanja katere druge komponente obrambne poti rastline. V zgodnjem odzivu krompirja tolerantne sorte 'Désirée' in rezistente 'Santé' na virus PVY^{NTN}, ni bilo zaznati povečanja SA pri nobenem izmed kultivarjev (Kovač in sod., 2009). Analiza preobčutljivostnega odgovora krompirja sorte 'Rywal' na okužbo z virusom PVY^{NTN} je pokazala, da je za uspešno zajezitev virusnega širjenja potrebna SA. V rastlinah NahG-Rywal, ki so onesposobljene v akumulaciji SA, se je virus širil v neinokulirane liste, tam so se pojavili tudi simptomi v obliki nekrotičnih lezij, zaznali pa so tudi številne razlike v izražanju genov po virusni okužbi v primerjavi z netransgenimi rastlinami (Baebler in sod., 2014).

V raziskavi, kjer so merili endogene koncentracije hormonov SA, JA in njenega prekurzorja OPDA, abscizinske kisline (ABA) ter IAA (glavni auxin) v zgodnjem odzivu krompirja na PVY^{NTN}, se je kot virusno odzivni hormon izkazala samo JA. V prvih nekaj urah (1 h in 3 h) po okužbi se pri tolerantni sorti 'Désirée' in pri ekstremno odporni sorti

'Santé' drastično poviša tudi koncentracija JA in OPDA (Baebler in sod., 2009). Predvidevajo, da ima JA vlogo pri virusnem razmnoževanju in širjenju, saj pri rastlinah, pri katerih v medij dodajo JA, zaznajo nižjo koncentracijo virusa PVY^{NTN}, kot pri kontrolnih rastlinah (Kogovsek in Ravnikar, 2013).

Vloga ostalih fitohormonov kot so ET, auksini in ABA, še ni natančno določena v krompirjevi interakciji z virusom PVY. Vseeno pa so rezultati analize odziva na nivoju transckriptoma pokazali, da je verjetno, da tudi druge skupine hormonov sodelujejo v odgovoru krompirja na virusno okužbo (Baebler in sod., 2009; Naseem in sod., 2012; Petek in sod., 2014).

2.5.5 Spremembe na nivoju izražanja genov

K študijam interakcij med rastlinami in virusi so veliko doprinesle tehnike hkratnega spremljanja izražanja več genov ali celotnega transkriptoma (qPCR ter mikromreže in RNA seq) s katerimi je bila preučena tudi interakcija med krompirjem in virusom PVY. Pompe Novak in sodelavci (Pompe-Novak in sod., 2005) so s cDNA-mikromrežami preučevali spremembe izražanja genov v inokuliranih listih krompirja sorte 'Igor' 14 dni po inokulaciji z virusom PVY^{NTN} (v času pojava sistemskih simptomov okužbe) in v listih sekundarno okuženih krompirjevih rastlin. Razlike so se pokazale v izražanju genov za katalazo, β-1,3-glukanazo, genu povezanim z ranitvijo in fotosintetskih genov (Pompe-Novak in sod., 2005). Baebler in sodelavci (Baebler in sod., 2009) so preučevali zgodnji odziv (30 min in 12 h po inokulaciji) na okužbo z virusom PVY^{NTN} v listih občutljive sorte 'Igor' in odporne sorte 'Santé'. Pri obeh sortah so pokazali povišanje izražanja fotosintetskih genov 30 min po inokulaciji, ki pa se 12 h po inokulaciji močno zniža v okuženih glede na slepo inokulirane rastline. Večina različno izraženih fotosintetskih genov pri obeh sortah spada med gene fotosistema II (Baebler in sod., 2009). Pri sorti 'Santé' se je 30 min po inokulaciji značilno povišalo tudi izražanje genov, ki vzdržujejo redoks potencial in detoksificirajo ROS. Pri skupinah genov, ki sodelujejo v prepoznavanju in signalizaciji v biotskem stresu, je bilo 12 h po inokulaciji število različno izraženih genov pri sorti 'Igor' večje kot pri sorti 'Santé'. Pri sorti 'Santé' pa so se v tej časovni točki značilno različno izražali geni za proteine PR in inhibitorje proteaz, geni udeleženi v biosintezi sekundarnih metabolitov, biosintezi brasinosteroidov in geni udeleženi v procesu degradacije celične stene. Ena od hipotez za razlike v izražanju genov med sortama 12 h po inokulaciji je ta, da sta pri občutljivi sorti 'Igor' prepoznavanje in signalizacija zapozneli glede na odporno sorto 'Santé' (Baebler in sod., 2009).

Kogovšek in sodelavci (2010) so s cDNA mikromrežami preučevali razlike v zgodnjem odzivu (30 min, 12 h in 48 h po inokulaciji) na okužbo občutljivih sort krompirja 'Igor' in

Nadine z različno agresivnima virusnima različkoma PVY^N in PVY^{NTN}. Pri obeh sortah so v primerjavi okužbe z virusom PVY^{NTN} glede na okužbo z virusom PVY^N opazili različno izražanje genov, ki sodelujejo pri fotosintezi in ohranjanju redoks potenciala ter genov za inhibitorje invertaz in pektin-metilesteraz. Razliko v izražanju genov med sortama krompirja 'Igor' in 'Nadine' so opazili v metabolizmu saharoze in škroba. Pri sorti 'Igor' je okužba z bolj agresivnim različkom virusa (PVY^{NTN}) glede na milejši različek (PVY^N) 12 h po inokulaciji povzročila znižanje izražanja gena za saharoza-sintazo in genov, ki sodelujejo v biosintezi škroba. Pri sorti Nadine je bilo izražanje saharozasintaze v odzivu na oba različka virusa enako, medtem ko je bilo izražanje genov iz biosinteze škroba 12 h po inokulaciji povišano v rastlinah okuženih z agresivnejšim različkom virusa (Kogovšek in sod., 2010). Transkriptomske študije na krompirju sorte 'Rywal', ki izkazuje odziv HR in odpornost na virusni različek PVY^{N-W}, so pokazale, da je za ta tip odpornosti nujno potrebna SA. V rastlinah krompirja sorte 'Rywal' se je že prvi dan po okužbi povišalo izražanje genov, ki bi lahko bili pomembni za prepoznavanje virusne okužbe, in genov za MAPK in CDPK. Prav tako se je povišalo izražanje genov v signalni poti SA ter različnih družin proteinov PR, znižalo pa se je izražanje transkripcijskih faktorjev ARF. Razlike v izražanju omenjenih genov so se 3. dpi še povečale, dodatno pa se je značilno povišalo izražanje transkripcijskih faktorjev iz družin WRKY in "C2H2 zink finger" ter nekaterih genov iz signalizacije JA in ET. Šesti dan po inokulaciji je število značilno različno izraženih genov v signalizacijskih poteh glede na tretji dan drastično upadlo, še vedno pa so bili močno izraženi geni za transkripcijske faktorje WRKY in proteine PR. V transgenih rastlinah NahG-Rwyal, ki ne akumulirajo SA, je bil odziv na virus zakasnjen. V nobeni od časovnih točk se ni značilno aktivirala signalna pot SA, so se pa tretji in šesti dan po inokulaciji povišano izražali geni iz signalnih poti JA in ET. Izražanje genov R in PR se je prav tako značilno povišalo šele tretji dan po inokulaciji (Baebler in sod., 2014).

Glukanaze, so encimi, ki hidrolizirajo in tako razgradijo kalozo. Različne raziskave v krompirju so identificirale glukanaze kot pomembne v odgovoru krompirja (Baebler in sod., 2009; Dobnik in sod., 2013; Kogovšek in sod., 2010), saj se je njihovo izražanje v krompirju zvišalo po okužbi z virusom PVY^{NTN}. Funkcionalna analiza transgenih rastlin s povečanim izražanjem glukanaz razreda III je pokazala, da imajo vlogo pri širjenju virusa. 13. dan po inokulaciji z virusom so bile vse transgene rastline 'Désirée' okužene z virusom v sistemskih listih, medtem ko so v netransgenih rastlinah detektirali virus le pri polovici rastlin. V nasprotju, Dobnik in sodelavci v koncentraciji virusa na inokuliranih listih med transgenimi in netransgenimi rastlinami sorte 'Désirée' niso zaznali sprememb. Ti rezultati predvidevajo pomembno vlogo glukanaz pri širjenju virusa in pri njegovem namnoževanju (Dobnik in sod., 2013).

2.5.6 Krompirji sorte 'Désirée' ter transgene rastline NahG-Désirée in Désirée coi1-RNAi

Različne sorte krompirja različno odgovorijo na okužbo s krompirjevim virusom Y. Nekateri, rezistentni kultivarji (ekstremna rezistenca ali hipersensitivni odgovor) lahko omejijo virusno širjenje, medtem ko se v drugih gostiteljih virus lahko v večji ali manjši meri namnoži (Kogovsek in Ravnikar, 2013). Pri teh, tako imenovanih dovzetnih kultivarjih, se lahko bolezen močno izrazi (občutljiva interakcija) ali pa sploh ne (tolerantna interakcija). V doktorski nalogi smo se osredotočili na preučevanje tolerantne interakcije med krompirjem sorte 'Désirée' in njegovim patogenom PVY^{NTN}.

Da bi proučili vpliv ključnih rastlinskih hormonov SA in JA, smo se poslužili transgenih rastlin NahG-Désirée in Désirée coi1-RNAi. Pri preučevanju vloge SA pri rastlinski obrambi se lahko uporabljajo transgene rastline z vnešenim bakterijskim genom *nahg*. Ta gen kodira encim salicilat-hidroksilazo, ki metabolizira SA do neaktivnega katehola in tako prepreči akumulacijo SA v rastlinah pod stresom. Te rastline ne izkazujejo odziva SAR in ne povišajo izražanja genov PR po infekciji s patogenimi organizmi (Burra in sod., 2015; Vincentius A Halim in sod., 2007; Mur in sod., 2006). Transgeni krompirji Désirée coi1-RNAi1 imajo vstavljeno interferenčno coi1-RNAi, ki utiša izražanje gena *coi1*. COI1 protein je kot del SKP-Cullin-F-box (SCF) ubikvitin E3-ligaznega kompleksa odgovoren za prepoznavo tarčnih JAZ proteinov (Sheard in sod., 2010; Yan in sod., 2009), zato so rastline Désirée coi1-RNAi1 onesposobljene v signalizacijski poti JA (Burra in sod., 2015).

2.6 REŠEVANJE BIOLOŠKEGA PROBLEMA S POMOČJO SISTEMSKE BIOLOGIJE

Izraz sistemska biologija se je prvič pojavil leta 1987 (Hogeweg in Hesper, 1978). Področje raziskav se od takrat razvija v analizni pristop, ki temelji na razumevanju, da je celoten biološki organizem več kot le vsota njegovih sestavnih delov (Kitano, 2002). Sistemska biologija je torej interdisciplinarni pristop, ki omogoča razumevanje dinamike procesov v kompleksnih bioloških sistemih celostno. Za razliko od t.i. »redukcionističnega« pristopa molekularne biologije, pri katerem poizkušamo izvedeti vse o eni molekuli, o enem genu ipd., sistemska biologija celostno povezuje različnih nivoje informacij: transkriptomskih (izražanje vseh genov v neki celici oziroma tkivu), proteomskih (sestava proteinov in njihove aktivnosti), metabolomskih (sestava metabolitov), interaktomskih (povezava med proteini, njihove interakcije), jih integrira in s pomočjo matematičnega modeliranja izlušči lastnosti preučevanega biološkega sistema (Gutiérrez in sod., 2005). Tak kompleksen pristop pa potrebuje povezovanje
različnih znanj oziroma disciplin, npr. biologije, fizike, matematike, tehnike/inženirstva, računalništva in statistike (Chuang in sod., 2010; Ideker in sod., 2001; Mazzocchi, 2012).

Pristop raziskovanja je sestavljen iz korakov zbiranja podatkov, njihove integracije, formalnega matematičnega modeliranja sistema, temeljite računske analize in izvajanja poskusov (Ge in sod., 2003) (Slika 5). Rezultati analize vpliva različnih perturbacij na živi sistem nato vodijo v oblikovanje novih bioloških hipotez (Chuang in sod., 2010).



Slika 5: Shema poteka iterativnega procesa izgradnje razumevanja biološkega problema s pomočjo sistemske biologije.

Figure 5: Scheme of iterative process of answering biological question with systems biology approach.

2.6.1 Visoko zmogljive metode molekularne biologije za proučevanje bioloških sistemov

Transkriptomika preučuje izražanje genov oziroma količine mRNA na nivoju celotnega genoma ali njegovega dela. Izmed vseh 'omik' se je transkriptomika razvijala najhitreje. Od razvoja prvih mikromrežnih čipov navadnega repnjakovca, ki so spremljali izražanje 45 genov (Schena in sod., 1995) pa vse do analize celotnega transkriptoma; sprva preko mikromrež ter kasneje preko sekvenciranja naslednje generacije, je področje transkriptomike doživelo revolucionarne spremembe (Fukushima in sod., 2009). Robustna metoda za celostno analizo transkriptoma so DNA-mikromreže, v novejšem času pa metoda sekvenciranja molekul RNA (RNA-seq, (Chu in Corey, 2012)). Vendar pa je pri biološki interpretaciji transkriptomskih rezultatov potrebna previdnost, saj količina mRNA ni nujno neposredno povezana s količino odgovarjajočih proteinov v celici oz. s samo encimsko aktivnostjo (Fernie in Stitt, 2012). Vzrok so regulacijski mehanizmi na nivoju translacije in ne nazadnje tudi regulacija aktivnosti encimov.

Proteom celice, tkiva ali organizma nam pokaže bolj realno sliko celične aktivnosti kot sam transkriptom, saj so prav proteini osnovni nosilci funkcij v celici. Zaradi faktorjev, kot so različna razpolovna doba proteinov in postranskripcijske modifikacije, je korelacija med proteomom in transkriptomom lahko nizka. Zaradi velike kompleksnosti proteoma in analitike, povezane s preučevanjem proteinov je njegova karakterizacija bolj zahtevna kot karakterizacija transkriptoma. Metode proteomike temeljijo na ločevanju mešanic proteinov do posameznih proteinov in njihovi identifikaciji. Prva uporabljena metoda ločevanja proteinov je 2- dimenzionalna (2D) gelska elektroforeza kjer v dveh fazah ločimo proteine glede na njihov naboj ter maso. Glede na primerjavo proteomskih profilov lahko proteine identificiramo in kvantificiramo spektrofotometrično (masna spektrometrija - MS), kjer peptide ločujemo glede na njihov količnik m/z (masa/naboj). Večkrat je metoda uporabljena v različnih povezavah s kromatografijami kot so LC-MS (ang. liquid chromatography MS), LC-MS/MS (ang. liquid chromatography-tandem MS) za izboljšanje proteomskega profiliranja (Haider in Pal, 2013).

Visoko zmogljive metode že z enim samim eksperimentom pridobijo ogromno število podatkov. Zato je trenutno v sistemski biologiji eden izmed glavnih izzivov obdelava ter smiselna interpretacija podatkov v naslednji fazi pa izgradnja pravilnih modelov delovanja posamezne metabolne poti, celice, organa ali celo organizma. (Chuang in sod., 2010; Machado in sod., 2011).

2.6.2 Matematično modeliranje v biologiji

Sistemska biologija je izkoristila številčne visoko razsežne eksperimentalne podatke za modeliranje bioloških procesov. Z uporabo matematičnih modelov celičnih metabolizmov je omogočeno sistematsko testiranje in izvajanje bioloških pertrubacij (kot so utišanje izražanja določenega gena). Na tak način se optimizira biološko testiranje in omogoča definiranje novih bioloških hipotez. Modeli so po navadi zgrajeni v ponavljajočem ciklov bioloških ter *in silico* eksperimentov ter izboljšav modela (Machado in sod., 2011)

Sistem, model, eksperiment ter simulacija so ključni pojmi, ki definirajo analizo s pomočjo modelov. Sistem je entiteta iz realnega sveta, opazovani proces, ki ga želimo analizirati, medtem ko je model poenostavljen ter strukturiran opis realnega stanja, ki smo ga zgradili, da bi nam pomagal razumeti realno stanje. Z eksperimentom pridobimo informacije o realnem stanju. Z variiranjem vhodnih podatkov, preko simulacij pa manipuliramo model, da bi dobili izhodne podatke (informacije o rezultatu). Simulacija je torej nekakšen eksperiment izveden na modelu, ki nam priskrbi odgovore na vprašanja o realnem svetu. Prav tako nam simulacije omogočajo testiranje bioloških hipotez, ko so eksperimenti v realnem svetu časovno potratni, nevarni ali dragi.

Za modeliranje bioloških sistemov se uporabljajo številni formalizmi, deloma zaradi fenomena biološke diverzitete, kot lastnosti živih organizmov, deloma pa zaradi raznolikosti dela v raziskovalnih skupinah. Boolejava omrežja so vpeljali leta 1969 za modeliranje genskih regulatornih omrežij, kasneje pa so jih uporabili tudi za opis signalizacijskih omrežij. Prvotno je omrežje sestavljeno iz genov, modeliranih z booleanovimi spremenljivkami, ki predstavljajo aktivno oziroma neaktivno stanje. Beyesianska omrežja tvorijo posebne vrste verjetnostnega grafa. Njihova vozlišča predstavljajo diskretne ali kontinuirne spremenljivke, povezave pa pogojne odvisnosti, kar ustvari aciklični usmerjen graf. Vsako vozlišče ustvari verjetnostno funkcijo, ki opiše njegovo odvisnost od vrednosti svojih vstopnih vozlišč. Zaradi svoje fleksibilnosti so Bayesianska omrežja precej priljubljena v bioloških aplikacijah. Njihova pomanjkljivost je nezmožnost modeliranja povratnih zank, kar je pogost pojav v bioloških sistemih, vendar se omejitvi da izogniti z uporabo dinamičnih Bayesianskih omrežij. Petri mreže so bile zasnovane v 60-tih za modeliranje sočasnih sistemov. So bipartitni grafi z dvema tipoma vozlišč (ang. places and transition) povezanih z usmerjeno povezavo. Trenutno obstaja veliko število nadgradenį petri mrež (časovna, stohastična, hibridna, kontinuirna, funkcionalna, hierarhična), kar omogoča ogromen nabor za raznolika tako kvantitativna kot tudi kvalitativna modeliranja. Modeliranje s pomočjo enostavnih diferencialnih enačb (ang. ordinary diferential equasion, ODE) je v sistemski biologiji najpogosteje uporabljen pristop za opisovanje sprememb sistema kot funkcije časa (kinetično modeliranje). Natančno opisan kinetični model omogoča simulacije časovnih potekov ter napovedovanje odgovora na različne stimule (inpute, vhodne podatke). Vendar izgradnja ODE modelov zahteva poznavanje natančnih reakcijskih mehanizmov za izbiro pravilnih kinetičnih zakonov ter natančne eksperimentalne podatke za ocenjevanje kinetičnih parametrov. Zaradi pomanjkanja kinetičnih podatkov je velikost ODE modelov zelo omejena. Za premagovanje te omejitve se zato uporabljajo približni hitrostni zakoni (ang. GMA-generalized mass action, s-systems, convenience kinetics, ling-log), ki poenostavijo hitrostne reakcije in omogočajo analizo obsežnih modelov (povzeto po Machado in sod. (Machado in sod., 2011)).



Slika 6: Shema signalizacijskih poti SA, JA in ET (Pieterse in sod., 2009: 313).

Figure 6: Schematic representation of SA, JA and ET signaling pathways (Pieterse in sod., 2009: 313).

V rastlinskih raziskavah so najpogostejši modeli, ki opisujejo metabolne poti (Baghalian in sod., 2014; Giersch in sod., 2007; Kruger in Ratcliffe, 2015; Poolman in sod., 2001). Večino zgrajenih modelov je v povezavi s primarnim metabolizmom, fotosintezo ter metabolizmom sladkorjev. Model Kalvinovega cikla je eden prvih izgrajeni modelov rastlinskega metabolizma (Pettersson in Ryde-Pettersson, 1988), večina kompleksnih

dinamičnih modelov pa se osredotoča na primarne metabolne poti (Rios-Estepa in Lange, 2007). Signalna omrežja imajo glede na metabolna še dodatni nivo kompleksnosti, saj njihove komponente med seboj medmrežno interagirajo (Derksen in sod., 2013; Feys in Parker, 2000; T Genoud in Métraux, 1999; Pieterse in sod., 2001). Pieterse in sodelavci so izgradili biološko shemo, ki opisuje glavne komponente signalizacijskih poti SA, JA in ET ter interakcije s signalnimi potmi ABA, auksinov in giberlinov v odgovoru navadnega repnjakovca na patogene (Slika 6) (Pieterse in sod., 2009).

Študija o signalnih poteh transporta auxina je primer modela rastlinske signalizacijske poti (Twycross in sod., 2010), ki pa vključuje le bioloških 6 komponent. Le malo modelov opisuje rastlinski imunski odgovor, med drugim tudi zaradi pomanjkanja eksperimentalnih podatkov. Nekateri modeli opisujejo del ali več delov signalnih poti, po navadi v obliki topoloških modelov z opisom medsebojnih interakcij brez dinamične komponente (Olmedo in sod., 2006; Staswick, 2008). Prvi poskus izgradnje signalizacijskih poti rastlinskega odziva na patogen predstavlja Booleanovo omrežje z numeričnimi simulacijami, ki opisuje 18 bioloških komponent povezanih preko 12 Booleanovih operatorjev (Thierry Genoud in sod., 2001). Naseem in sodelavci so se osredotočili na kinetično modeliranje signalnih poti citokininov navadnega repnjakovca okuženega z bakterijo Pseudomonas syringe (Naseem in sod., 2012). V model so vključili 105 vozlišč in 163 povezav med njimi, ter poleg citokininov vključili tudi nekatere glavne komponente signalizacijskih poti auksinov, giberlinov ter SA, JA in ET. Bolj podroben Booleanov model, ki se osredotoči na signalizacijske poti JA opisujeta Devoto in Turner (Devoto in Turner, 2005). V model vključita 28 bioloških komponent, od tega kar nekaj abstraktnih vozlišč (npr. obramba-defence, inhibicija rasti-growth inhibition). Obsežni biološki eksperimenti, pa so pokazali, da je v odgovor rastline vključenih veliko večje število komponent (Kestler in sod., 2008), zato bi za boljši približek realnega stanja potrebovali v model vključiti informacije o večjem številu komponent. Večino do sedaj izgrajenih modelov signalizacijskih poti sloni na podatkih o navadnem repnjakovcu. Da bi razumeli odgovor na okužbo ekonomsko pomenih kulturnih rastlin, moramo generirati nove eksperimentalne podatke in uporabiti nove metode specifične za modeliranje nemodelnih organizmov (Windram in Denby, 2015).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Seznam uporabljenih pufrov in gojišč

MS gojišče smo uporabili za gojenje rastlin v tkivnih kulturah, gojišči LB in YM pa smo uporabili za bakterijske kulture. Fosfatni pufer nam je služil za pripravo inokuluma za okuževanje rastlin z virusom, pufer MMA pa pri agroinfiltraciji krompirjev.

	Sestavine gojišča	Koncentracije
LB gojišče	tripton	1 %
	kvasni ekstrakt	0,5 %
	NaCl	1 %
	agar (za trdna gojišča)	1,5 %
	pH 7,0	
YM gojišče	kvasni ekstrakt	0,04 %
	manitol	1 %
	NaCl	1,7 mM
	MgSO4×7H2O	0,8 mM
	K2HPO4×3H2O	2,2 mM
	agar (za trdna gojišča)	1,5 %
Fosfatni pufer	NaH2PO4	2,6 mM
	Na2HPO4	15,2 mM
	DIECA	0,1 %
	рН 7,6	
MS gojišče	MS z vitamini	5 g/l
	agar	8g/l
	saharoza	30g/l
Pufer MMA	saharoza	20 g/l
	MS soli brez vitaminov	5g/l
	MES	1,95g/l
	acetosiringon	0,2mM
	pH=5.6	

Preglednica	1:	Seznam	uporabljenil	n pufrov	in	gojišč.
0			1 J	1		0 0

3.1.2 Uporabljeni oligonukleotidni začetniki

Za spremljanje odziva krompirjevih listov na virusno okužbo smo izbrali gene, ki so udeleženi v obrambni mehanizem rastline in upoštevali rezultate naših predhodnih študij pridobljene z mikromrežami in RT-qPCR (Baebler in sod., 2009; Kogovšek in sod., 2010; Petek in sod., 2014; Pompe-Novak in sod., 2005). Uporabili smo tudi nekatere oligonukleotidne začetnike in sonde za RT-qPCR iz teh študij (Preglednica 2). Nove amplikone smo načrtali s programom Primer Express (Applied Biosystems, ZDA) in jih naročili pri podjetju IDT (Integrated DNA Technologies, ZDA). Za določanje količine PVY RNA smo uporabili oligonukleotidne začetnike za PVY (Kogovsek in sod., 2008).

Oligonukleotidne začetnike uporabljene za dvohibridni sistemom kvasovk smo konstruirali tako, da se je del zaporedja nalegal tarčnemu genu, drugi del pa destinacijskemu vektorju (pGADT7 oziroma pGBKT7) (Slika 10). Zaporedje tarčnega gena smo predhodno identificirali s pomočjo podatkovnih baz NCBI ter UniProt in zaporedje analizirali z algoritmom BLAST. Upoštevali smo zahteve za načrtovanje oligonukleotidov. Dolžina zaporedja, ki nalega tarčnemu genu mora biti okoli 20-22 nukleotidov, del, ki nalega plazmidu pa okoli 16 nukleotidov. Temperatura tališča smernega in protismernega oligonukleotida začetnika mora biti podobna.

Za načrtanje smo uporabili program CLC Main Workbench (CLC Bio) in sintezo oligonukleotidov začetnikov naročili pri podjetju IDT (Integrated DNA Technologies, ZDA).

Preglednica 2: Oligonukleotidni začetniki in sonde za spremljanje izražanja genov krompirja z RTqPCR.

Prikazano je nukleotidno zaporedje za smiselni (F), protismiselni (R) oligonukleotidni začetnik ter sondo (S), uporabljena koncentracija oligonukleotido začetnikov ter sond v reakcijski mešanici ter tarčni gen. Geni, ki kodirajo za proteine povezane s patogenezo (PR-1b), z metabolizmom sladkorjev (GBSS1), fotosintezo (RA, CAB), geni za glukanaze (Glu-I, Glu-II, Glu-III), invertazo (CWInv), gena za serin/treoninski kinazi (StSAPK8, StPK11), fosfatazi (StPP2C, StAVR9) ter referenčni geni (EF, COX, 18S).

Table 2: RT-qPCR primers and probes used for potato gene expression analysis.

Nucleotide sequences for forward (F), reverse primers (R) and probe (S) are listed under target gene ID followed by concentration of used primers and probes in the reaction. PR-1b: Pathogenesis related protein 1b; GBSS1: Granule-bound starch synthase I; RA: RuBisCO activase; Glu-I: Glucan endo-1,3-beta-glucosidase, basic (I); Glu-II: Glucan endo-1,3-beta-glucosidase, acidic (II); Glu-III: Glucan endo-1,3-beta-glucosidase, acidic (II); Glu-III: Glucan endo-1,3-beta-glucosidase, acidic (II); CWInv: Cell Wall Invertase; CAB: Chlorophyll a/b binding protein; StSAPK8: *Solanum tuberosum* serine/threonine protein kinase; StPK11: Serine/threonine protein kinase; StPP2C: protein phosphatase 2C; StAVR9: StAVR9/Cf-9 rapidly elicited protein 284; EF: Elongation factor 1 α ; COX: cytochrome oxidase; 18S: Eukaryotic 18S rRNA

Tarčni gen	PGSC tarčni identifikator	Zaporedje (5'-3')	Koncent. (nM)	Učinkovitost
PR-1b	PGSC0003DMG400002027 PGSC0003DMG400002028 PGSC0003DMG400002029	F: GTATGAATAATTCCACGTACCATATGTTC R: GTGGAAACAAGAAGATGCAATACTTAGT	300 300	Baebler, 2011
GBSS1	PGSC0003DMG400012111	F: CCAAGAAATGGGAGACATTGCTATTGGG R:TGATCTTATTGTTGAAACAAGGATAACCA AAGCTC	300 300	Kogovšek, 2010
RA	PGSC0003DMG400019149	F: AGAGGCAGCACTCGGAGATGC R: GCAACAGGACGCGCTTTTTTCCC	300 300	Kogovšek, 2010
Glu-I	PGSC0003DMG400014351 PGSC0003DMG400020017 PGSC0003DMG400021848 PGSC0003DMG400040260 PGSC0003DMG400047328	F: ACGCGAGATGGTGGGTACAG R: TCAGCCCTGTTACTGGCACA	300 300	Oufir, 2008
Glu-II	PGSC0003DMG401010492 PGSC0003DMG401020492 PGSC0003DMG402010490	F: GATGCCCTTKTGGATTCWATGTA R: GTATCKGAAAGTGGYTGGCCTT	300 300	Kogovšek, 2010
Glu-III	PGSC0003DMG40001270	F: CCCTGGAGTTGTTGTAAATGATAAYG R: ATGCYACATACTCRGCCCTTGAGA F: CCCCGGGAGAGCAATCACCAATTGA	300 300	Kogovšek, 2010
CWInv	PGSC0003DMG402028252	R: TCTCCCAATGTTCTAGTGCAACTTT S: FAM-CTAAATGCTTGGAGCATGGCTAATG- TAMRA	900 900 250	Petek, 2014
CAB	PGSC0003DMG400042498 PGSC0003DMG400016695 PGSC0003DMG400013460 PGSC0003DMG400013418 PGSC0003DMG400013415 PGSC0003DMG400013413 PGSC0003DMG400013412 PGSC0003DMG400013411 PGSC0003DMG400013411 PGSC0003DMG400008299 PGSC0003DMG400008298	F: TTGGTCCATGCACAAAGCAT R: ACGGCTCCCATCAACACAA S: FAM-TTGGCCATTTGGGCTTGCCAA- Zen Iowa BlackTM FQ	900 900 250	3,3
StSAPK8	PGSC0003DMT400066617	F:TTGAAGCTGGAAAATACATTGCTT R:CTTGGAATACCCAAAATCACAAATT S:FAM-ATGGAAGCCCTGCTCCTCGGCT- Zen Iowa BlackTM FQ	900 900 250	3,3
StPK11	PGSC0003DMT400067426	F:TCAGGAAAACCATTGGGAGAAT R:AGGTTCTTGCAATCTGGTGTGA S: FAM- ATGAGTGCCCAACACTCCATACCCGAT-Zen Iowa BlackTM FQ	900 900 250	3,9
StPP2C	PGSC0003DMT400052936 PGSC0003DMT400052937 PGSC0003DMT400052938	F:CGGAAACGATTAGCCTTAACAGA R:TCGAAACCGTCGGAGAAGTAG S: FAM- TCTTCTGAGTGTTCAACATCTGCACCGATT- Zen Iowa BlackTM FQ	900 900 250	4,0
StAVR9	PGSC0003DMT400078065	F:GGAAGAGACCGACTAGGTTGGA R:GCAGGAGTCACCGGAAAATTC S: FAM-TTCCGGTGGCTTCGATGAGTTTCG- Zen Iowa BlackTM FQ	900 900 250	3,3
EF	PGSC0003DMG400020772	F:GGAAGCTGCTGAGATGAACAAGA R:CTCACGTTCAGCCTTAAGTTTGTC S:FAM-TCATTCAAGTATGCCTGGGTGCT- TAMRA	900 900 250	Baebler, 2009
COX	PGSC0003DMG400020772	F:CGT CGC ATT CCA GAT TAT CCA R:CAA CTA CGG ATA TAT AAG RRC CRR AAC TG S: FAM -TGC TTA CGC TGG ATG GAA TGC CCT -TAMRA	300 300 150	Weller, 2000

Preglednica 3: Oligonukleotidni začetniki uporabljen pri analizi dvohibridnega sistema kvasovk. Table 3. Primers used for yeast-two hybrid system analysis.

Oligonukleotidni	Dolžina	Tm	Zaporedje oligonukleotidnega
začetnik	produkta	(°C)	začetnika
pGADT7_StSAPK8_F	1059	73	ATGGCCATGGAGGCCAGTGAATTCCACATGGATCGAGGTCCGGGACC
			GTGT
pGADT7_StSAPK8_R		72	ATCTGCAGCTCGAGCTCGATGGATTCACATTGCATATATGATCTCCCC
			GCTGCT
pGADT7 StPK11 F	1026	66	ATGGCCATGGAGGCCAGTGAATTCCACATGGAGGAAAAGTATGAGCT
			TTTGAAGGAA
pGADT7 StPK11 R		66	ATCTGCAGCTCGAGCTCGATGGATTCATCCTCAGACATAAACAGCAA
			AGTCATT
pGADT7 StPP2C F	1179	65	ATGGCCATGGAGGCCAGTGAATTCCACATGTCTTGTACCGTCGCAATT
·			CCA
pGADT7 StPP2C R		63	ATCTGCAGCTCGAGCTCGATGGATTTACCAAAATTGTTGCAGTTGAAT
1			TATCAT
pGADT7 StAVR9 F	1140	67	ATGGCCATGGAGGCCAGTGAATTCCACATGATGTCTTGCACCGTCGCT
1			CTT
pGADT7 StAVR9 R		68	ATCTGCAGCTCGAGCTCGATGGATTCAACAGAATTGTCCCAGTTGAAT
r · · · · · · · ·			GATCAT
pGBKT7 StSAPK8 F	1059	73	ATCTCAGAGGAGGACCTGCATATGGCCATGGATCGAGGTCCGGGACC
F			GTGT
pGBKT7 StSAPK8 R		72	AGAGGCCCCAAGGGGTTATGCTAGTTATGCTCACATTGCATATATGAT
F		. –	CTCCCCGCTGCT
pGBKT7 StPK11 F	1026	66	ATCTCAGAGGAGGACCTGCATATGGCCATGGAGGAAAAGTATGAGCT
populity_outility_i	1020	00	ТТТБААББАА
pGBKT7 StPK11 R		66	AGAGGCCCCAAGGGGTTATGCTAGTTATGCTCATCCTCAGACATAAA
poblici /_ou init_it		00	CAGCAAAGTCATT
pGBKT7_StPP2C_F	1179	65	ATCTCAGAGGAGGACCTGCATATGGCCATGTCTTGTACCGTCGCAATT
poblici /_bulleo_i	11/)	00	ССА
nGBKT7 StPP2C R		63	AGAGGCCCCAAGGGGTTATGCTAGTTATGCTTACCAAAATTGTTGCA
pobler/_burize_k		05	GTTGAATTATCAT
nGBKT7 StAVR9 F	1140	67	ATCTCAGAGGAGGACCTGCATATGGCCATGTCTTGCACCGTCGCTCTT
pobler /_bervio_i	1140	07	ТСАААТ
nGBKT7 StAVR9 R		68	AGAGGCCCCAAGGGGTTATGCTAGTTATGCTCAACAGAATTGTCCCA
PODKT/_SKAVK3_K		00	GTTGAATGATCAT
			UTUATUATAI

3.1.3 Uporabljeni plazmidi

Vektor pENTRTM4 Dual (Thermo Fisher Scientifice) (Slika 1) smo uporabili za analizo prehodnega utišanja gena StSAPK8 v krompirju. Zaporedje za siRNA_StSAPK8 je bilo načrtano na podlagi sekvenciranega zaporedja StSAPK8 in sintetizirana s pomočjo GenART tehnologije (Life technologies). V plazmid je bilo vstavljeno preko NcoI in EcoRV restrikcijskih mest. Ta sistem omogoča usmerjeno kloniranje DNA zaporedja v vstopne vektorje, ki so kompatibilni z Gateway® sistemom kloniranja (Karimi in sod., 2002).

Stare T. Proučevanje dinamike odziva krompirja na okužbo ... na ravni trankriptoma in drugih fizioloških dejavnikov. Dokt. disertacija. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, 2016



Slika 7: Shema pENTRTM4 Dual plazmida (Thermo Fisher Scientifice). Figure 7: Map of pENTRTM4 Dual plasmid (Thermo Fisher Scientifice).

Vektor PH7GWIWG2 (II) smo uporabili analize prehodnega utišanja genov. E. coli s plazmidom PH7GWIWG2 (II) smo pridobili iz belgijske univerze (VIB-Vlaams Instituut voor Biotechnologie) ter ga iz bakterije izolirali po postopku opisanem v poglavju 3.2.10.2.



Slika 8: Plazmidna karta vektorja PH7GWIWG2(II) (Karimi in sod., 2002) Figure 8: Map of plasmid PH7GWIWG2(II) (Karimi in sod., 2002) Vektorja pGEM®-T in pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega).



Slika 9: Plazmidna karta vektorja pGEM®-T in pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega). Figure 9: Map of plasmid pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega).

Za določanje interakcij med proteini s pomočjo dvohibridnega sistema kvasovk smo uporabili vektorja pGBKT7 (vaba) in pGADT7 (plen) (Clonetech).



Slika 10: Plazmidna karta vektorjev pGBKT7 (vaba) in pGADT7 (plen) dvohibridnega sistema kvasovke (Clonetech)

Figure 10: Map of plasmid pGBKT7 (bait) in pGADT7 (pray) vectors used for yeast two-hybrid analysis (Clonetech)

3.2 METODE

V naslednjem poglavju so predstavljene in opisane uporabljene metode. Shema poteka dela je prikazana na spodnji sliki (Slika 11). Odgovor rastlin krompirja na virusno okužbo smo analizirali na dva načina. Z izgradnjo modela signalizacijskih poti imunskega rastlinskega odziva smo opisali komponente signalizacijskih poti hormonov (SA, JA in ET) ter njihove interakcije. Model smo optimizirali in razširili, ter v končni fazi prevedli iz modelne rastline navadni repnjakovec na krompir. Z analizo dinamike odgovora krompirja sorte 'Désirée' in dveh genotipov, ki sta onesposobljena v signalizacijski poti SA in JA, smo analizirali biološki odgovor na nivoju celotnega transkriptoma, proteoma, spremljali smo kumulacijo in širjenje virusa po rastlini in med različnimi tkivi, analizirali dinamiko fiziološkega odgovora na nivoju fotosinteze ter akumulacije kaloze v kontekstu z razvojem bolezni (simptomov). Rezultate obeh pristopov smo integrirali v opisni model, ki nam je omogočil generacijo novih hipotez in določitev potencialnih ključnih regulatorjev rastlinskega imunskega odgovora. Z metodami funkcijske genomike smo novo identificirane komponente ovrednotili.



Slika 11: Shema poteka dela.

Figure 11: Scheme of work-flow.

3.2.1 Priprava rastlinskega materiala

Rastline krompirja sorte 'Désirée' in dveh genotipov (NahG-Désirée in Désirée coi1-RNAi) smo namnožili z mikropropagacijo. Izsečke smo gojili v MS gojišču pri temperaturi 19 ± 2 °C v času osvetljevanja in 17 ± 2 °C v času teme, gostota pretoka fotonov 70–90 µmol m–2s–1 (žarnica Osram L36/W77) in s fotoperiodo 16 ur svetlobe in 8 ur teme. Po dveh tednih, ko so izsečki pognali korenine, smo jih presadili v zemljo. Rastline v zemlji smo vzgajali 4 tedne pri naslednjih pogojih: relativna zračna vlaga 75 ± 2 %, temperatura 20 ± 2 °C v času osvetljevanja in 18 ± 2 °C v času teme, gostota pretoka fotonov 120–150 µmol m–2s–1 (žarnica Osram L36/W77) in fotoperioda 16 ur svetlobe in 8 ur teme. Rastline smo zalivali z vodovodno vodo.

3.2.1.1 Inokulacija rastlin

Po štirih tednih rasti v zemlji v rastni komori smo rastline krompirja okužili s z virusom PVY^{NTN}. Za inokulacijo smo uporabili sok okuženih rastlin krompirja sorte 'Pentland Squire'. Okužene rastline smo homogenizirali in zmešali s fosfatnim pufrom za inokulacijo v razmerju 1:3. Macerat smo inkubirali 5 minut, da se je virus izločil iz materiala. Rastlinam smo označili tri polno razvite spodnje liste, jih posuli s karborundom (SiC) in nato premazali s tremi kapljicami inokuluma iz PVY^{NTN} okuženih rastlin. Po 15 minutah smo liste sprali z vodovodno vodo. Pri kontrolah (slepo okužene rastline) smo uporabili enak postopek, le da smo kot začetni material za pripravo inokulacijske mešanice, uporabile neokužene rastline. Rastline smo takoj po inokulaciji postavili nazaj v rastno komoro.

3.2.1.2 Tretiranje rastlin s hormoni

Po štirih tednih rasti v zemlji smo rastline krompirja tretirali z različnimi hormoni. Tretiranje rastlin s SA smo izvedli tako, da smo rastline posprejali z 300 μ M analogom SA, INA (98% 2,6-dikloroizonikotinska kislina, Aldrich) v etanolu, tretiranje z ABA pa smo izvedli s sprejanjem rastlin z 100 μ M ABA (>98.5 % (±) abscizinska kislina, Aldrich) v etanolu. Kontrolne rastline smo tretirali z raztopino 1 % etanola. Za tretiranje rastlin z lahkohlapnim ET in metil jasmonatom (MeJA), smo rastline zaprli v zrakotesne posode s 50 ppm ET oziroma 0,25 μ l MeJA na L zraka (95 % metil jasmonat, Aldrich). Tudi kontrolne rastline smo zaprli v zrakotesne posode. Liste smo vzorčili po 24h tretiranja s hormoni in direktno zamrznili v tekočem dušiku.

3.2.1.3 Vzorčenje rastlinskega materiala

Za analizo izražanja genov ter proteomske analize smo vzorčili krompirjeve liste sorte 'Désirée' ter dveh transgenih linij NahG-Désirée in Désirée coi1-RNAi. Pobirali smo spodnje (inokulirane) in zgornje (sistemske) liste. Liste smo hitro zamrznili v tekočem dušiku ter jih do analize shranili v zamrzovalniku na -80 °C. Lamino in žile smo vzorčili ločeno (Slika 12). Vzorce smo pobirali v različnih časovnih točkah in sicer 1., 3., 4., 5., 7., 8., 9. ter 11. dan po inokulaciji (dpi) zgornje liste ter 1., 3., 4., 5. ter 7. dan po inokulaciji spodnje inokulirane liste (Slika 12).





A) Vzorčili smo kontrolne (mock) rastline in virusno okužene (PVY^{NTN}) rastline. Spodnje liste smo tretiral: mehansko okužili z virusom PVY^{NTN} preko soka okuženih rastlin ali pa mehansko inokulirali s sokom zdravih rastlin. Vzorčili smo inokulirane spodnje liste (1., 2., 3. spodnji listi) in sistemske zgornje liste (1., 2., 3. zgornji listi). B) Liste smo vzorčili tako, da smo izrezali glavno žilo ter lamino vzorčili posebej. Levo in desno polovico lamine smo vzorčili ločeno za transkriptomske in proteomske analize.

Figure 12: Scheme of sampling of biological material.

A) Control (mock) and virus inoculated (PVY^{NTN}) plants have been sampled. Bottom leaves have been treated either by mechanical inoculation with sap of virus infected plants or by mechanical inoculation with sap of healthy plants. Bottom inoculated leaves (1., 2., 3. spodnji listi) or upper systemic leaves (1., 2., 3. zgornji listi) have been sampled. B) Lamina and veins have been sampled separately, by cutting the midvein. Left and right part of the lamina have been sampled separately for transcriptome and proteome analysis.

Za analizo smo pobrali 1., 2. in 3. spodnje (inokulirane) ter 1., 2. in 3. zgornje (neinokulirane) liste. Številčno poimenovanje je potekalo od spodaj navzgor (najnižje 1., višje 2., najvišje 3 listi) (Slika 13). Vzorčili smo v treh bioloških ponovitvah. Na dan inokulacije smo pobrali tudi netretirane rastline, ki so služile kot začetna točka (0 dpi).Vzorčenje je potekalo vsak dan ob isti uri (10.00), da bi se izognili efektu cirkadianega ritma.



B)





Slika 13: Vzorčenje rastlin krompirja.

A) Za analizo smo uporabili krompir sorte 'Désirée' (NT), in dveh transgenih linij NahG-Désirée in Désirée coi1-RNAi. B) Spremljali smo dinamičen odziv rastlin v odgovoru na rastline v različnih časovnih točkah po inokulaciji z virusom.

Figure 13: Sampling of potato plants.

A) For the analysis potato cultivar 'Désirée' (NT) has been used in addition two transgene lines NahG-Désirée and Désirée coil-RNAi. B) Dynamics of potato response has been analyzed in different time points after virus infection.

Meritve fotosintetske aktivnosti smo izvedli na polno razvitih listih krompirja sorte 'Désirée' in dveh transgenih linij NahG-Désirée in Désirée coi1-RNAi. Za analizo vpliva virusne okužbe na aktivnost fotosintetskih parametrov smo rastline okužili z virusom PVY^{NTN}, kontrolne rastline pa inokulirali z zdravim rastlinskim materialom (slepo inokulirane rastline), kot je opisano v poglavju 3.2. Meritve fotosintetske aktivnosti in koncentracije klorofila smo izvajali 0'13., 1., 3., 4., 5., 7., 8. in 11. dan po inokulaciji. Del rastlin smo pustili netretirane (0 dpi). Za vsak tretma smo uporabili 6 bioloških ponovitev rastlin. Meritve smo opravljali vsak dan ob istem času med 9:00 in 11:00. Meritve smo izvedli sprva na spodnjih dveh inokuliranih listih, kasneje pa smo se selili v smeri širjenja virusa proti zgornjim neinokuliranim listom.

Za proteomske analize smo vzorčili laminino krompirja 'Désirée' (NT), NahG-Désirée (NahG) in Désirée coi1-RNAi. Rastline smo predhodno okužili z virusom ali pa slepo tretirali, kot je opisano v poglavju 3.2. in vzorce pobirali 4 dan po inokulaciji. Izolacija in identifikacija peptidov je potekala z LC-MS analizo v okviru doktorskega dela Katje Stare v sodelovanju z univerzo na Dunaju.

Za analize akumulacije kaloze smo liste krompirja sorte 'Désirée', in dveh transgenih linij NahG-Désirée in Désirée coi1-RNAi vzorčili 3., 4. in 8. dan po inokulaciji.

3.2.2 Izolacija, priprava in analiza RNA

3.2.2.1 Homogenizacija in izolacija celokupne RNA iz listov krompirja

Posamezne pobrane vzorce delov listov krompirja (lamino ali žile) smo homogenizirali zamrznjene v mikrocentrifugirkah s homogenizatorjem TissueLyser (Qiagen, ZDA). Celokupno RNA smo izolirali s kompletom reagentov innuPREP Plant RNA Kit (Analytik Jena) po prilagojenem protokolu. Homogeniziranemu vzorcu smo dodali 450 µl RL pufra predhodno segretega na 56 °C. Le-ta vsebuje gvanidijev izotiocianat, ki inaktivira RNaze. Vzorce smo inkubirali v termobloku 5 min na 56 °C ter vmes večkrat premešali na vibracijskem mešalniku. Po 10 minutnem centrifugiranju smo supernatant prenesli na kolone Spin filter D in tako odstranili grobe delce. Proteine smo oborili z dodatkom 70 % etanola, RNA pa vezali na silikagelno membrano kolone Spin filter R. Po izpiranju nečistoč iz vzorca smo celokupno RNA eluirali v 50 µl predhodno ogrete (56 °C) destilirane vode brez RNaz. Vzorce RNA smo shranili na -80 °C.

3.2.2.2 Razgradnja genomske DNA, reverzna transkripcija in čiščenje

Koncentracijo ter kvaliteto izolirane celokupne RNA smo preverili s spektrofotometrom NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, ZDA) in agarozno gelsko elektroforezo (poglavji 3.6 in 3.7). DNazno reakcijo in reverzno transkripcijo smo izvajali v mikrotitrskih ploščicah s 96 vdolbinicami (Applied Biosystems, ZDA). Pri DNazni reakciji s končnim volumnom 12,5 μ l smo uporabili 8 μ g celokupne vzorčne RNA ter dodali 0.65 enot DNaze (Thermo Fisher Scientific, ZDA) na gram RNA (0,5 μ l) ter 1,25 μ l pufra (1/10 volumna reakcije). Vse vzorce smo redčili z vodo brez RNaz. Ploščice smo vorteksirali, centrifugirali in inkubirali na sobni temperaturi 15 min. Reakcijo smo ustavili z dodatkom 1 μ l 25 mM EDTA in z inkubacijo ploščic za 10 min na 65 °C.

Vzorcem smo dodali 1 µl RNaznega inhibitorja (Thermo Fisher Scientific, ZDA). Kvaliteto Dnazne reakcije smo preverili na agarozni gelski elektroforezi in koncentracijo vzorcev izmerili s spektrofotometrom NanoDrop.

Za reverzno transkripcijo smo uporabili High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, ZDA). Vzorce RNA smo najprej inkubirali 5 min na 80 °C, prenesli na led in vsakemu vzorcu dodali 12,5 μ l reakcijske mešanice (2,5 μ l pufra, 1 μ l mešanice dNTP-jev, 2,5 μ l naključnih oligonukleotidnih začetnikov, 3,25 μ l vode brez RNaz in 1,25 μ l reverzne transkriptaze). Ploščice smo vorteksirali, centrifugirali, inkubirali 10 min na sobni temperaturi in 2 h na 37 °C. Vzorce cDNA smo shranili na -20 °C.

Za analize z mikromrežami smo vzorce pred hibridizacijo očistili s kolonami seta kemikalij RNeasy MinElute Cleanup kit (Qiagen) po navodilih proizvajalca.

3.2.3 Določanje koncentracije in čistosti nukleinskih kislin

Koncentracijo in čistost izolirane RNA smo izmerili s spektrofotometrom NanoDrop. Čistost RNA smo ocenili iz razmerja absorbanc A260/A280 in A260/A230. Optimalne vrednosti za obe razmerji sta med 1.8 in 2.2. Na spektrofotometer smo nanesli po 1.5 μ l vzorca.

Koncentracijo in čistost vzorcev, ki smo jih uporabili za analizo z mikromrežami smo preverili s pomočjo sistema Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technology) pri katerem smo uporabili komplet reagentov Agilent RNA 600 NanoKit in sledili navodilom proizvajalca.

3.2.3.1 Agarozna gelska elektroforeza

Za ugotavljanje kvalitete in koncentracije RNA v posameznih fazah dela ter za ugotavljanje velikosti pomnoženih DNA fragmentov (PCR produktov) in plazmidov smo uporabili agarozno gelsko elektroforezo. Pripravili smo 1% gel, tako da smo agarozo segrevali v pufru TAE (40 mM Tris-acetat, 1 mM EDTA, pH 8,0). Ko se je agaroza popolnoma stopila, smo raztopino nekoliko ohladili in dodali še 0,75 µl etidijevega bromidida (Sigma, 10 mg/ml). Raztopino smo razlili na nosilec za gel in vanj vstavili glavniček za luknjice ter pustili 30 minut, da se je gel strdil.

RNA ali DNA vzorec smo pred nanosom na gel zmešali z nanašalno raztopino v razmerju 2 μ l vzorca, 5 μ l nanašalne raztopine (200 μ l 6 x Loading Dye (Fermentas), 500 μ l glicerol, 500 μ l ddH2O) in 5 μ l vode brez RNaz. 12 μ l tako pripravljene mešanice smo

nanesli v vdolbinice gela. Kot kontrolo smo v eno progo na gelu nanesli 0,7 μl označevalca velikosti DNA 100 bp (MBI Fermentas), zmešanega z enako količino nanašalne raztopine in vode kot pri vzorcih. RNA smo ločevali 20 minut pri napetosti 80 V, DNA pa 30 minut pri napetosti 100 V. Uporabljali smo napajalnik POWER/PAC 1000 (BIO-RAD). Po koncu elektroforeze smo gel slikali s sistemom GelDoc Mega (s programom UVI Photo MW, Biosystematica).

3.2.4 PCR v realnem času

3.2.4.1 Priprava reakcijskih mešanic za PCR v realnem času

V PCR reakcijah v realnem času (qPCR) smo za detekcijo produkta uporabljali kemiji SYBR Green in TaqMan. Za kemijo SYBR Green smo uporabljali Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, ZDA), za kemijo TaqMan pa TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, ZDA). Reakcijske mešanice za posamezne teste smo pripravili v mikrocentrifugirkah v količini, ki je zadostovala za vse reakcije. Zaporedja in končne koncentracije oligonukleotidov začetnikov in sond so prikazane v preglednici (Preglednica 2). Reakcijo PCR smo izvajali v končnem volumnu 5 µl. Redčine vzorcev cDNA in reakcijske mešanice smo pripravili z robotom za pipetiranje Multiprobe II (Perkin Elmer, ZDA). Z robotom Multiprobe II smo v vdolbinice naprej nanesli 2 µl razredčene cDNA vzorcev in nato še 3 µl reakcijske mešanice (končni volumen 5 µl). Po vsakem nanosu smo ploščice pokrili s samolepljivo folijo in centrifugirali 1 min s silo 1000 g. S tem smo zmanjšali možnosti za kontaminacijo. Vsi vzorci so bili naneseni v dveh redčitvah in dveh ponovitvah. Na ploščico smo za vsak amplikon nanesli tudi redčitveno vrsto mešanice vzorcev za izračun umeritvene krivulje (4 redčitve vzorcev v dveh ponovitvah) ter negativne kontrole (NTC), kjer smo namesto cDNA nanesli ddH2O.

3.2.4.2 Reakcija PCR v realnem času

Vse reakcije qPCR smo izvedli na inštrumentu ABI PRISM 9700 HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) v optičnih mikrotitrskih ploščicah formata 384, ki smo jih prekrili z optičnimi adhezivnimi folijami (Applied Biosystems). Reakcijo smo izvedli pri univerzalnih pogojih pomnoževanja: 2 minuti pri 50 °C in 10 minut pri 95 °C (aktivacija polimeraze) ter nato 40 ciklov pri pogojih: 10 sekund pri 95 °C in 1 minuta pri 60 °C. Ker kemija SYBR Green dopušča zaznavanje nespecifičnih produktov, nastalih iz dimerov začetnih oligonukleotidov, smo specifičnost nastalih produktov preverili z analizo talilne krivulje; programu smo na koncu dodali še dodatno stopnjo (60-95 °C, hitrost spreminjanja temperature 0,02 °C/sek, 5 meritev / °C).

3.2.4.3 Obdelava podatkov za RT-PCR v realnem času

Surove podatke smo analizirali s programom SDS 2.3 (Applied Biosystems). Vizualno smo pregledali krivulje pomnoževanja DNA, pri SYBR Green amplikonih pa tudi talilne krivulje. Podatke smo izvozili v tekstovno obliko in analizirali v programu Microsoft Excel.

Pri analizi izražanja genov v listih krompirja smo uporabili referenčna gena 18S rRNA in COX (citokrom c oksidaza) za vzorce 'Désirée' in NahG-Désirée ter EF (elongacijski faktor) ter COX za vzorce Désirée coi1-RNAi. Pri vsakem od referenčnih genov smo povprečili tehnične ponovitve Cq vrednosti vzorcev in izračunali število kopij po metodi umeritve krivulje. Za umeritveno krivuljo posameznega gena smo uporabili štiri serijske razredčine mešanice vzorcev. Iz naklona umeritvene krivulje smo za vsak testiran gen izračunali učinkovitosti pomnoževanja. Pri referenčnih genih smo za vsak vzorec izračunali naklon premice iz dveh redčin vzorcev in ga primerjali z naklonom umeritvene krivulje. Izločili smo rezultate, pri katerih je bila absolutna razlika med naklonom premice vzorca in umeritvene krivulje večja od 0,5, kar pomeni, da je bila reakcija PCR inhibirana.

Pri tarčnih genih smo z metodo umeritvene krivulje izračunali število kopij za tarčni gen. Relativno izražanje tarčnega glede na referenčni gen smo izračunali kot kvocient števila kopij tarčnega gena s povprečjem števila kopij obeh referenčnih genov. Za vsak tarčni gen smo iz umeritvene krivulje določili tudi mejo kvantifikacije (angl. "limit od quantification", loq). Le-to smo določili kot redčino vzorca pri kateri Cq vrednosti ne sledijo linearno premici umeritvene krivulje oz. se začnejo pojavljati stohastični učinki (velike razlike v Cq vrednostmi med tehničnimi ponovitvami vzorcev). V primeru, ko je vrednost Cq višje redčine vzorca pod vrednostjo loq, smo pri vzorcih upoštevali le izračun števila kopij nižje redčine. Če pa je tudi Cq nižje redčine vzorca pod vrednostjo loq, smo vzorcu pripisali število kopij redčine iz umeritvene krivulje, ki smo jo določili za mejo kvantifikacije.

3.2.5 Mikromreže

3.2.5.1 Hibridizacija vzorcev ter predprocesiranje mikromrež

Z mikromrežami smo analizirali profil izražanja genov v listni lamini krompirjev sorte 'Désirée' in genotipa NahG-Désirée. Pri netransgenih rastlinah smo analizirali tako spodnje kot zgornje liste, medtem ko smo pri rastlinah NahG-Désirée analizirali le spodnje liste. Rastline so bile tretirane in vzorčene kot je opisano v poglavju 3.2.1.

Hibridizacija ter branje signalov vzorcev so bili opravljeni po postopku vzpostavljenem v IMGM Laboratories GmbH (Nemčija). Uporabili so enobarvni protokol hibridizacije (s Cy-3) in sicer na mikromreži POCI (AMADID 015425) (Kloosterman in sod., 2008) proizvajalca Agilent, katera pokriva 42,034 biološko relevantnih krompirjevih EST zaporedij. 60 nukleotidov dolge oligonukleotide so dizajnirali v okviru krompirjeve iniciative (Potato Oligo Chip Initiative) (Kloosterman in sod., 2008). Za vsak vzorec smo na analizo in hibridizacijo poslali vsaj 1 µg celokupne, očiščene RNA. Surovi podatki so bili analizirali v programu R (R Development Core Team, 2011; version 2.13.2) s pomočjo knjižnic Agi4x44PreProcess (Lopez-romero, 2013) in Limma (Smyth in sod., 2005) v okviru doktorskega dela Žive Ramšak. Ocenili smo kvaliteto signalov in filtrirali signale, ki niso dosegli minimalnih kriterijev kvalitet. Po končani kontroli kvalitete nam je ostalo 37,865 (od začetnih 42,034) prob. Signale mikromrežnih prob smo nato normalizirali z metodo RSN (Lin in sod., 2008).

Rezultate mikromrež smo vložili v bazo podatkov NCBI Gene Expression Omnibus (Barrett in sod., 2009), ki so tako postali javno dostopni preko GEO kode GSE58593 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE58593).

3.2.5.2 Analiza mikromrežnih podatkov

Za detekcijo statistično značilnih razlik v izražanju genov med različnimi pogoji smo uporabili empirično Bayes metodo (Smyth, 2004). Razlike smo opazovali med vzorci slepo inokuliranih in z virusom inokuliranih rastlin krompirja za vsako časovno točko in tip vzorca ('Désirée' spodnji listi, 'Désirée' zgornji listi, NahG-Désirée spodnji listi). Za izbor značilno drugačno izraženih genov smo uporabili t-test (od povprečja virusno okuženih rastlin smo odštevali povprečje kontrol) s popravkom za multiplo testiranje (ang. *false discovery rate*, FDR) (Benjamini in Hochberg, 1995) pri pražni vrednosti FDR-p < 0,05 za vse primerjave in izrise. Set podatkov smo tudi celokupno statistično analizirali z analizo variance. V analizo variance smo vključili naslednje faktorje: genotip, virusna okužba, čas po okužbi. Časovno dinamiko odziva smo analizirali tudi s primerjavo med zaporednimi časovnimi točkami, (npr. 3. dpi proti 1. dpi) ali pa primerjavo na začetno točko (0 dpi).

Funkcionalno analizo statistično značilno izraženih genov smo izvedli s programoma GSEA (ang. Gene Set Enrichment Analysis) (Subramanian in sod., 2005) in MapMan (Thimm in sod., 2004). V analizi smo uporabili anotacijo, ki je specifično pripravljena za krompir, in tako gene povezali z njihovo biološko vlogo (Rotter in sod., 2007). GSEA razvrsti gene po velikosti njihovega izražanja in določi, koliko genov metabolne poti ali genske skupine se pojavi na določenem delu seznama oziroma katere skupine genov so obogatene. Analizirali smo ontološke kategorije (BIN) velikosti med 20 in 400 geni/kategoriji ter za pražno vrednost uporabili FDR q \leq 0,05. Tako smo se izognili artefaktom. Sezname statistično značilno izraženih genov smo analizirali in vizualizirali tudi s programom MapMan. MapMan obenem omogoča statistično analizo (Wilcoxonov test), ki oceni statistično značilnost sprememb izražanj genov določenega BIN proti vsem BIN (Usadel in sod., 2006).

3.2.6 Meritve vsebnosti klorofila ter fotosintetske aktivnosti

Pri ugotavljanju vsebnosti klorofila v listih smo uporabili napravo SPAD-502 klorofilmeter (Minolta, Japonska). Merjenje vsebnosti klorofila s SPAD-502 klorofilmetrom je nedestruktivna metoda, površina, ki jo potrebujemo za izvedbo meritve je lahko zelo majhna (2x3 mm), zato lahko meritve izvajamo tudi na manjših listih. Naprava SPAD-502 vsebuje dva vira svetlobe (650 in 940 nm) in detektor, ki meri prepustnost svetlobe skozi list. Ključno je, koliko svetlobe krajše valovne dolžine v listu absorbira klorofil. Izmerjene vrednosti (t.i. SPAD vrednosti) so ocena vsebnosti klorofila. Na vsaki rastlini smo izmerili vrednosti vsebnosti klorofila na treh mestih, zabeležili pa povprečje teh vrednosti.

Za izvajanje meritev ostalih parametrov fotosinteze smo uporabili prenosni merilni sistem LiCor-6400 (LI-COR Biosciences, Lincoln, ZDA), ki meri CO2 s pomočjo infra-rdečega plinskega analizatorja – IRGA (Vodnik praktične vaje, 2001, Teize). V merilno komoro smo zaprli list in dovajali zrak z znano koncentracijo CO2 in vlažnostjo. Izračuni neto fotosinteze, transpiracije in prevodnosti listnih rež slonijo na meritvah razlik koncentracije ogljikovega dioksida in vode med referenčno celico in vzorčno celico. Meritve smo izvedli v pogojih, ki so ustrezali rastnim pogojem (gostota pretoka fotonov 125 µmol m-2 s-1, T=25°C, koncentracija ogljikovega dioksida 700 µmol CO₂ mol-1 ter relativna vlažnost 65%-75%). Prenosni merilni sistem LiCor-6400 smo pritrdili na stojalo na polici rastne komore in tako omogočili meritve, ne da bi bilo treba rastline premakniti iz rastne komore. Posamezno meritev smo zaključili, ko je bila dosežena stabilna razlika

med koncentracijo CO₂ v zraku, ki je bil v kiveto dovajan in zrakom, ki je izstopal iz kivete. Za tem je bil isti list osvetljen s saturacijskim svetlobnim pulzom, fluorometer na glavi merilne kivete pa je izmeril oddano svetlobo. Na ta način smo dobili podatke o potencialni (Fv/Fm) in dejanski fotokemični učinkovitosti (Fv'/Fm') merjenega lista. Podatki o neto fotosintezi (Pn), prevodnosti listnih rež (gs), transpiraciji (E) in hitrost transporta elektronov po tilakoidi (ETR) so bili zajeti v istem trenutku. Meritve vsebnosti klorofila ter fotosintetske aktivnosti so potekale v sodelovanju s skupino prof. dr. Dominika Vodnika oddellka za agronomijo Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani.

3.2.7 Spremljanje kopičenja kaloze

Rastline krompirja 'Désirée', NahG-Désirée in Désirée coi1-RNAi smo gojili in inokulirali kot je opisano v poglavju 3.1. Kalozo smo vizualizirali z barvilom anilin modrim fluorokromom (Biosupplies, Australia). Barvilo smo injicirali v žive krompirjeve liste s pomočjo infiltracije z brizgo na dan opazovanja in do opazovanja liste hranili v raztopini anilin modrega. Vzorce smo pregledali s pomočjo konfokalnega mikroskopa Leica TCS-SP5 (Kemijski inštitut, Ljubljana), pridobljene slike pa analizirali s programom LAS-AF-lite (Leica).

3.2.8 Izgradnja modela signalizacije imunskega odziva pri rastlinah

V model, ki opisuje imunski odziv rastlin na virusno okužbo smo združili znanja o metabolnih poteh, transkripcijski regulaciji, in signalizacijskih poteh ter tako ustvarili model v obliki usmerjenega omrežja. Osredotočili smo se na omrežja treh glavnih fitohormonov, vključenih v odziv rastline na virusno okužbo: SA, JA in ET. V omrežje smo vključili komponente biosintezne poti fitohormonov, njihove regulatorne poti, komponente in reakcije vključene v percepcijo hormona ter genske regulatorne poti, ki so pod vplivom dotičnega fitohormona.

Za izgradnjo modela smo uporabili razširjen formalizem petri mrež (hibrid functional petri nets-HFPN) (Hawari in Mohamed-Hussein, 2010). Petri mreže so grafični in matematični formalizem, ki predstavlja komponente in interakcije med njimi z vozlišči. Razširjena verzija petri mrež, ki smo jo uporabili (HFPN) omogoča tako grafično reprezentacijo komponent in njihovih interakcij kot tudi dinamično modeliranje.

Omrežje smo definirali z vozlišči (molekularnimi komponentami) ter povezavami med njimi (reakcijami). Komponente smo razdelili v štiri skupine: majhne molekule oziroma metabolite, proteine, gene ter proteinske komplekse. Reakcije pa smo razdelili med naslednje tipe: izražanje genov, aktivacija proteinov, fosforilacija proteinov, kataliza,

translokacija, vezava proteina na gen, vezava proteina na protein, defosforilacija proteinov, inhibicija proteinov, represija genov in degradacija. Za namen preglednejše vizualizacije in poenostavitev modela smo uvedli hierarhijo na nivoju vozlišč in povezav.

Model smo vizualizirali s programi Cell Illustrator (Nagasaki in sod., 2011) in Bio3graph metodo, ki smo jo razvili. Dinamično modeliranje s simulacijami smo izvedli s pomočjo programa Cell Ilustrator. Vsako vozišče reakcije smo definirali z enostavno diferencialno enačbo (ODE) masne kinetike, tako da je je bilo nastajanje produkta odvisno od količine substrata/substratov ter reakcijske hitrostne konstante. S pomočjo simulacij smo izvedli preliminarne študije kinetičnega modeliranja in optimizacije parametrov. Variirali in optimizirali smo koncentracije vstopnih komponent, hitrostne konstante ter pražne vrednosti inhibitornih povezav.

3.2.8.1 Ekstrakcija in integracija podatkov iz literature in baz metabolnih poti

Model signalizacije imunskega odziva pri rastlinah smo izgradili na podlagi znanj o odzivu navadnega repnjakovca na virusno okužbo (TCV, Turnip Crinkle Virus). Za izgradnjo omrežja smo uporabili informacije iz literature (znanstveni članki, pregledna literatura, strokovne publikacije) in podatkovnih baz. Podatkovna baza KEGG (Kanehisa in sod., 2012) nam je služila za izgradnjo metabolnega dela omrežja ter biosinteze hormonov. Podatkovno bazo TAIR (Lamesch in sod., 2012) smo uporabili za anotacijo genov, informacijah o vključenosti v specifične reakcije, določevanje aktivnih domen proteinov, regulatorne principe izražanja genov itd. V model smo vključili tudi podatke iz baze AraCyc (P. Zhang, 2005) ter PMN (Chae in sod., 2012) in podatkovne baze iHOP (Fernández in sod., 2007).

Komponente smo opisali s kratkimi imeni, njihovimi, opisi ter sinonimi. V primeru genov in proteinov smo komponente opisali tudi s pripadajočimi genskimi identifikatorji. Podatke smo pridobili iz podatkovnih baz TAIR (Lamesch in sod., 2012), iHOP (Fernández in sod., 2007) in NCBI (Sayers in sod., 2011).

3.2.8.2 Bio3graf metoda

Manualno izgrajeno omrežje smo nadgradili s pomočjo polavtomatske metode za tekstovno rudarjenje Bio3Graf (Miljkovic in sod., 2012), ki smo jo v ta namen razvili. Le-ta sestoji iz korakov tekstovnega rudarjenja, ekstrakcije informacije ter vizualizacije povezav v obliki grafa. Iz literature poišče in izvleče informacije o interakcijah med molekulami, t.i. triplete (komponenta-reakcija-komponenta) ter jih vizualizira v obliki

omrežja. Metodo smo za razvili v sodelovanju z Inštitutom Jožef Štefan, Oddelek za tehnologije znanja.

Ekstrakcija tripletov temelji na slovarju. Slovar komponent je vseboval vse komponente modela, nadgrajene s sinonimi, ki smo jih določili glede na informacije iz podatkovnih baz TAIR (Lamesch in sod., 2012), iHOP (Fernández in sod., 2007) in NCBI (Sayers in sod., 2011). Pripravili smo tudi tri slovarje reakcij (aktivacija, inhibicije in vezave). Definirali smo različne sinonime uporabljene v pisnem jeziku za vsako od reakcij. Glagole smo definirali tako v tvornem kot trpnem glagolskem načinu.

Bio3Graf metodo smo validirali z manualno anotacijo 50 biološko relevantnih člankov, ki nam je služila kot referenca pravilno označenih tripletov. Rezultate smo primerjali z avtomatsko Bio3Graf ekstrakcijo tripletov. Triplete smo validirali in označili kot (TP), kadar so bili avtomatski tripleti pravilno ekstrahirani, tehnično pravilne vendar biološko negativne (TN) in lažno pozitivne (FP). Vsota pravilno pridobljenih in biološko negativnih vendar tehnično pravilnih tripletov (TP+TN) je enaka številu manualno anotiranih tripletov. Vsota pravilno ekstarahiranih ter lažno pozitivnih tripletov (TP+FP) predstavlja vse triplete ekstrahiranie z Bi3Graf metodo ne glede na to ali so pravilni ali ne. Uspešnost metode smo ovrednotili z izračunom vrednosti 'točnosti' in 'občutlivosti'.

Definirali smo množico ključnih besed, ki opisuje rastlinski odgovor na patogene (virusno okužbo) in jo uporabili za pridobitev relevantnih bioloških publikacij. Članke smo pridobili iz baze prosto dostopne znanstvene literature PubMed Central. Pridobljeni članki so nam služili za vir teksta iz katerih smo v obliki tripletov ekstrahirali nove povezave med komponentami modela, ter potrdili že obstoječe interakcije.

3.2.8.3 Nadgradnja modela s proteinskimi interaktorji

V naslednji točki smo model nadgradili s pomočjo interaktoma navadnega repnjakovca (Consortium, 2011). Proteine v modelu smo povezali z njihovimi interaktorji - proteini ki se na njih vežejo in tako regulirajo njihovo delovanje. S pomočjo baze TAIR smo določili gene, ter genske identifikatorje, ki kodirajo za identificirane proteine. ki zanje kodirajo. Tako smo dobili informacijo o dodatnem nivoju regulacije komponent in reakcij omrežja.

3.2.8.4 Prenos modela iz navadnega repnjakovca na krompir

V naslednji fazi smo omrežje prenesli iz modelne rastline navadnega repnjakovca na krompir prek ortologov s pomočjo aplikacije GoMapMan (Ramšak in sod., 2014). Novo nastalo omrežje smo opisali s krompirjevimi genskimi identifikatorji, ki smo jih povezali z identifikatorji krompirjevih transkriptov POCI (Potato Oligo Chip Initiative) (Kloosterman in sod., 2008). Identifikatorjem POCI smo pripisali njihove vrednosti izražanja v spodnjih listih krompirja 'Désirée' in NahG-Désirée 1., 3., 4., 5. in 7. dan po inokulaciji ter v zgornjih listih krompirja 'Désirée' 1., 3., 4., 5., 7., 8. in 11. dan po inokulaciji. To nam je omogočilo direktno povezavo z mikromrežnimi podatki o izražanju krompirjevih genov. Vrednosti smo prikazali kot logaritem količnika med vrednostmi izražanja v virusno inokuliranih listih ter slepo inokuliranih listih (log₂FC). Za določitev funkcije in procesov v katerih sodelujejo geni pripadajoči mikromrežnimi identifikatorjem POCI smo le te povezali z ontologijo MapMan. Tako smo lahko genske opise pridobljene iz različnih virov (MapMan, POCI description, TAIR description, PGSC description) med seboj integrirali in primerjali.

3.2.9 Bioinformatske analize

Analiza komponent modela v povezavi s podatki o profilu izražanja genov skozi čas po okužbi (mikromreže) nam je služila za identifikacijo novih kandidatnih genov za iskanje ključnih modulatorjev imunskih odgovorov rastline na virusno okužbo. Rezultate izražanja genov (Poglavje 4.3.3.3) smo povezali z modelom signalizacijskih poti, ki smo ga zgradili. Transkripte s statistično značilnim diferencialnim izražanjem smo natančneje analizirali. Izbranim oligonukleotidom POCI smo s pomočjo algoritma BLAST (J. Zhang in Madden, 1997) poiskali tarčna zaporedja v bazah krompirjevih zaporedij PGSC (Xu in sod., 2011), oziroma iTAG (The Tomato Genome Consortium, 2012) ter StGI (Potato Gene Index) in jim z uporabo podatkovnih baz GenBank in UniProt (The UniProt Consortium, 2014) identificirali pripadajoče gene ter njihovo anotacijo. Identificirana krompirjeva nukleotidna zaporedja, ki predstavljajo celo ali delno cDNA določenega gena ali genske ortoskupine, smo sestavili v soseske s programom ContigExpress (Thermo Fisher Scientific). Zaporedja smo med seboj poravnali ter določili tarčni gen s pripadajočimi anotacijami za vsak izbran identifikator POCI.

Za sekvenčne analize v različnih stopnjah dela, smo uporabili program CLC Bio Main Workbench (Qiagen, ZDA).

3.2.9.1 Načrtovanje oligonukleotidnih začetnikov in sond za PCR v realnem času

Kot osnovo za konstruiranje oligonukleotidnih začetnikov smo uporabili nukleotidno poravnavo pripadajočih sekvenc unigenov. Za načrtovanje amplikonov smo izbrali odseke poravnav vsakega gena ozirom ortogenske skupine, ki so bili pokriti z več zaporedji transkriptov in hkrati dovolj ohranjeni, da so omogočali načrtovanje enoličnih amplikonov s kemijo TaqMan. V kolikor je bilo mogoče, smo za načrtovanje amplikonov izbrali odseke, na katerih so bile načrtovane oligonukleotidne sonde mikromrež POCI (Kloosterman in sod., 2008), za lažjo primerjavo rezultatov med obema metodama. Določili smo tudi regije s nukleotidnih polimorfizmov, ki smo se jih pri načrtovanju izogibali. Nove amplikone smo načrtovali s programom Primer Express (Applied Biosystems, ZDA) in sintezo naročili pri podjetju IDT (Integrated DNA Technologies, ZDA).

3.2.9.2 Načrtovanje plazmidnih vključkov za prehodno utišanje

Z bioinformatsko analizo smo poiskali del zaporedja gena StSAPK8 primernega za utišanje s pomočjo siRNA. Specifičnost izbranega zaporedja smo preverili z algoritmom BLAST (J. Zhang in Madden, 1997), kjer smo izbrani del prilegali na krompirjeve transkripte nukleotidnih baz PGSC (Potato genome sequencing consortium, 2011) ter POCI (Potato Oligo Chip Initiative) (Kloosterman in sod., 2008). Dolžina izbranega zaporedja je morala biti med 400-800 nukleotidov. Za kloniranje izbranega dela zaporedja smo naročili sintetično izbrano zaporedje, vstavljeno v vstopni vektor pENTRTM4 Dual (Thermo Fisher Scientifice) (Slika 7). Zaporedje je bilo sintetizirana s pomočjo tehnologije GenART (Life technologies) ter vstavljeno v plazmid preko NcoI in EcoRV restrikcijskih mest. Ta sistem omogoča usmerjeno kloniranje DNA zaporedja v vstopne vektorje, ki so kompatibilni z Gateway® sistemom kloniranja (Karimi in sod., 2002).

3.2.9.3 Analiza proteinskih zaporedij

Z algoritmom tBLASTx (Altschul in sod., 1990) smo celotnim nukleotidnim zaporedjem kinaz in fosfataz iz krompirja poiskali sorodna zaporedja iz navadnega repnjakovca. Gene smo poimenovali z imeni njihovih ortologov v navadnem repnjakovcu. Dodatno smo raziskali tudi baze NCBI (angl. "National Center for Biotechnology Information"), UniProt (angl. "Universal Protein Resource"), "Plant GDB", "Potato Oligo Chip Iniciative" (POCI), "The Gene Index Project" in "TIGR Plant Transcripts Assemblies" (Childs in sod., 2007).

Analizo ortolognih skupin v navadnem repnjakovcu in krompirju smo izvedli s pomočjo aplikacije GoMapMan (Ramšak in sod., 2014).

Aminokislinske poravnave smo izvedli s pomočjo algoritma MUSLE v programu CLC Bio Main Workbench (Qiagen, ZDA). Z metodo "Neighbour joining" (NJ) smo na podlagi aminokislinskih poravnav konstruirali filogenetska drevesa. Podporo filogenetskega drevesa smo izračunali z metodo "Bootstrap" s tisoč ponovitvami. Zaporedja krompirja in navadnega repnjakovca smo poravnali v programu AlignX (Vector NTI, Thermo Fisher Scientific).

Na podlagi objave Kulik in sodelavci (Kulik in sod., 2011), smo proteinsko zaporedje krompirjevih genov StSAPK8 primerjali s proteinskim zaporedjem navadnega repnjakovca in določili funkcionalne domene proteina potrebne za odziv rastline na osmotski stres ter hormona ABA.

3.2.10 Funkcionalne analize

3.2.10.1 Rekombinacija Gateway® in transformacija bakterije E. coli

Za kloniranje sintetičnega fragmenta gena smo uporabili sistem Gateway®, ki predstavlja strnjen protokol za kloniranje tarčnega zaporedja v bakterijo *A.tumefaciens* brez uporabe restrikcijskih encimov. Metoda temelji na osnovi mestno specifične rekombinacije bakteriofaga λ in je uporabna tudi za doseganje transformiranih rastlinskih linij s posrednim vnosom T-DNA z bakterijo *A. tumefaciens*, ko je potrebno gen klonirati v večje plazmide (5 do13 kb). Želeni gen z rekombinacijo Gateway® vstavimo med mesti attR1 in attR2 ter z njim zamenjamo gen, ki kodira za toksičen protein (gen ccdB), kar ob transformaciji plazmidne mešanice v bakterijo *E. coli*, sev OmniMAXTM preprečuje rast bakterij, ki vsebujejo nezrekombiniran plazmid.

S kompletom Gateway® LR ClonaseTM II Enzyme Mix (Thermo Fisher Scientific) smo po navodilih proizvajalca v rekombinazni reakciji prenesli izbran konstrukt za utišanje (hairpin_StSAPK8,) iz pENTRTM4 plazmida v binarni plazmid PH7GWIWG2(II). PH7GWIWG2(II) (Slika 8) je binarni vektor kar pomeni, da ga lahko pomnožujemo tako v bakteriji *E. coli* kot v bakteriji *A. tumefaciens* (Karimi in sod., 2002). Plazmid je kompatibilen z Gateway® sistemom kloniranja in omogoča prehodno utišanje genov preko transformacije z Agrobakterijo.

Z rekombinacijsko mešanico smo po navodilih proizvajalca transformirali kemijsko kompetentne celice OmniMAXTM T1 Phage-Resistant *E. coli* (Thermo Fisher Scientific)

in jih selekcionirali na selekcijskih ploščah LB s spektinomicinom (75 μ g/mL) in kloramfenikolom (50 μ g/mL).

3.2.10.2 Izolacija plazmida iz bakterije *E. coli* in sekvenciranje

Bakterije smo namnožili čez noč pri 37 °C v tekočem LB gojišču z antibiotikom. Naslednji dan smo iz njih izolirali plazmide z insertom. Za izolacijo plazmida smo uporabili komplet reagentov Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) in sledili navodilom proizvajalca. Uspešnost izolacije in čistost produkta smo preverili na 1% agaroznem gelu in ter koncentracijo izmerili s pomočjo spektrofotometra NanoDrop (metodi opisani v poglavju 3.2.3).

Izolirane plazmide smo poslali podjetju GATC Biotech v sekvenciranje. Pridobljena zaporedja različnih insertov smo primerjali s pričakovanim zaporedjem, da bi izločili klone z morebitnimi napakami v zaporedju inserta, ki so nastale pri pomnoževanju. Uporabili smo več oligonukletidov začetnikov, da bi preverili, če je zaporedje pravilno.

Ko smo potrdili pravilno sekvenco vstavljenega konstrukta smo pripravili tudi trajne bakterijske kulture z vnešenim plazmidom v 30 % glicerolu in jih shranili na -80 °C.

3.2.10.3 Vnos vektorja v agrobakterijo (A. tumefaciens)

Plazmid PH7GWIWG2(II)_hairpinStSAPK8 smo elektroporirali v ElectroMAXTM celice bakterije *A. tumefaciens* seva GV3101 (Thermo Fisher Scientific) po navodilih proizvajalca s pomočjo Eppendorf 2510 elektroporatorja. V epruvetko s kompetentnimi celicami smo dodali 1 µl plazmida PH7GWIWG2(II)_hairpinStSAPK8 in mešanico prenesli v ohlajeno kiveto. Elektroporirali smo pri pogojih 2kV, 200Ω in 25µF s časom izpostavljenosti 4-6 milisekund. Takoj po elektroporaciji smo dodali 1 ml gojišča YM in suspenzijo prenesli v centrifugirko. Bakterijsko suspenzijo smo inkubirali 3 ure pri 30 °C na stresalniku (225 rpm). Po končani inkubaciji smo suspenzijo bakterij enakomerno razmazali na selekcijsko gojišče YM s spektinomicinom (75 µg/mL), kloramfenikolom (50 µg/mL) in rifampicinom (20 µg/ml). Bakterije smo gojili pri 30 °C dva dni (48h). Uspešno transformirane bakterije smo čez noč pri 30 °C namnožili v tekočem LB gojišču s spektinomicinom (75 µg/mL), kloramfenikolom (50 µg/mL) in rifampicinom (20 µg/mL). Te bakterije smo shranili v trajnih kulturah v 25 % glicerolu pri -80 °C in jih kasneje uporabili za transformacijo rastlin.

3.2.10.4 Prehodna transformacija rastlin krompirja

Uspešno transformirane agrobakterije ter agrobakterije brez plazmida smo zjutraj nacepili v 5 ml tekočega gojišča LB z antibiotiki; spektinomicinom (75 µg/mL), kloramfenikolom (50 µg/mL) in rifampicinom (20 µg/mL) ter jih namnožili pri 28 °C, 250 rpm. Po 12 h smo 500 µl namnožene bakterijske kulture prestavili v sterilne elernmajerice z 50 ml LB tekočega gojišča z antibiotiki in jih čez noč gojili pri 28 °C, 250 rpm. Naslednje jutro smo spremljali njihovo rast z meritvami optične gostote OD₆₀₀. Ko je bila bakterijska rast v eksponencialni fazi (0,4 < OD₆₀₀ > 0,8) smo kulturo prestavili v centrifugirke in centrifugirali 10 min pri 4500 g in 4 °C ter odstranili ostanke gojišča. Bakterije smo resuspendirali v 10 ml tekočega gojišče ter resuspendirali v takšnem volumnu pufra MMA, da smo je imela končna bakterijska suspenzija optično gostoto OD₆₀₀ = 0,5 (cca 5-10 ml). Suspenzijo smo inkubirali na sobni temperaturi 2 h.

Krompirje stare 4 tedne, gojene pri pogojih opisanih v poglavju 3.1 smo agroinfiltrirali, tako da smo list najprej prebodli z iglo, nato pa s pomočjo brizge vnesli bakterijsko suspenzijo v medcelični prostor lamine. Vsakič smo polovico lista infiltrirali z agrobakterijo brez konstrukta, drugo polovico pa z agrobakterijo z vstavljenim plazmidom za utišanje (PH7GWIWG2(II)_hairpinStSAPK8).

Četrti dan po agroinfiltraciji smo rastline inokulirali z virusom (PVY^{NTN}) oziroma s sokom zdravih rastlin (poglavje 3.2). Rastline smo vzorčili 7. dan po agroinfiltraciji, tako da smo izrezali del lamine, ki je bila agroinfiltrirana in jo pri priči zamrznili v tekočem dušiku. Vzorce smo do nadaljnje analize hranili v zamrzovalniku na -80 °C.

3.2.10.5 Pomnoževanje tarčnega gena s PCR

Za matrično DNA za pomnoževanje izbranih genov smo izbrali cDNA krompirja sorte 'Désirée'. Tarčne gene smo pomnožili z verižno reakcijo s polimerazo (PCR). Uporabili smo polimerazo Velocity (Bioline) in končni volumen reakcijske zmesi vsakokrat poenotili na 10 µl. Vsaka reakcijska mešanica je vsebovala 1x HiFi pufer (vsebuje 10 mM Mg2+; Bioline), 500 µM raztopino dNTP-jev, 0,9 µM vsakega od oligonukleotidnih začetnikov in 0,5 enote DNA-polimeraze Velocity (Bioline). Uporabili smo aparaturo za PCR, GenAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems). Verižna reakcija s polimerazo je potekala po sledečem programu:

Preglednica 4: Pogoji pomnoževanja genov s PCR. Table 4: Conditions of gene amplification with PCR.

Progr	am (temperatura in čas)		Opis programa
98 °C	2 minuti		začetna denaturacija
98 °C	30 sekund		denaturacija
55 °C	30 sekund	30 ciklov	prileganje začetnih oligonukleotidov
72 °C	1,5 minute		podaljševanje verige
72 °C	5 minut		končno podaljševanje verige
4 °C			inkubacija po končani reakciji

Prisotnost in dolžino pomnoženih fragmentov smo preverili na 1 % agaroznem gelu (poglavje 3.2.3). Produkte pravilnih dolžin smo izrezali iz gela in očistili s kompletom Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) po navodilih proizvajalca. Očiščene produkte PCR smo uporabili za kloniranje v plazmid.

PCR produkte smo vstavili v plazmidni vektor pGEM (Slika 9) s pomočjo kompleta reagentov pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega). Z nastalimi plazmidi rekombinantnimi (pGEM SAPK, pGEM StPK11, pGEM StPP2C, pGEM StAVR9) smo po navodilih proizvajalca transformirali kemijsko kompetentne celice E. coli seva One Shot® TOP 10 (Thermo Fisher Scientific). V epruveto s 50 µl kompetentnih celic smo dodali 2 µl plazmida in mešanico na ledu inkubirali 30 minut. Nato smo celice prenesli za 30 sekund v vodno kopel s temperaturo 42 °C in jih tretirali z vročinskim šokom. Po šoku smo celice takoj prenesli nazaj na led in jim dodali 250 µl S.O.C. medija (Thermo Fisher Scientific) in epico inkubirali na 37 °C v inkubatorju s stresanjem (250 rpm). Suspenzijo bakterij smo nato enakomerno razmazali na selekcijsko gojišče LB (10 g/l bakto triptona, 5 g/l kvasnega ekstrakta, 5 g/l NaCl, 15 g/l agarja) z ampicilonom (100 µg/ml) ter plošče inkubirali na preko noči na 37 °C.

Zrasle kolonije smo precepili v tekoče gojišče LB z ampicilinom (100 µg/ml), jih namnožili s stresanjem preko noči pri temperaturi 37°, naslednji dan pa smo iz njih izolirali plazmide s kompletom reagentov GenElute[™] Plasmid Miniprep Kit (Sigma) po navodilih proizvajalca. Izoliranim plazmidom smo izmerili koncentracijo (poglavje 3.2.3), ter jih poslali podjetju GATC Biotech na sekvenciranje. Tako smo preverili pravilno zaporedje vstavljenega gena.

3.2.10.6 Prekloniranje v druge plazmidne vektorje

Izolirane plazmide (pGEM_SAPK, pGEM_StPK11, pGEM_StPP2C, pGEM_StAVR9) smo uporabili za matrico za pomnoževanje z reakcijo PCR. Načrtali smo oligonukletidne

začetnike, tako da je del zaporedja nalegal tarčni gen (StSAPK8, StPK11C, StPP2C oziroma Avr) drugi del pa se je prilegal destinacijskemu vektorju (pGBKT7 oziroma pGADT7) (Slika 10). Za pomnoževanje smo uporabili polimerazo Phusion®High-Fidelity (New England Biolabs®). Vsaka reakcijska mešanica je vsebovala 1x Phusion HF pufer (vsebuje 10 mM Mg^{2+;} New England Biolabs®), 250 µM raztopino dNTP-jev, 0,5 µM vsakega od oligonukleotidnih začetnikov in 0,3 enote polimeraze Phusion®High-Fidelity (New England Biolabs®). Uporabili smo aparaturo za PCR GenAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems). Verižna reakcija s polimerazo je potekala po sledečem programu:

Preglednica 5: PCR za pripravo fragmentov za prekloniranje.

Program (temperatura in čas)		Opis programa
98 °C 2 minuti		začetna denaturacija
98 °C 30 sekund		denaturacija
65 °C* 30 sekund	15 ciklov	prileganje začetnih oligonukleotidov
72 °C 1 minuta / kbp		podaljševanje verige
98 °C 30 sekund		denaturacija
50 °C 30 sekund	20 ciklov	prileganje začetnih oligonukleotidov
72 °C 1 minuta / kbp		podaljševanje verige
72 °C 5 minut		končno podaljševanje verige
4 °C		inkubacija po končani reakciji

Table 5: PCR for cloning fragments.

*v vsakem ciklu je bila temperatura prileganja oligonukleotidnih začetnikov za 1 °C nižja

3.2.10.7 Dvohibridni sistem kvasovke (Y2H)

Interakcije med dvema proteinoma smo analizirali s pomočjo dvohibridnega sistema kvasovk (Y2H) in uporabo Matchmaker GAL4 (Clonetech) kompleta reagentov v okviru postdoktorskega projekta Anne Coll na Nacionalnem inštitutu za biologijo. Kvasovke seva Y2H Gold smo transformirali z vektorjem, ki vsebuje protein vabe (pGBKT7) (in transformate izbrali s pomočjo SD/-Leu selekcijskega gojišča. Nadaljnje smo jih kotransformirali z vektorjem , ki vsebuje protein plena (pGADT7). Kotransformante smo izbrali na selekcijskem gojišču SD/-Leu/-Trp (DDO), pozitivne interakcije pa na gojišču SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade/x-a-Gal/Aba (QDO/X/A) po navodilih proizvajalca. V analizo smo vključili tudi pozitivno (pGBKT7_T-pGADT7_53) in negativno (pGBKT7_T-pGADT7_Lam) kontrolo interkacije. Metoda nam je omogočila identifikacijo proteinskih interaktorjev.

4 REZULTATI

4.1 MODEL SIGNALIZACIJSKIH POTI IMUNSKEGA ODZIVA PRI RASTLINAH

4.1.1 Izbira primernega formalizma za pripravo modela

Ocenili smo uporabnost različnih formalizmov, ki se uporabljajo za modeliranje bioloških sistemov in glede na naše prioritete izbrali najprimernejšega. Želeli smo formalizem, ki intuitivno vizualizira biološke procese, komponente in reakcije, ter ima hkrati možnost kontinuirnega dinamičnega modeliranja reakcij ter koncentracij bioloških komponent. Prav tako smo želeli izbrati formalizem, ki omogoča modeliranje pozitivnih in negativnih povratnih zank. V ta namen smo izbrali formalizem hibridnih funkcionalnih petri mrež (Hybrid functional petri net, HFPN). Formalizem HFPN definira biološke komponente ter reakcije med njimi kot vozlišča povezana z usmerjenimi povezavami. Formalizem je implementiran v programu Cell Illustrator, ki smo ga uporabili za modeliranje.

4.1.2 Ontologija in hierarhija na nivoju komponent in povezav

Definirali smo biološke komponente, ter jih razdelili v skupine: majhne molekule oziroma metabolite (ang. small compound), proteine (ang. protein), gene (ang. gene) ter proteinske komplekse (ang. complex). Za vsako vrsto komponent smo definirali specifično grafično reprezentacijo (Slika 14). Komponente smo povezali med seboj glede na biološke reakcije v katerih sodelujejo. Reakcije smo razdelili med naslednje tipe: izražanje genov (ang. gene expression), aktivacija proteinov (ang. activation), translokacija (ang. transport), vezava (ang. binding), razgradnja (ang. degradation) in inhibicija (ang. inhibiton). Pod aktivacijo smo združili reakcije proteinske aktivacije, fosforilacije in katalize, pod inhibicijo pa inhibicijo aktivnosti proteinov, njihovo defosforilacijo in represijo genov, torej reakcije, ki na različne načine zmanjšajo aktivnost bodisi proteinov oziroma izražanje genov ter posledično zmanjšajo nastajanje produkta.



Slika 14: Tipi bioloških reakcij in komponent ter njihova grafična reprezentacija v modelu. Slika prikazuje različne tipe reakcij (levo) ter komponent (desno).



Tako smo lahko uvedli hierarhijo na nivoju vozlišč in povezav (Slika 15). Zaradi poenostavitve omrežja in lažje vizualizacije smo komponente s podobnimi funkcijami po potrebi združili v družine; na primer proteine JAZ (1-12) smo združili v eno vozlišče imenovano JAZ, ker predvidevamo, da vsi člani družine sodelujejo v isti reakciji. Prav tako smo tipe reakcij na višjem nivoju abstrakcije glede na principe spreminjanje substrata in nastajanje produkta združili v tri skupine: aktivacija, inhibicija in vezava proteina.

V preglednicah 6 in 7 je prikazan primer ovrednotenje principa spreminjanja koncentracije substrata in nastajanja produkta. Preglednici prikazujeta različne variacije osnovnih vhodnih vrednosti in predvidene končne (izhodne) vrednosti. Prikazan je primer dinamičnega modeliranja z diskretnimi vrednosti za dva tipa reakcij: fosforilacije (Preglednica 6) in transporta (Preglednica 7). Ocenili smo obnašanje modela v dveh časovnih točkah; začetni in končni po vzpostavitvi ravnotežja. V reakcijo vstopata po dve vhodni komponenti, na podlagi principa reakcije (foforilacije, transporta) pa predvidimo rezultat, podan v obliki vrednosti izhodne komponente. Vrednosti vhodnih komponent so podane z diskretnimi vrednostmi 0, kar ponazarja neaktivno komponento in 1, vrednost za aktivno komponento. V primeru fosforilacije sta vhodni komponenti neaktiven, defosforiliran protein ter njegova kinaza, izhodna komponenta, pa aktiven fosforiliran protein. V primeru transporta je prva komponenta molekula na eni strani membrane, druga vhodna komponenta transporter in izhodno vozlišče molekula na drugi strani membrane (v celičnem razdelku, kjer lahko aktivno deluje). V obeh primerih smo spremljali kaj se zgodi z vrednostmi vhodnih in izhodnih komponent po času t, ko se

vzpostavi ravnotežno stanje (obarvano s sivo v Preglednica 6 in Preglednica 7). Ker je dinamično obnašanje sistema glede na spreminjanje vrednosti vhodnih in izhodnih vozlišč enako smo ta dva tipa reakcij (fosforilacija in transport) na višjem nivoju abstrakcije združili v isto družino bioloških reakcij imenovano aktivacija (Slika 15A).



Slika 15: Hierarhija reakcij (A) in komponent (B). Figure 15: Reaction (A) and component (B) hierarchy.

Evalvacijo modeliranja bioloških reakcij smo napravili tudi za ostale tipe reakcij. Kadar je model napovedal sorodno obnašanje reakcij, smo jih združili v isto družino reakcij na višjem nivoju 1 (Slika 15). Tako smo pod aktivacijo združili reakcije aktivacije proteina, fosforilacijo proteina, izražanje genov, katalizo in transport. Vezava je ne višjem nivoju abstrakcije združevala vezavo proteina na gen in vezavo med dvema proteinoma, inhibicija pa defosforilacijo proteina, inhibicijo proteina in gensko represijo.

Preglednica 6: Primer ovrednotenje spreminjanja koncentracije substrata in nastajanja produkta v reakciji fosforilacije proteina

Preglednica prikazuje različne variacije vrednosti vhodnih vozlišč (vhodno vozlišče 1, 2) in predvidene končne (izhodno vozlišče) vrednosti. S številkami (1.-8.) so označene različne situacije. Vrednosti vhodnega vozlišča 1 (defosforiliran protein), vozlišča 2 (kinaze), ter izhodnega vozlišča (fosforiliran protein) so podane z diskretnimi vrednostmi: 1-aktivna komponenta, 0-neaktivna komponenta. S sivo so obarvani rezultati reakcije po času t, ko se vzpostavi ravnotežje.

Table 6: Example of estimation of principle of quantitative changes in substrat and product concentration in reaction of protein phosphorylation

Table represents different variations of input values (vhodno vozlišče 1, vhodno vozlišče 2) and predicts final output values (izhodno vozlišče). Numbers (1.-8.) denote different situations. Input values for component 1 (dephosphorylated protein), component 2 (kinase) and output node (phosphorylated protein) are represented with discrete numbers; 1-active component, 0-inactive component. Grey coloring denotes result of the reaction after time t (steady state).

		Vhodno vozlišče 1 (neaktivni, defosforilirani protein)	Vhodno vozlišče 2 (aktivator kinaza)	Izhodno vozlišče (aktivni, fosforilirani protein)
Različna začetna	1.	0	0	0
stanja (t_0)	2.	1	0	0
	3.	1	1	1
	4.	0	1	0
	5.	0	0	1
	6.	0	1	1
	7.	1	1	0
	8.	1	0	1
Ravnotežna stanja,	1.	0	0	0
ki ustrezajo začetnim	2.	1	0	0
stanjem po regulaciji	3.	0	1	1 (2)
(t_ravnotežno)	4.	0	1	0
	5.	0	0	1
	6.	0	1	1
	7.	0	1	1
	8.	1	0	1
Preglednica 7: Primer ovrednotenje spreminjanja koncentracije substrata in nastajanja produkta (diskretne vrednosti) v reakciji transporta molekul

Preglednica prikazuje različne variacije vrednosti vhodnih vozlišč (vhodno vozlišče 1, 2) in predvidene končne vrednosti izhodnega vozlišča. S številkami (1.-8.) so označene različne situacije. Vrednosti vhodnega vozlišča 1 (molekula ne eni strani membrane), vozlišča 2 (transporter), ter izhodnega vozlišča (molekula na drugi strani membrane) so podane z diskretnimi vrednostmi: 1-aktivna komponenta, 0- neaktivna komponenta. S sivo so obarvani rezultati reakcije po vzpostavitvi ravnotežja.

Table 7: Example of estimation of principle of quantitative changes in substrate and product concentration (discrete values) in reaction of molecule transport

Table represents different variations of input values (vhodno vozlišče 1, vhodno vozlišče 2) and predicts final output values (izhodno vozlišče). Numbers (1.-8.) denote different situations. Input values for component 1 (molecule on one side of the membrane), component 2 (transporter) and output node (transported molecule on the other side of the membrane) are represented with discrete numbers; 1-active component, 0-inactive component. Grey coloring denotes result of the reaction after time t (steady state).

		Vhodno vozlišče 1 (molekula na eni strani membrane)	Vhodno vozlišče 2 (transporter)	Izhodno vozlišče (molekula na drugi strani membrane)
Različna začetna	1.	0	0	0
stanja (t_0)	2.	1	0	0
	3.	1	1	1
	4.	0	1	0
	5.	0	0	1
	6.	0	1	1
	7.	1	1	0
	8.	1	0	1
Ravnotežna stanja,	1.	0	0	0
ki ustrezajo začetnim	2.	1	0	0
stanjem po regulaciji	3.	0	1	1 (2)
(t_ravnotežno)	4.	0	1	0
	5.	0	0	1
	6.	0	1	1
	7.	0	1	1
	8.	1	0	1

4.1.3 Izgradnja modela v Cell Illustratorju

Izgradili smo model, ki opisuje signalizacijo imunskega odziva pri rastlinah. Osredotočili smo se na ključne komponente signalne poti SA, JA in ET. Vsak model smo izgradili posebej končno pa vse modele povezali preko komponent, ki povezujejo različne podmodele med seboj. V naslednjih poglavjih je prikazana vizualizacija vseh treh manualno zgrajenih modelov s programom Cell Illustrator. Definirali smo ključne komponente obrambnega odgovora in interakcije med njimi. Informacije o komponentah in reakcijah smo pridobili iz literature in podatkovnih baz, ter jih združili v model signalizacijskih poti imunskega odziva pri rastlinah, kot je opisano v poglavju 3.2.8.

Prvo verzijo modela je sestavljalo 116 komponent povezanih z 148 reakcijami na nivoju genskih družin (nivo 2, Slika 15). Razširjen model na nivoju 3 hierarhičnega združevanja komponent (Slika 15) pa je bil pisan z 175 komponentami in 387 povezavami. Sledeče vizualizacije so zaradi boljše preglednosti prikazane na višjem, ne razširjenem nivoju (Slika 15), tabela ki ponazarja združevanje komponent v družine je prikazana v prilogi (Priloga B).



Slika 16: Model signalizacijskih poti imunskega odziva pri navadnem repnjakovcu

Model opisuje signalizacijske poti treh ključnih hormonov pri rastlinskem imunskem odzivu; signalizacijske poti SA, JA in ET. Komponente so povezane z usmerjenimi povezavami, ki ponazarjajo interakcije (reakcije) med njimi. Molekule podobnih funkcij so družene v družine na nivoju 2 (Slika 15) in ponazorjene s skupnim vozliščem.

Figure 16: Arabidopsis plant defense signaling model

Arabidopsis plant defense signaling model describing signaling pathways of three crucial phytohormones in plant immune response; signaling pathway of SA, JA and ET are shown with crosstalk interactions. Components are connected with directed relations, representing interactions (reactions) between them. Molecules with similar function are merged into families on the level 2 (Figure 15) and represented with a single node.

4.1.4 Shema modela salicilne kisline

Sinteza SA v rastlinah poteka preko dveh poti, obe pa za substrat potrebujeta horizmat (Vlot in sod., 2009), ki je zadnji produkt šikimatne poti. Prva pot poteka preko več zaporednih encimskih reakcij, kjer v prvi stopnji encim CM (horizmat mutaza) pretvori horizmat v prefanat (prephenate). Identificirali smo tri različne mutaze navadnega repnjakovca (CM1, CM2 in CM3), ki lahko sodelujejo v reakciji. Prefanat se pretvori v aminokislino fenilalanin preko dveh sledečih si encimskih reakcij pri kateri gre najprej za prenos amino skupine s pomočjo encima prefanat amitotransferaze v naslednji stopnji pa encim arogenat dehidrataza tvori fenilalanin. Liaza PAL (ang. phenylalanine ammonia

lyase) je ključna v tej biosintezni poti in pretvori fenilalanin v trans-cimetovo kislino (ang. trans-cinnamic acid) in amonijak preko neoksidativne deaminacije. Trans-cimetova kislina je prekurzor za različne fenolne spojine v navadnem repnjakovcu, vse od ligninov do lignanov, flavonoidov (uv- absorbirajoče komponente, antioksidanti in antimikrobne spojine), lahkohlapne estre in benzoilglukozinolate. Torej odstranitev fenilalanina iz bazena aromatskih aminokislin za tvorbo trans-cimetove kisline služi kot ključni regulator med primarnim in sekundarnim metabolizmom (Dempsey in sod., 2011). Tudi v tej stopnji smo identificirali in vključili v model več encimov navadnega repnjakovca, ki lahko katalizirajo to reakcijo (PAL1, PAL2, PAL3, PAL4) (Priloga B), čeprav ima vsak od njih različno encimsko kinetiko in fizikalne lastnosti (Dempsey in sod., 2011). Pretvorba trans-cimetove kisline do SA poteka vsaj po dveh poteh, ki smo jih opisali v modelu; preko benzojske kisline in orto-cimetove kisline.

Druga pot biosinteze SA poteka preko dvostopenjske encimske reakcije, ki vključujejo encima izohorizmat sintazo (ICS) in piruvat liazno aktivnost (Vlot in sod., 2009). Izohorizmatna pot je primarna pot biosinteze SA pri rastlinah (Seyfferth in Tsuda, 2014). V rastlini navadnega repnjakovca so identificirali dva ICS encima (imenovana ICS1 in ICS2). Gen ICS1 se v večji meri izraža pri odgovor rastline na okužbo s patogenom (Dempsey in sod., 2011). ICS v kloroplastih sintetizira pretvorbo horizmata v izohorizmat, ta pa se naprej pretvori v SA (Dempsey in sod., 2011; Seyfferth in Tsuda, 2014). V bakterijah to pretvorbo katalizira izopiruvat liaza (IPL). V rastlinah zaenkrat še niso odkrili gena, ki bi kodiral za IPL (Dempsey in sod., 2011; Seyfferth in Tsuda, 2014). Ker predvidevajo, da obstaja v rastlinah še nedeterminiran kloroplastni encim s tako katalitično funkcijo smo v modelu SA vozlišče encima, ki sodeluje v reakciji pretvorbe izohorizmata v SA poimenovali IPL. ICS biosintezna pot je aktivirana tudi s proteinskimi kinazami, ki se aktivirajo z mitogenom (MPK3/MPK6).

Po sintezi sledi percepcija hormona. Kljub številnim različnim pristopom identifikacije receptorjev SA pa veljajo proteini NPR (ang. non-expressor of pathogenesis-related genes) kot najverjetnejši receptorji in regulatorji imunskega odziva (Seyfferth in Tsuda, 2014). NPR1 lahko direktno fizično interagira s SA (Wu in sod., 2012) in regulira s SA pogojen imunski odziv rastline (Pajerowska-Mukhtar in sod., 2013). V odsotnosti SA se NPR1 oligomerizira preko disulfidnih vezi cys82 in cys216. Vezava SA na NPR1 in sprememba v celičnem redoks potencialu, povzroči monomerizacijo proteina NPR1. Ker je ta pretvorba ključna za sledečo signalizacijo, smo protein NPR1 v modelu opisali z dvema vozliščema: NPR1oligo (za oligomerno vozlišče) in NPR1mono, ko je protein NPR1 v monomerni, aktivni obliki. V jedru protein NPR1mono s pomočjo proteina NIMIN (NIMIN 1/2/3) in TGA transkripcijskih faktorjev regulira izražanje PR1 (ang. pathogenesis regulated 1) proteinov, ki so ključni za imunski odziv rastline na virus in se

močno aktivirajo po okužbi. TGA skupina transkripcijskih faktorjev sestavlja 10 članov, vendar pa z NPR1 interagirajo samo nekateri od njih. NPR1 aktivira tudi izražanje WRKY transkripcijskih faktorjev, ki so znani da sodelujejo pri obrambnem odzivu rastline na patogen in so potrebni za reprogramiranje transkriptoma povzročeno s SA. V model smo dodali njihovega dobro opisanega predstavnika WRKY70.

Signalizacijska pot SA je kompleksna. Sinteza SA pa natančno regulirana tudi preko negativnih povratnih zank. NPR1 inhibira izražanje genov EDS1 in PAD4 (Shah, 2003), katerih produkta sta glavna encima biosintezne poti SA. Na tak način tvori negativno povratno zanko in preprečuje preveliko akumulacijo SA v celici, ki ima negativni vpliv na rastlinski fitnes. Negativno regulacijo smo v modelu opisali z inhibitorno povezavo. Poleg tega so nekatere raziskave poročale o pozitivni povratni zank, kjer se izražanje genov vključenih v biosintezno pot SA, genov EDS1, EDS5 in PAD4 poveča ob povišani SA koncentraciji (Shah, 2003).

Model SA v1.0 signalizacijske poti SA je opisan z 61 vozlišč, ki predstavljajo biološke komponente oziroma njihove skupine ter 56 povezavami oziroma reakcijami med njimi.



4.1.5 Shema modela etilena

Biosintezna pot ET se začne s pretvorbo L-metionina s pomočjo tristopenjske reakcije v ET. Pri tem sodelujejo encimi metionin-adenozil transferaza (SAM), ki katalizira pretvorbo metionina v S-adenozil-L-metionin. V naslednji reakciji 1-amino-ciklopropan-1-karboksilat sintaza (ACS), sintetizira 1-aminociklopropan-1-karboksilno kislino, ki jo 1-amino-ciklopropan-1-karboksilat oksidaze (ACO), v zadnji stopnji biosinteze pretvori v ET. V navadnem repnjakovcu so v vseh stopnjah biosinteze ET identificirali več sodelujočih encimov s funkcionalno isto katalitično aktivnostjo. V model smo tako vključili 4 transferaze (SAM1, SAM2, MAT3, MAT4), 11 aminokarboksilat sintaz (ACS1-ACS11) ter 5 oksidaz (ACO, ACO1, ACO2, ACO4, ACO-like).

Po sintezi se ET veže na etilenske receptorje. V navadnem repnjakovcu so identificirali 5 različnih membranskih receptorjev ET (ETR1, ETR2, EIN4, ERS1 in ERS2), ki se nahajajo na membranah endoplazemskega retikuluma. V aktivni obliki imajo etilenski receptorji vezan baker. Za transport bakra iz golgijevega aparata poskrbi transmembranski protein RAN1. Ob odsotnosti ET je CTR1 vezan na etilenski receptor, kar povzroči inaktivacijo proteina EIN2, ki se nahaja v membrani endoplazemskega retikuluma. Vezava ET na etilenski receptor povzroči odcep serin/treoninske kinaze CTR1, in prekinitev inhibicije EIN2, kar v končni fazi pripelje do aktivacije transkripcijskih faktorjev EIN3 (EIN3, EIL1, EIL2).

EBF1 in EBF2 sta F-box proteina, ki se vežeta na EIN3 in promovirata njegovo razgradnjo v proteasomu. Ob prisotnosti ET pa sta EBF1 in EBF2 neaktivna, najverjetneje zaradi EIN2 aktivirane proteosomsko-regulirane razgradnje. Tudi protein EIN5 sodeluje pri regulaciji EBF1/EBF2. EIN5 je eksoribonukleaza, ki razgrajuje transkripte EBF1/EBF2 genov. Aktiven transkripcijski faktor EIN3 aktivira izražanje skupine proteinov ERF (ang. ethylene responsive factor) in proteinov EDF (ethylene responsive DNA binding factor). EIN3 aktivira tudi proteine PR (PR4, beta-hitinaze, glutation-s-transferaze).

Model signalizacijske poti ET v1.0, ki smo ga zgradili je sestavljen iz 28 vozlišč, ki predstavljajo biološke komponente oziroma njihove skupine ter 45 povezav oziroma reakcij med njimi.



Slika 18: Model biosinteze in signalizacijske poti ET v1.0 (za legendo glej sliko 14) Figure 18: Model of the biosynthesis and signaling pathway ET v1.0 (legend in figure 14)

4.1.6 Shema modela jasmonske kisline

Glavna biosintezna pot JA je oksilipidna pot, ki se sinteza začne z linolejsko kislino. Linolejsko kislino različne lipoksigenaze (LOX1-LOX6) pretvorijo v hidroperoksi linolejsko kislino (13-HPT), ter naprej preko alenoksid sintaze (AOS) in alenoksid ciklaze (AOC) v oksofitodienojsko kislino (OPDA) (Wasternack in Hause, 2013). OPDA se iz kloroplasta transportira v peroksisom, kjer poteka beta-oksidacija maščobnih kislin, katere končni produkt je JA (Li in sod., 2005). JA lahko derivatizira v različne aminokislinske konjugate. Jasmonil-izoleucin (JA-Ile) je glavni konjugat, katerega biološka aktivnost je eksperimentalno potrjena. Njegovo sintezo katalizira protein JAR1. V prisotnosti JA-Ile, kompleks SCF (sestavljen iz Skp1-Cullin-F-box proteinov) veže Fbox protein COI1 (ang. Coronatine insensitive 1). Tako sestavljen kompleks veže protein JAZ (JAZ1-JAZ12) in jih ubikvitinira. Ubikvitinirani JAZ represorji se razgradijo v proteasomu. Rezultat razgradnje represorjev JAZ je aktivacija transkripcije z JAZreguliranih transkripcijskih faktorjev (MYC2 in drugih beta heliks-zavoj-heliks transkripcijskih faktorjev) (Sasaki-Sekimoto in sod., 2013). Signalizacijska pot se konča z aktivacijo JA-odvisnih genov PR (THI2.1, VSP, JR1, ATCLH1).

Model signalizacije JA, ki smo ga izgradili sestavlja 36 vozlišč, ki opisujejo biološke komponente oziroma njihove skupine, ter 65 povezav med njimi, ki opisujejo reakcije med komponentami.





4.2 RAZŠIRITVE MODELA Z JAVNO DOSTOPNIM ZNANJEM IN PREVOD NA KROMPIR

4.2.1 Tekstovno rudarjenje

Izgradnja modela signalizacijskih poti je časovno dolgotrajen proces, saj je le manjši delež informacij zbran v dostopnih organiziranih podatkovnih bazah, večina pa je razdrobljena po znanstvenih literaturi, predvsem strokovnih člankih. Da bi model vključeval vse relevantne do sedaj znane komponente in povezave, smo se poslužili tekstovnega rudarjenja. Veliko biološko relevantnih informacij je namreč raztresenih znotraj rezultatov manjših raziskav, oziroma v objavah, ki so le deloma povezana z našim problem. Razvili smo novo pol-avtomatsko metodo imenovano Bio3graf, ki iz znanstvenih člankov ekstrahira povezave med komponenti v obliki tripletov in jih vizualizira v obliki usmerjenega omrežja.

4.2.2 Formalizem usmerjenega grafa z označenimi povezavami

Za tekstovno rudarjenje smo model iz formalizma petri mrež prevedli v obliko usmerjenega grafa z označenimi povezavami (ang. edge-labelled directed graph). Reakcije smo tako prezentirali, ne več z vozlišči, temveč z označenimi povezavami. Tu je način označevanja interakcij med komponentami bolj soroden načinu prezentiranja rezultatov v pisnih člankih (v obliki *osebek, povedek, predmet*). Usmerjeno omrežje omogoča lažjo integracijo novih povezav, pridobljenih iz literature s pol-avtomatsko metodo tekstovnega rudarjenja.



Slika 20: Principi prevajanja iz petri net grafa v usmerjen graf z označenimi povezavami. Figure 20: The principles of conversion from petri net to the edge-labelled graph presentation.

Pretvorba omrežja iz petri mrež v obliko usmerjenega grafa z označenimi povezavami je potekala po principih prikazanih na zgornji sliki (Slika 20). Reakcijo aktivacije (Slika 20A) med dvema komponentama smo v usmerjen graf prevedli z usmerjeno povezavo med vozliščem vsakega reaktanta ter produkta. Kadar se je aktivacija (Slika 20B) nanašala na indukcijo gena (X) preko proteinskega aktivatorja (Y) smo na nivoju usmerjenega grafa opustili informacijo o genu. Povezava je torej predstavljala aktivator (Y) povezan z usmerjeno in označeno povezavo na gen X. Vezavo (ang. binding) (Slika 20C) med reaktantoma X in Y, ki tvori produkt XY smo razčlenili v informacijo o vezavi (ang. binding-B) enega reaktanta na drugega ter tvorbo (ang. produces-P) produkta XY. Dotična razčlenitev je bila potrebna, zaradi specifičnega razlikovanja med njima v literaturi (bioloških člankih). Reakcijo inhibicije (Slika 20D) označeno z I smo definirali kot blokiranje aktivacije oziroma vezave med komponenti, preko tretje komponente-inhibitorja (X). Posledica je zmanjšana produkcija komponente Z. Za potrebe usmerjenega grafa smo interakcijo prevedli na komponento inhibitorja in produkta, medsebojno direktno povezanega preko inhibicije.

4.2.3 Validacije Bio3Graf metode

Bio3Graf metodo smo validirali z manualno anotacijo 50 biološko relevantnih člankov, ki nam je služila kot referenca pravilno označenih tripletov. Rezultate smo primerjali z avtomatsko Bio3Graf ekstrakcijo tripletov. Triplete smo validirali in označili kot (TPang. true positive), kadar so bili avtomatski tripleti pravilno ekstrahirani, tehnično pravilne vendar biološko negativne (TN- ang. true negative) in lažno pozitivne (FP – ang. false positives), pri čemer je TP+TN število manualno anotiranih tripletov, TP+FP pa število vseh tripletov ekstrahiranih z Bi3Graf metodo ne glede na to ali so pravilni ali ne.

Učinkovitost ekstrakcijskih metod se izračunali s pomočjo dveh parametrov *točnosti* (ang precison) in *občutljivosti* (ang recall). Prvi (*točnost* = TP/(TP+FP)), govori o deležu pravilno določenih tripletov glede na število vseh avtomatsko pridobljenih tripletov, drugi (*občutljivost* = TP/(TP+TN)) pa opisuje delež pravilno določenih tripletov glede na vse triplete (manualno anotirane). Rezultati za vsak tip reakcije so prikazan v spodnji tabeli.

Preglednica 8. Analiza učinkovitosti Bio3Graf metode izvedena na 50 anotiranih člankih občutljivost = TP/(TP+TN) in točnost = TP/(TP+FP), kjer TP označuje pravilne pozitivne triplete, TN pravilne negativne, FP pa napačne pozitivne triplete.

Table 8. Recall and	nrecision	analysis f	rom 50	full_length	ngners
Table of Recall and	precision	analysis I	rom so	run-iengin	papers.

Recall = TP/(TP+TN) and Precision = TP/(TP+FP), where TP denotes the true positives, TN the true negatives, and FP the false positives.

Tip reakcije	ТР	TP + TN	TP + FP	Točnost (%)	Občutljivost (%)
Aktivacija	142	223	311	45,7	63,7
Inhibicija	47	80	134	35,1	58,8
Vezava	6	9	13	46,2	66,7
Vse reakcije	195	312	458	42,6	62,3

Pokazali smo, da je metodologija primerna za naše potrebe, zato smo jo uporabili za ekstrakcijo novih bioloških povezav.

4.2.4 Ekstrakcija tripletov iz literature

Komponentam iz modela signalizacijskih poti SA, JA in ET smo pripisali sinonime, ki smo jih določili s pomočjo podatkovnih baz (TAIR, iHOP, NCBI). Prav tako smo sinonime določili za reakcije, vključene v model. Seznama komponent in reakcij sta predstavljala osnovni slovar, uporabljen za Bio3Graf metodo, na podlagi katerih smo ekstrahirali triplete. Slovarja sta predstavljena v prilogi D in E.

Relevantne biološke publikacije smo pridobili iz prosto dostopne baze znanstvene literature PubMed Central. Da bi pridobili čim bolj relevantno literature, smo v iskalnik

vnesli sledeče ključne besede, ki so pokrile naše fokus na signalizacijske poti imunskega odziva pri rastlini navadni repnjakovec:

"arabidopsis thaliana"[All Fields] AND "defence"[All Fields] OR "defense"[All Fields] OR "jasmonate"[All Fields] OR "jasmonic acid"[All Fields] OR "salicylate"[All Fields] OR "salicylic acid"[All Fields] OR "pathogen"[All Fields] OR "virus"[All Fields] OR

S to množico ključnih besed smo pridobili 9.586 znanstvenih člankov iz katerih smo s tekstovnim rudarjenjem ekstrahirali 4.204 tripletov od tega 1.132 unikatnih.

Tipi	Vsi	Nepravilni	Pravilni	Stari posredni	Stari direktni	Novi posredni	Novi direktni
Теакстј	uipieu	uipieu	uipieu	tripleti	tripleti	tripleti	tripleti
Aktivacija	736	446	290	158	41	86	5
Inhibicija	352	289	63	18	1	37	7
Vezava	44	20	24	20	2	0	2
Vse reakcije	1,132	7,55	3,77	1,96	44	123	14

Preglednica 9: Število pridobljenih tripletov z Bio3Graf metodo.

Pridobljene triplete smo biološko anotirali kot pravilne oziroma nepravilne. Pravilne triplet smo nadaljnjo razdelili v skupino novih tripletov (ang. new), kadar povezava še ni bila označena v manualno zgrajenem modelu ter stara (ang. old) kadar je bila povezave že anotirana v modelu. Prav tako smo povezave anotirali kot direktne (direktne) oziroma posredne (ang. indirect), glede na fizično interakcijo med komponentami. Kot direktne povezave smo označili tiste, kjer komponente medsebojno interagirajo, medtem ko pri posrednih povezavah ena komponenta vpliva na drugo preko tretje komponente/reakcije (ali množice komponent/reakcij), ki po navadi še niso biološko identificirane. Z metodo smo poiskali 736 tripletov reakcij aktivacije, 352 tripletov reakcij inhibicije in 44 tripletov reakcij vezave (Preglednica 9).



Slika 21: Razširjen model z novimi povezavami dobljenimi z Bio3Graf-om.

A) Razširjen model v obliki usmerjenega grafa z označenimi povezavami. B) Venovi diagrami. Povezave v manualno zgrajenem modelu so vse direktne in so predstavljene z rdečo. Presek med povezavami iz modela in pravilnimi tripleti je označen s črno barvo. Izmed pravilnih novih tripletov so z zeleno označene indirektne povezave, z modro pa direktne. C) Povečan del modela. Povezave iz manualnega modela so obarvane z rdečo, medtem ko zelene povezave predstavljajo nove indirektne povezave dobljene z Bio3Graf metodo. Črno so obarvane povezave, ki so bile anotirane v manualnem modelu in hkrati potrjene s tripleti.

Figure 21: The final plant defense signaling model topology constructed by merging the manual and the Bio3graph networks.

A) Edge-labelled graph representing the merged model. B) The Venn diagram. The relations in the manual model are all direct and are colored in red. The intersection between the model relations and the correct triplets extracted from the literature is presented with black color. From the correct new triplets, the indirect relations are represented with green and the direct ones with blue color and C) Zoom-in into a part of the merged plant defense signaling topology. The links from the manual model are shown in red, while the green colored relations represent the extracted new indirect links, blue arcs show new direct links and the black arcs show the intersection between the manual model and the correct triplets extracted with Bio3graph.

Razširjen model v obliki usmerjenega grafa vizualizira razširjena vozlišča na nivoju komponent (nivo 3-Slika 15B). Sestavljen je iz 175 komponent (od tega 31 malih molekul, 135 genov/proteinov in 9 kompleksov) ter 387 reakcij (od tega 231 aktivacij, 49 vezav, 62 inhibicij in 45 tvorb).



Slika 22: Nove direktne povezave pridobljene z Bio3Graf metodo. Ekstrahirali smo 14 direktnih novih povezav med komponentami, ki jih nismo identificirali v manualno izgrajenem modelu.

Figure 22: New direct relations extracted from the biological literature with Bio3Graf methodology. Bio3graph contributed 14 new direct links between the components which were not identified in the manually built model.

Z Bio3Graf metodo smo ekstrahirali nove povezave med komponentami modela. Končen razširjen model je bil sestavljen iz 175 reakcij in 524 interakcijami med komponentami (Slika 21). Večino ekstrahiranih povezav je bilo nedirektnih, 14 pa novih direktnih povezav (Slika 22).

4.2.5 Razširjen model z informacijami o med proteinskih interakcijah navadnega repnjakovca

Model signalizacijskih poti rastlinskega odziva na biotski stres, ki smo ga zgradili, vključuje biološke komponente ter reakcije, katerih aktivnost v imunskem odzivu je že potrjena. V rastlinski celici pa te komponente niso izolirane od ostalega okolja, ampak z njim reagirajo. Te komponente torej niso nujno direktno vključene v znane dele signalnih poti imunskega odziva rastline, vendar pa lahko nanj bolj ali manj vplivajo in ga regulirajo. Da bi poiskali neznane regulatorje, smo se poslužili znanja o interaktomu navadnega repnjakovca (Consortium, 2011). V raziskavi opisujejo rezultate proteomske analize 2700 proteinov navadnega repnjakovca, med seboj povezanih z 6200 interakcijami. V bazi proteinov interaktoma navadnega repnjakovca smo poiskali proteine, ki so v medsebojni interakciji s proteini iz našega modela signalizacijskih poti imunskega odziva, torej proteine, ki z že poznanimi komponentami odziva fizično interagirajo. Na tak način smo v model dodali 227 novih komponent, proteinov, ki reagirajo s proteini vključenimi v naš model. Vsem smo pripisali unikatne identifikatorje, njihova imena ter sinonime ter opise bioloških funkcij v katerih so udeleženi (Priloga C). Razširjen model s proteini, ki so v interakcijami s komponentami modela je vizualiziran na spodnji sliki (Slika 23).



Slika 23: Vizualizacija modela z dodanimi proteini, ki so v interakciji s proteini modela

Oranžno so pobarvane komponente manualno izgrajenega modela vključene v signalizacijsko pot ET, roza JA, temno modro SA, svetlo modro pa komponente povezav med modeli. Sivo so proteinski interaktorji, ki smo jih v model dodali iz baze interaktorjev navadnega repnjakovca (Consortium, 2011). Model sestavlja 407 komponent (127 genov iz manualnega modela) in 888 povezav med njimi. Vizualizirano s programom Cytoscape.

Figure 23: Model visualization with protein interactors included

In orange are shown the components of manual constructed model as part of ET signaling pathway, in pink components of JA signaling pathway, dark blue- SA signaling pathway, light blue- crosstalk components. In gray are shown protein interactors that have been added into the model from Arabidopsis interactome data base (Consortium, 2011). Represented model is constructed from 407 components (127 genes from manual model) and 888 interactions.

4.2.5.1 Translacija modela iz modelne rastline navadni repnjakovec na krompir

V naslednji fazi smo omrežje prenesli iz modelne rastline navadnega repnjakovca na krompir prek ortologov (Ramšak in sod., 2014). Identifikatorju navadnega repnjakovca smo poiskali in pripisali najbolj sorodni ortolog v krompirju z uporabo algoritma BLAST. Novo nastalo omrežje je opisano s krompirjevimi genskimi identifikatorji, ki smo jih povezali z identifikatorji krompirjevih transkriptov POCI (Potato Oligo Chip Initiative) (Kloosterman in sod., 2008). Identificirali smo 643 unikatnih POCI prob, ki so se povezala z 150 genskimi identifikatorji navadnega repnjakovca iz modela (Priloga C). POCI probam smo nato pripisali vrednosti izražanja v različnih časovnih točkah po okužbi z virusom (1-7 dpi za inokulirane liste in 1-11 dpi za sistemsko okužene liste) pri obeh analiziranih genotipih 'Désirée' NT in 'Désirée' NahG. Tako smo lahko biološki eksperiment izveden na rastlini krompirja povezali z modelom signalizacijske poti imunskega odziva navadnega repnjakovca. Predpostavili smo, da je odziv rastline na patogene vsaj v osnovnih točkah evolucijsko ohranjen mehanizem, ter je zato prevod med različnima rastlinskima vrstama mogoč.

POCI identifikatorjem smo pripisali vrednosti izražanja genov v različnih časovnih točkah po okužbi krompirja z virusom PVY ter rezultate biološko ovrednotili. Rezultati so prikazani v Prilogi F.

4.2.6 Kinetično modeliranje

Izvedli smo preliminarne študije kinetičnega modeliranje. V prvi fazi smo se osredotočili smo le na podmodel SA. Modelirali smo v programu Cell Illustrator, ki omogoča kinetične simulacije na podlagi masne kinetike reakcij (ang. mass action model), ter za izračun koncentracije izhodnih komponent (produkta) upošteva koncentracije vhodnih komponent (substrata) ter hitrost pretvorbe. Hitrost pretvorbe smo definirali v obliki avtomatsko privzetih reakcijskih konstant progama. Komponentam modela smo določili začetne vrednosti, hitrost razgradnje ter pražne vrednosti inhibitornih povezav. Sprva smo vse začetne vrednosti, hitrosti razgradnje in pražne vrednosti inhibitornih povezav za vse komponente in reakcije poenotili, ter izvedli simulacije. Nato smo spremenljivke variirali, ter vsakič izvedli simulacije, da bi ovrednotili stabilnost modela ter definirali komponente, ki v večji meri vplivajo na končni izid signalizacijskih poti. Končni izid smo ovrednotili preko izražanja genov, ki kodirajo za PR-proteine, kot najbolj spodnjih komponent modela, in nekaterih transkripcijskih faktorjev, ki s povratno zanko regulirajo virusno aktivnost ter tako aktivirajo imunski odziv rastlinske celice. Spodnja slika prikazuje primer simulacije v Cell Illustratorju.



Slika 24: Primer dinamične simulacije modela SA

Simulacije so izvedene s programom Cell Illustrator na podlagi privzetih vrednosti reakcijskih konstant in pražnih vrednosti inhibitornih zank. Pozitivna povratna zanka (positive feedback loop) in negativna povratna zanka (negative feedback loop) sta označeni v modrem okvirju. Grafi na desni strani slike prikazujejo spreminjanje vrednosti komponent v času.

Figure 24: Example of dynamic simulation of SA model

Simulations are performed with Cell Illustrator program based on default values of reaction speed constants and threshold values of inhibitory reactions. Positive feedback loop and negative feedback loop are marked with blue squares. Graphs on the right represent dynamic simulation outputs.

Preliminarne simulacije so pokazale, da je model robusten, in na pertrubacije vrednostih vhodnih komponent odreagira le z manjšimi odstopanji v vrednosti PR proteinov. Po določenem času se je koncentracija vseh komponent močno povečala, zato smo prvotni model nadgradili z reakcijami razgradnje bioloških komponent. Šele takrat smo lahko dosegli ravnotežna stanja koncentracij bioloških molekul. Detektirali smo bolj povezana vozlišča (SA, NPR1) katerih pertubacije v večji meri zanihajo sistem in so ključna za vzpostavitev ravnotežja. Za vzpostavitev ravnotežja je pomembna tudi negativna povratna zanka preko proteina NPR1, ki inaktivira PAD3/4 in posledično negativno regulira ICS1/2 biosintezno pot SA. Tako koncentracija SA le prehodno poveča saj negativna povratna zanka skrbi, da se nivo SA zopet spravi v ravnotežno stanje.

4.3 DINAMIKA ODZIVA KROMPIRJA NA OKUŽBO S KROMPIRJEVIM VIRUSOM Y NA RAZLIČNIH NIVOJIH

4.3.1 Fenotipske spremembe krompirja okuženega z virusom PVY^{NTN}

Z virusom PVY^{NTN} oziroma slepo smo inokulirali rastline sorte 'Désirée' ter dveh genotipov NahG-Désirée in Désirée coi1-RNAi (poglavje 3.2.1). Rastlinski material smo pobirali 0., 1., 3., 4., 5., 7., 8., 9., in 11. dan po inokulaciji. Za kontrolo bolezenskih znamenj smo ob pobiranju rastlinskega materiala nekaj inokuliranih rastlin vseh genotipov pustili rasti v rastni komori nedotaknjenih.



Slika 25: Rastline in listi krompirja sorte 'Désirée' in dveh genotipov NahG-Désirée ter Désirée coi1-RNAi.

Zgoraj so prikazane kontrolne rastline, spodaj pa listi rastlin okuženih z virusom PVY^{NTN}. 11. dan po okužbi so na inokuliranih listih vidni simptomi: NahG-Désirée –večje točkovne in žilne nekroze na vseh rastlinah, Désirée coi1-RNAi - kloroze na nekaterih rastlinah, 'Désirée'-hitrejše rumenenje spodnjih listov.

Figure 25: Potato plants and leaves of cultivar 'Désirée' and two genotypes NahG-Désirée ter Désirée coi1-RNAi.

In the upper panel control plants are shown, while in the bottom panel potato leaves infected with PVY^{NTN} are shown. 11th day post infection symptoms are pronounced in the infected leaves: NahG-Désirée - necrotic lesions and vein necrosis were observed on all infected plants, Désirée coi1-RNAi - some of the plants had leaf necrosis, 'Désirée'-faster yellowing of the bottom leaves was observed.

Rastline so se na okužbo z virusom PVY^{NTN} odzvale po pričakovanjih (Slika 25). Simptomi v obliki majhnih točkastih nekroz so se začeli pojavljati na okuženih listih pri transgenih rastlinah NahG-Désirée od 4. dneva naprej in se povečevali v večje nekrotične lezije in žilne nekroze v naslednjih dneh. Na okuženih listih nekaterih rastlin Désirée coi1-RNAi smo opazili obročkaste kloroze, vendar šele 11. dan po okužbi. Netransgeni krompirji sorte 'Désirée' niso razvili simptomov, smo pa opazili hitrejše rumenenje spodnjih listov kot pri kontrolnih rastlinah, ki se je začelo od 7. dneva naprej. Bolezenske znake na zgornjih neinokuliranih listih smo s opazili le v primeru rastlin NahG-Désirée. Prve majhne nekroze so se začele pojavljati na nekaterih rastlinah 11. dpi.

Uspešnost inokulacije smo ugotavljali z dvema testoma. Rezultati testa Elisa so pokazali, da je bilo okuževanje uspešno, okužbo pa smo zaznali tudi z metodo PCR v realnem času.

4.3.2 Dinamika kopičenje virusa v krompirju sorte 'Désirée' in dveh transgenih rastlin NahG-Désirée ter Désirée coi1-RNAi

Spremljali smo dinamiko kopičenja virusa PVY^{NTN} v inokuliranih listih krompirja sorte 'Désirée' in obeh transgenih rastlin NahG-Désirée in Désirée coi1-RNAi. Količino virusa smo analizirali z reakcijo PCR v realnem času (poglavje 3.2.4). Rezultate smo izrazili kot količino virusne RNA relativno glede na povprečno količino referenčnih genov COX in EF oziroma 18S. V spodnjih inokuliranih listih smo spremljali kopičenje virusa v 1., 3., 4., 5. in 7. dnevu po inokulaciji. Statistično smo analizirali kopičenje virusne RNA po dnevih: relativno na predhodni dan in relativno na začetni dan (Preglednica 10). Prvi dan po inokulaciji je bila izmerjena količina virusne RNA še posledica ostanka inokuluma. V naslednjih dneh se je pri rastlinah 'Désirée' količina virusne RNA povečevala, signifikantno iz 4. v 5. in 5. v 7. dan po inokulaciji. Pri rastlinah NahG-Désirée smo zaznali največjo akumulacijo virusne RNA, značilno signifikantno rast pa smo zaznali že iz 3. na 4. dan. Pri rastlinah Désirée coi1-RNAi značilne virusne akumulacije ni bilo zaznati (Slika 26, Preglednica 10).



Slika 26: Kopičenje virusne RNA, ki smo jo analizirali s PCR v realnem času. Prikazano je kopičenje virusne RNA v listih krompirja 'Désirée' ('Désirée' NT), NahG-Désirée ('Désirée' NahG) in Désirée coi1-RNAi ('Désirée' Coi) 1., 3., 4., 5. in 7. dan po inokulaciji.

Figure 26: Accumulation of viral RNA, analyzed with real time PCR.

Viral accumulation for potato leaves of 'Désirée' ('Désirée' NT), NahG-Désirée ('Désirée' NahG) and Désirée coi1-RNAi ('Désirée' Coi) is shown at 1, 3, 4, 5 and 7 days post inoculation.

V vzorcih listov 'Désirée' in NahG-Désirée, kjer smo zaznali kopičenje virusne RNA smo analizirali tudi razlike v akumulaciji med lamino in žilami (Slika 27). Pri krompirjih 'Désirée' smo razlike med kopičenjem v obeh tkivih zaznali v četrtem dnevu, kjer je bilo zaznati več virusne RNA v žilah kot v lamini. Pri rastlina se je več virusne RNA akumuliralo v lamini vse od četrtega dneva naprej, čeprav so razlike postale statistično značilno različne šele 7 dan po inokulaciji, ko je bila razlika v akumulacijami med tkivi še večja.

Preglednica 10: Statistična analiza sprememb izražanja genov

Statistično značilno povečanje (+++: p<0.001, ++: p<0.01, +: p<0.05, •: p<0.1) ali zmanjšanje (---: p<0.001, --: p<0.01, -: p<0.05, •: p<0.01) v izražanju genov (CAB, RA, GBSS, INV, PR1b) oziroma virusni koncentraciji (PVY) je prikazano za zaporedne časovne točke; na primer 1:0 označuje statistično primerjavo med količino virusne RNA v 1. dpi v primerjavi s količino virusne RNA v 0. dpi. Vsi podatki so normalizirani na slepo kontrolo. Rezultati statistične analize so prikazani za vse tri genotipe; 'Désirée', NahG-Désirée in Désirée coi1-RNAi. Prazno polje označuje neznačilno spremembo.

Table 10: Statistical analysis of differences in gene expression

The significance of increase (+++: p<0.001, ++: p<0.01, +: p<0.05, •: p<0.1) or decrease (---: p<0.001, --: p<0.01, - : p<0.05, •: p<0.1) in gene expression (CAB, RA, GBSS, INV, PR1b) or viral accumulation (PVY) are shown consecutive time points; example 1:0 dpi denotes statistical comparison between viral accumulation at 1 dpi compared to the amount of viral RNA at 0 dpi. All the data is normalized PVY versus mock treated plants. The statistics for all three genotypes is shown: 'Désirée' NT, and 'Désirée'-NahG, Désirée coi1-RNAi. An empty field denotes no significance.

	dpi	CAB	RA	GBSSI	INV	PR1b	PVY
'Désirée' NT	1:0				•		+++
	3:1					•	
	4:3	•				+	
	5:4		-	-			+
	7:5				•	++	+
	1:0				•		***
	3:0		•				***
	4:0						***
	5:0		**		•		***
	7:0		**				***
NahG-Désirée	1:0			•		•	+++
	3:1						
	4:3					+	++
	5:4	•		++	•	++	
	7:5			-			•
	1:0			•		•	***
	3:0					*	***
	4:0			•			***
	5:0					**	***
	7:0				•	**	***
Désirée coi1-RNAi	1:0						+++
	3:1						•
	4:3			•	++		
	5:4			++			
	7:5						
	1.0						***
	3.0				**		***
	3.0 4·0			•			***
	5.0			•			***
	7:0						***



Slika 27: Primerjava kopičenja virusne RNA med lamino in žilo. Analizirali smo inokulirane liste krompirja 'Désirée' (zgoraj) in NahG-Désirée (spodaj). Prikazano je

Figure 27: Comparison of accumulation of viral RNA between lamina and midvein

kopičenje virusne RNA 1., 3., 4., 5. in 7. dan po inokulaciji (dpi).

Analysis of inoculated leaves of 'Désirée' (upper panel) and NahG-Désirée (bottom panel) has been performed. Viral accumulation is shown at 1, 3, 4, 5, and 7 days post inoculation (dpi).

Analizirali smo kopičenje virusne RNA v zgornjih, neinokuliranih listih rastlin 'Désirée' (Preglednica 11) in NahG-Désirée (Preglednica 12). Spremljali smo kopičenje v 1. (1z), 2. (2z) in 3. (3z) zgornjem listu in sicer 1., 3., 4., 5.,7., 8., 9. in 11. dan po inokulaciji v 1. zgornjih listih ter 7., 8., 9. in 11., dpi v 2. ter 3. zgornjih listih. Kopičenje virusne RNA smo spremljali ločeno med žilami in lamino. Zaradi velikih razlik v akumulaciji virusne RNA znotraj ponovitev so rezultati prikazani za vsak vzorec ločeno in ne kot povprečna

vrednost bioloških ponovitev. Pri netransgenih krompirjih 'Désirée' smo virus zaznali v zelo nizkih koncentracijah. Zelo nizko koncentracijo virusne RNA smo detektirali le v lamini posameznih rastlin vzorčenih 7. in 9. dan po inokulaciji.

					'Désirée'				
	list/dpi	1	3	4	5	7	8	9	11
	1Z_a	-	-	-	-	+	-	-	-
	1Z_b	-	-	-	-	-	+	-	-
[A	1Z_c	-	-	-	-	-	-	-	-
	2Z_a	NA	NA	NA	NA	-	-	-	-
AN	2Z_b	NA	NA	NA	NA	-	+	+	-
Γ	2Z_c	NA	NA	NA	NA	-	-	-	-
	3Z_a	NA	NA	NA	NA	+	-	-	-
	3Z_b	NA	NA	NA	NA	-	-	-	-
	3Z_c	NA	NA	NA	NA	+	-	-	-
	list/dpi	1	3	4	5	7	8	9	11
	1Z_a	-	-	-	-	-	-	-	-
	1Z_b	-	-	-	-	-	-	-	-
	1Z_c	-	-	-	-	-	-	-	-
ΓA	2Z_a	NA	NA	NA	NA	-	-	-	-
ŽΠ	2Z_b	NA	NA	NA	NA	-	-	-	-
	2Z_c	NA	NA	NA	NA	-	-	-	-
	3Z_a	NA	NA	NA	NA	-	-	-	-
	3Z_b	NA	NA	NA	NA	-	-	-	-
	3Z_c	NA	NA	NA	NA	-	-	-	-

Preglednica 11: Kopičenja virusne RNA v lamini in glavni žili v zgornjih sistemskih listih krompirja 'Désirée'.

Analizirali smo kopičenje virusne RNA 1., 3., 4., 5.,7., 8., 9. in 11 dan po inokulaciji v 1 (1z) zgornjih listih ter 7., 8., 9. in 11. dan v 2. (2z) ter 3. (3z) zgornjih listih. A, b, c-biološki replikati. +: detektirali smo nizko koncentracijo virusne RNA, ++: detektirali smo višjo koncentracijo virusne RNA, ++: detektirali smo višoko koncentracij virusne RNA, -: virusne RNA nismo detektirali, NA: podatki niso na voljo

Table 11: Accumulation of viral RNA in lamina and midveins of upper systemic leaves of potato plants 'Désirée'.

Viral accumulation is shown at 1, 3, 4, 5, 7, 8, 9 and 11 days post inoculation for 1st (1z) upper leaves and at 1, 3, 4, 5 and 7 days post inoculation for 2nd (2z) upper and 3rd (3z) upper leaves. a, b, c - biological replicates. +: we detected low concentration of viral RNA, ++: middle concentration of viral RNA has been detected, +++: high concentration of viral RNA has been detected, -: viral RNA has not been detected, NA: data not available.

Po drugi strani smo virus zaznali v visokih koncentracijah v zgornjih listih transgenih rastlin NahG-Désirée. Virusno akumulacijo smo zaznali od 7 dneva naprej, maksimum pa je dosegla 11. dan po inokulaciji. Primerjava med zgornjimi listi je pokazala, da se večino virusa kopiči v 2. in 3. zgornjem listu, medtem ko je količina virusne RNA v 1. zgornjem listu precej manjša. V lamini smo virus zaznali v višjih koncentracijah kot v žilah.

					NahG-I	Désirée			
	list/dpi	1	3	4	5	7	8	9	11
	1Z_a	-	-	-	-	-	-		+
	1Z_b	-	-	-	-	-	-	-	-
١A	1Z_c	-	-	-	-	-	-	-	-
	2Z_a	NA	NA	NA	NA	-	-	-	+++
AN	2Z_b	NA	NA	NA	NA	+++	+	-	++
L.	2Z_c	NA	NA	NA	NA	+	-	-	-
	3Z_a	NA	NA	NA	NA	+	+	+	+
	3Z_b	NA	NA	NA	NA	+	+	+	-
	3Z_c	NA	NA	NA	NA	-	+	+	+++
	_								
	list/dpi	1	3	4	5	7	8	9	11
	1Z_a	-	-	-	-	-	-	-	-
	1Z_b	-	-	-	-	-	-	-	-
	1Z_c	-	-	-	-	-	-	-	-
ΓA	2Z_a	NA	NA	NA	NA	-	-	-	-
ŽIJ	2Z_b	NA	NA	NA	NA	+	+	-	-
	2Z_c	NA	NA	NA	NA	-	+	-	-
	3Z_a	NA	NA	NA	NA	-	-	-	-
	3Z_b	NA	NA	NA	NA	+	-	+	-
	3Z_c	NA	NA	NA	NA	-	+	-	+

Preglednica 12: Kopičenja virusne RNA v lamini in glavni žili v zgornjih sistemskih listih krompirja NahG-Désirée.

Analizirali smo kopičenje virusne RNA 1., 3., 4., 5.,7., 8., 9. in 11 dan po inokulaciji v 1 (1z) zgornjih listih ter 7., 8., 9. in 11. dan v 2. (2z) ter 3. (3z) zgornjih listih. A, b, c-biološki replikati. +: detektirali smo nizko koncentracijo virusne RNA, ++: detektirali smo višjo koncentracijo virusne RNA, ++: detektirali smo višoko koncentraciji virusne RNA, -: virusne RNA nismo detektirali, NA: podatki niso na voljo

Table 12: Accumulation of viral RNA in lamina and midveins of upper systemic leaves of potato plants NahG-Désirée.

Viral accumulation is shown at 1, 3, 4, 5, 7, 8, 9 and 11 days post inoculation for 1st (1z) upper leaves and at 1, 3, 4, 5 and 7 days post inoculation for 2nd (2z) upper and 3rd (3z) upper leaves. a, b, c - biological replicates. +: we detected low concentration of viral RNA, ++: middle concentration of viral RNA has been detected, +++: high concentration of viral RNA has been detected, -: viral RNA has not been detected, NA: data not available.

4.3.3 Dinamika izražanja genov po okužbi z virusom PVY^{NTN}

4.3.3.1 Izolacija celokupne RNA za reakcijo PCR v realnem času

Po analizi kvalitete in kvantitete izolirane RNA smo ugotovili, da količina izolirane RNA med posameznimi vzorci zelo variira, vendar ni prišlo do razgradnje RNA (Slika 28). Tako smo ocenili, da je bila izolacija RNA iz vzorcev uspešna. Le v nekaterih primerih je bila kvaliteta izolirane RNA slaba, takrat smo izolacijo ponovili. Opazili smo, da je v več primerih koncentracija RNA, izolirana iz žile nižja kot pri vzorcih lamine. Ostanke primesi v vzorcih RNA smo ocenili s parametroma A260/280 in A260/230. Vrednosti parametra A260/280 so bile za večino vzorcev med nad 2,1, kar pomeni, da RNA ne vsebuje veliko primesi proteinov. Za vzorce, kjer je bila vrednost parametra A260/230 ocenjena pod 1,8, lahko predvidevamo, da imajo primešane nečistoče z nižjo absorbanco, kot so npr. ogljikovi hidrati, fenol in EDTA. Vpliv nečistoč na pomnoževanje v PCR v realnem času smo pri spremljanju izražanja genov ocenili z izračunavanjem in upoštevanjem učinkovitosti pomnoževanja posameznega vzorca.

Vzorce totalne izolirane RNA smo kasneje uporabili za analizo z mikromrežami in analizo s RT-qPCR.



Slika 28: Primer elektroforeznega gela celokupne RNA izolirane iz krompirjevih listov (Désirée coi1-RNAi) pred DNAzno reakcijo.

ST-standard, S1-S12 celokupna RNA 12-ih različnih vzorcev. Ribosomalni 28S rRNA in 18s rRNA sta vidni.

Figure 28: Example of electrophoresis gel of isolated total RNA from potato lamina samples (Désirée coi1-RNAi) before DNAse treatment.

ST-standard, S1-S12: total RNA from 12 different samples. Ribosomal 28S rRNA and 18S rRNA are marked.

4.3.3.2 Načrtovanje začetnih oligonukleotidov za PCR v realnem času

Na osnovi rezultatov, dobljenih z analizo mikromrež in nukleotidnih zaporedij v bazah PGSC smo skonstruirali oligonukleotidne začetnike za pomnoževanje amplikonov genov StSAPK8, StPK11, StPP2C, StAVR9 in CAB. Zaporedja oligonukleotidnih začetnikov ter prob, uporabljene koncentracije in učinkovitosti njihovega delovanja so prikazana v preglednici (Preglednica 2). Amplikone smo zaznavali s pomočjo kemije TaqMan. Določitev in oznaka tarčnega skupnega nukleotidnega zaporedja ter genski identifikatorji so prikazani v preglednici (Preglednica 18).

4.3.3.3 Dinamika transkriptoma

Dinamiko izražanja genov smo spremljali z metodo mikromrež. Analizirali smo lamino krompirjevega kultivarja 'Désirée' prvih spodnjih listov 1., 3., 4., 5. in 7. dan po inokulaciji, ter 1., 3., 4., 5.,7., 8., 9. in 11. dan po inokulaciji prvih zgornjih listov. Analizirali smo tudi dinamiko genotip NahG-Désirée za prve spodnje liste v časovnih točkah 1., 3., 4., 5. in 7. dpi. Analizirali smo tudi netretirane vzorce (0. dpi) za oba genotipa.

4.3.3.4 Analiza dinamike izražanja genov z DNA-mikromrežami

Število statistično značilno izraženih genov v posameznem dnevu po inokulaciji (1.-7. dpi) je prikazanih na (Slika 29). Rezultate spodnjih inokuliranih listov smo primerjali med obema genotipoma ('Désirée' in NahG-Désirée). Število virusno-odzivnih genov se je močno spreminjalo med različnimi dnevi. Pri vzorcih 'Désirée' je bil najbolj odziven 5. dan, ko smo zaznali največ statistično značilno izraženih genov (2734). Z razliko od vzorcev 'Désirée' pa je bilo pri rastlinah NahG-Désirée največ diferencialno izraženih genov že v prvem dnevu po okužbi (4808). Večino značilno različno izraženih genov je genotipno-specifičnih.



Diferencialno izraženi geni rastline Désirée NT po okužbi z virusom

Diferencialno izraženi geni rastline Désirée-NahG po okužbi z virusom

Slika 29: Venovi diagrami diferencialno izraženih genov za vzorca 'Désirée' NT ter NahG-Désirée v posameznih časovnih točkah

Diferencialno izraženi geni med vzorci okuženimi z virusom in slepo tretiranimi vzorci rastlin 'Désirée' NT ter NahG-Désirée pri različnih časovnih točkah:1., 3., 4., 5. in 7 dan po infekciji (dpi). Prikazani so sami statistično signifikantni diferencialno izraženi geni (FDR p-value <0.05). POCI identifikatorje (Potato Oligo Chip Initiative) (Kloosterman in sod., 2008) smo prepisali v stNIB identifikatorje (Ramšak in sod., 2014) z namenom unikatne reprezentacije genov. Skupno smo detektirali 37 865 transkriptov.

Figure 29: Venn diagrams of differentially expressed genes for samples 'Désirée' NT and NahG-Désirée at individual time points

Differentially expressed (DE) genes in virus vs. mock treated plants of cultivar 'Désirée' (NT) and NahG-Désirée (NahG) at 1, 3, 4, 5 and 7 days post infection (dpi) are shown. The values represent statistically significantly (FDR p-value <0.05) differentially expressed genes. POCI IDs (Potato Oligo Chip Initiative) (Kloosterman in sod., 2008) have been translated stNIB IDs (Ramšak in sod., 2014) to represent unique genes. All together 37,865 transcripts have been detected.

4.3.3.5 Obogatitvena analiza genskega izražanja

Za pregled virusno induciranih sprememb v izražanju genov na nivoju procesov smo se poslužili analize GSEA gensko obogatitveno metodo (Subramanian in sod., 2005), ki omogoča, da posamezne gene ne analiziramo le na nivoju izražanja ampak tudi na nivoju njihove funkcije oziroma metabolnega procesa, v katerega so vključeni. V preglednici so prikazani statistično signifikantni (FDR q ≤ 0.05) rezultati, s pripadajočimi funkcionalnimi anotacijami (BIN) in opisi procesov, za primere, ko je v specifičnem BINu med 20 in 400 genov. Z redukcijo analize na funkcionalne anotacije velikosti med 20 in 400 geni smo odstranili manj informativne skupine anotacij.

Preglednica 13: Rezultati analize gensko obogatitvene metode (GSEA)

Preglednica prikazuje procese v krompirjevih listih, ki se značilno (FDR q ≤ 0.05) spremenijo po okužbi z virusom PVY^{NTN}. Spremljali smo dinamiko odziva na ravni procesov 1., 3.,4.,5 in 7. dan po okužbi v spodnjih listih rastlin 'Désirée' (Désirée spodnji) ter rastline NahG-Désirée (Désirée spodnji). V zgornjih listih smo spremljali odziv rastline 1., 3., 4., 5., 7., 8., 9. in 11. dan po okužbi pri netransgenih rastlinah 'Désirée' (Désirée zgornji). Vodoravne črte razmejujejo različne procese. Zeleno: znižana aktivnost, rdeče: povečana aktivnost.

Table 13: Results of gene set enrichment analysis (GSEA)

The table shows statistically differential processes (FDR q ≤ 0.05) in potato leaves after PVY^{NTN} infection. The dynamics of potato response on the level of processes is shown for 1, 3, 4, 5 and 7 dpi in bottom leaves of potato plants 'Désirée' (Désirée spodnji) and NahG-Désirée (Désirée spodnji). In the upper leaves the potato response have been followed at 1, 3, 4, 5, 7, 8, 9 and 11 dpi in notransgenic plants 'Désirée' (Désirée zgornji). Horizontal lines mark different processes. Green: down regulation, red: up regulation.

		NahG-Désirée spodnji Désirée spodnji			Désirée zgornji												
BIN	Funkcionalne anotacije	1	3	4	5	7	1	3	4	5 7	1	3	4	5	7 8	9	11
1	PS	-43%		-44%		-47%		21%	41% -	42%	22%	6	33%	-56%	-36	% -34%	<mark>6</mark> 40%
1.1	PS.LIGHTREACTION	-46%		-44%		-50%	38%		51% -	41%	23%	6	47%	-54%	<mark>35%</mark> -38	% -38%	<mark>6</mark> 38%
1.1.1	PS.LIGHTREACTION.PHOTOSYSTEM II	-48%		-48%		-41%	31%		59% -	41%	26%	6	48%	-52%		-41%	<mark>6</mark> 43%
1.1.1.1	PS.LIGHTREACTION.PHOTOSYSTEM II.LHC-II	-48%		-64%		-48%	56%		88% -	60%	32%	6	88%	-48%		-52%	<mark>6</mark> 40%
1.1.1.2	PS.LIGHTREACTION.PHOTOSYSTEM II.	-46%		-40%		-47%	30%		48% -	35%	24%	6	40%	-64%		-37%	<mark>6</mark> 43%
1.1.2	PS.LIGHTREACTION.PHOTOSYSTEM I	-51%	56%	-70%		-63%	49%		72% -	72%	23%	6	72%	-53%		-63%	<mark>8</mark> 37%
1.1.2.2	PS.LIGHTREACTION.PHOTOSYSTEM I	-54%	62%	-73%		-77%			69% -	50%	23%	6	73%	-62%	-54	% -69%	<mark>6</mark> 50%
1.1.5	PS.LIGHTREACTION.OTHER ELECTRON CARRIER	-67%		-52%		-71%	-67%			52% -52	%		_	-57%		-57%	6
1.2	PS.PHOTORESPIRATION	-25%		-30%	-32%	-34%		20%	-	36%		23%	5	-45%			
1.3	PS.CALVIN CYCLE	-41%		-52%	-31%	-46%		35%	-	47% -36	<mark>%</mark> 27%	6		-66%	-32	% -38%	<mark>6</mark> 49%
2	MAJOR CHO METABOLISM							21%	27%	23	1 <mark>0</mark>	34%			<mark>26%</mark> -23	%	
2.1	MAJOR CHO METABOLISM.SYNTHESIS								28% -	39% <mark>25</mark>	6	_		-35%	<mark>37%</mark> -38	%	
2.1.2	MAJOR CHO METABOLISM.SYNTHESIS.STARCH								32% -	38% <mark>28</mark>	% 32%	6			<mark>38%</mark> -32	%	
2.1.2.2	MAJOR CHO METABOLISM.SYNTHESIS.STARCH.					-74%				26	<i>/</i> •	_			<mark>67%</mark> 41	%	
2.1.2.5	MAJOR CHO METABOLISM.SYNTHESIS.STARCH					35%		30%	52%	52	% 30%	6		61%			
2.2	MAJOR CHO METABOLISM.DEGRADATION	35%		19%				25%				37%					
2.2.1	MAJOR CHO METABOLISM.DEGRADATION.SUCROSE	40%				45%		34%					-36%		45%		-24%
2.2.1.3	MAJOR CHO METABOLISM.DEGRADATION	60%	-45%			40%								45%			-30%
2.2.2	MAJOR CHO METABOLISM.DEGRADATION.STARCH		33%	22%			33%		39%	33	% 22%	6 47%	31%		<mark>36%</mark> -29	%	47%
2.2.2.1	MAJOR CHO METABOLISM.DEGRADATION.STARCH	49%		20%		43%						34%	-26%		-40	%	
3	MINOR CHO METABOLISM											35%				_	
3.2	MINOR CHO METABOLISM.TREHALOSE	26%				-35%						45%	5	48%	-29% <mark>45</mark> °	V6	
3.5	MINOR CHO METABOLISM.OTHERS		27%												28%		
3.8	MINOR CHO METABOLISM.GALACTOSE							45%	35%			60%	45%	40%	40%		
4	GLYCOLYSIS										27%	6		-33% -	-13%		
5	FERMENTATION	41%	-41%			59%								_		_	
7	OPP	59%				29%	41%		38%						-41% <mark>38</mark> 9	V6	38%
7.1	OPP.OXIDATIVE PP	56%				26%			44%						419	/6	
8	TCA_ORG TRANSFORMATION					36%			35%	27	1 <mark>0</mark>				539	% 43%	51%
8.1	TCA_ORG TRANSFORMATION.TCA					39%			41%						629	% 42%	55%
8.1.1	TCA_ORG TRANSFORMATION.TCA.PYRUVATE DH					59%									599	%	59%
8.2	TCA_ORG TRANSFOR. ORGANIC ACID TRANSF			38%		33%			31%				23%		289	% 46%	44%
9	MITOCHONDRIAL ELECTRON TRANSPORT_ATP SYNTHESIS				36%												41%
9.1	MITOCHONDRIAL ELECTRON TRANSPORT_ATP SYNTHESIS.NADH-DH																55%
9.1.2	MITOCHONDRIAL ELECTRON TRANSPORT_ATP SYNTHESIS.NADH-DH																55%
9.7	MITOCHONDRIAL ELECTRON TRANSPORT_ATP SYNTHESIS.				54%												43%
9.9	MITOCHONDRIAL ELECTRON TRANSPORT_ATP SYNTHESIS.F1-ATPASE		56%														47%
10.1	CELL WALL.PRECURSOR SYNTHESIS					59%		-32%			-38%	6	_			_	_
10.2	CELL WALL.CELLULOSE SYNTHESIS	-34%			-36%			-49%	-	30%	-47%	% -40 %	6	43%		-26%	6
10.3	CELL WALL HEMICELLULOSE SYNTHESIS					76%						_					
10.5	CELL WALL CELL WALL PROTEINS	-30%		30%					_		-38%	6		-20%		16%	19%
10.6	CELL WALL.DEGRADATION				-43%	30%			-	31%	-38%	6		-28%	36% 339	16	-27%
10.6.1	CELL WALL.DEGRADATION.CELLULASES AND BETA -1,4-GLUCANASES	-29%			-37%						-46%	6	46%	-41%	44%	_	-27%
10.6.2	CELL WALL.DEGRADATION.MANNAN-XYLOSE-ARABINOSE-FUCOSE			44%	-51%				_		-41%	6			41	16	
10.6.3	CELL WALL.DEGRADATION.PECTATE LYASES AND POLYGALACTURONASES	Ι.		1	-32%	32%			-	37%	-34%	6		-26%	37%		-25%
10.7	CELL WALL.MODIFICATION		-31%		-29%	20%		-24%	-	37%	-43%	6 -29%	6	-29%			-31%
10.8	CELL WALL.PECTIN*ESTERASES			21%		29%			31%		-48%	6	45%		42% 29	% 32%	27%
10.8.1	CELL WALL.PECTIN*ESTERASES.PME								23%		-49%	6	37%		43%		20%

se nadaljuje

nadaljevanje Preglednice 13: Rezultati analize gensko obogatitvene metode (GSEA)

		NahG	-Désirée	e spodnji	Dé	sirée spo	dnji		Désirée zg	ornji	
BIN	Funkcionalne anotacije	1	3 4	5 7	1	3 4	5 7	1 3	4 5 1	8	9 11
11.1	LIPID METABOLISM.FA SYNTHESIS AND FA ELONGATION	Ľ		28%		-		-39% -35%	-28%		
11.1.8	LIPID METABOLISM.FA SYNTHESIS AND FA ELONGATION.ACYL COA LIGASE	34%	_	23%							-31%
11.2	LIPID METABOLISM.FA DESATURATION	-60%	40%				45% -35%		-70%	0.(-40% 65%
11.5	LIPID METABOLISM. PHOSPHOLIPID SYNTHESIS LIPID METABOLISM. 'EXOTICS' (STEROIDS, SOUALENE ETC)	37%		35%			40%		-4:	1%0	
11.8.1	LIPID METABOLISM.'EXOTICS' (STEROIDS, SQUALENE ETC	53%	39%	53%							
11.9	LIPID METABOLISM.LIPID DEGRADATION	33% -3	4%	31%					-37% <mark>24%</mark> -31	%	
11.9.2	LIPID METABOLISM.LIPID DEGRADATION.LIPASES	33%							-33	%	
11.9.3	LIPID METABOLISM.LIPID DEGRADATION.LYSOPHOSPHOLIPASES	21% -2	.0%	1194					-18%	-23%	
11.10	LIPID METABOLISM.ELI ID DEGRADATION, BETA-OAIDATION LIPID METABOLISM.GLYCOLIPID SYNTHESIS	-5	0% -60%	-55% -65%					40% -55%	-40%	
12	N-METABOLISM				32%		-35%		-21	% 44%	29%
13.1	AMINO ACID METABOLISM.SYNTHESIS			29%					-33%	33%	43%
13.1.1	AMINO ACID METABOLISM SYNTHESIS CENTRAL AMINO ACID METABOLISM	37%	39%	53%	26	5% 16%	24% 26%	24% 39%	42%		29% 34%
13.1.3	AMINO ACID METABOLISM STNTHESIS OLO TAMATE FAMILI AMINO ACID METABOLISM SYNTHESIS ASPARTATE FAMILY	40%	2 /0	35%	-4:	2%		-52%	-37	% 38%	42%
13.1.3.4	AMINO ACID METABOLISM.SYNTHESIS.ASPARTATE FAMILY.METHIONINE	43%		46%				-51%	-46	<mark>%</mark> 43%	31%
13.1.4	AMINO ACID METABOLISM.SYNTHESIS.BRANCHED CHAIN GROUP	20%							30%	35%	43%
13.1.4.1	AMINO ACID METABOLISM SYNTHESIS.BRANCHED CHAIN GROUP.COMMON	20%	2004						32% -48	48%	36%
13.1.5.3	AMINO ACID METADOLISM, STRTIESIS, SEKINE-GLYCINE-CYSTEINE GROUP AMINO ACID METABOLISM, SYNTH, SERINE-GLYCINE-CYSTEINE GROUP CVS	1	-52%	-48%	61)%		32%			42% 52%
13.1.6	AMINO ACID METABOLISM.SYNTHESIS.AROMATIC AA			23% 20%	-36%		50%		-59%	29%	40%
13.1.6.1	AMINO ACID METABOLISM.SYNTHESIS.AROMATIC AA.CHORISMATE	-43%		43% 33%	43%		50%	I	-55%	28%	45%
13.1.7	AMINO ACID METABOLISM.SYNTHESIS.HISTIDINE		0.04					-67%	-48%		48%
13.2 13.2 2	AMINO ACID METABOLISM.DEGRADATION AMINO ACID METABOLISM DEGRADATION GUITAMATE FAMILY	<u>55%</u> -2	1%	26%	. 2.	<u>37%</u>	1.9.9/			0/0	220/
13.2.2.3	AMINO ACID METABOLISMEDEURADA HONOLUTAMATE FAMILT AMINO ACID METABOLISM.DEGRADATION.GLUTAMATE FAMILY.ARGININE		1 70	41%	-21	<u>33%</u>	52%	14%	52% 38	%	48%
13.2.3	AMINO ACID METABOLISM. DEGRADATION. ASPARTATE FAMILY	29%			19	9% 51%					
13.2.3.2	AMINO ACID METABOLISM.DEGRADATION.ASPARTATE FAMILY.THREONINE				21	7% 38%					
13.2.4	AMINO ACID METABOLISM DEGRADATION.BRANCHED-CHAIN GROUP	74% -5	2%	-30%	33	8%	74%	52%	-59% 59%	249/	2.9.97
13.2.6	AMINO ACID METABOLISM DEGRADATION SERVICE OF THE AMINO ACID METABOLISM DEGRADATION AROMATIC AA	67% 4	-45%	-43% -33%			4870	43%	33% 43	-24 70	-38%
15.2.0	METAL HANDLING		570	0270	4(5%	35%	22%	-2.7% 2.6%	, vu	557
15.2	METAL HANDLING. BINDING, CHELATION AND STORAGE				46% 48	8%	23% 36%	30%			
16.1	SECONDARY METABOLISM.ISOPRENOIDS			23% 25%							
16.1.2	SECONDARY METABOLISM.ISOPRENOIDS.MEVALONATE PATHWAY SECONDARY METABOLISM ISOPRENOIDS CAROTENOIDS	-4	3% _11%	41% 53%	-51	0%				53%	38% 47%
16.1.5	SECONDARY METABOLISM.ISOPRENOIDS. TERPENOIDS		570 1170	28%	-2:	5%	-33%	-23%			-30%
16.2	SECONDARY METABOLISM.PHENYLPROPANOIDS	-2	3%	32%			26%	-29%	-29% -31%	-26%	
16.2.1	SECONDARY METABOLISM.PHENYLPROPANOIDS.LIGNIN	-2	6%	46%	-34%		35%	-40%	-34% -41%	-34%	
16.2.1.1	SECONDARY METABOLISM.PHENYLPROPANOIDS.LIGNIN	29% -4	3% -57% 7% -38%	-52%	43	36%	-29%	-24%	-33%	-62%	
16.4.1	SECONDARY METABOLISM: NMSC SECONDARY METABOLISM: NMSC.ALKALOID-LIKE	-3	1% 41%			28%	44% -33%		-28% -28	%	-28%
16.7	SECONDARY METABOLISM.WAX	-6	3% -38%				34%	-44%		-31%	-41%
16.8	SECONDARY METABOLISM.FLAVONOIDS	-2	6% 44%	-30%				-17%		-33%	-27% -19%
16.8.1	SECONDARY METABOLISM.FLAVONOIDS.ANTHOCYANINS	-3	7% -51%				26%	1.594	1000	264	200/ 170
16.8.4	SECONDARY METABOLISM FLAVONOIDS DIHYDROFLAVONOLS SECONDARY METABOLISM FLAVONOIDS FLAVONOLS	-2	0%		31	3%	30%	-15%	-40%	-26%	-38% -17%
16.10	SECONDARY METABOLISM.SIMPLE PHENOLS	2	8%	-68% 36%						28%	
17.1	HORMONE METABOLISM. ABSCISIC ACID							29%		-27%	
17.1.3	HORMONE METABOLISM. ABA. INDUCED-REGULATED-ACTIVATED	-2	.6%							1001	
17.2.3	HORMONE METABOLISM AUXIN HORMONE METABOLISM AUXIN INDUCED.REGULATED ACTIVATED	29%					-28%	32%		22%	
17.3	HORMONE METABOLISM. ROXIV. INDOCLORISOLATED - ACTIVATED HORMONE METABOLISM. BRASSINOSTEROID	5576					22%	-30%		2270	
17.3.1	HORMONE METABOLISM.BRASSINOSTEROID.SYNTHESIS-DEGRADATION	-22%				39%	29%	-24%		-37%	
17.3.1.1	HORMONE METAB.BRASSINOSTEROID.SYNTHESIS-DEGRADATION.BRS					_	_		-45	%	
17.3.1.2	HORMONE METABOLISM DRASSINOSTEROID.SYNTHESIS-DEGRADATION.STEROLS	-29%	2004			55%	42%	-39%	-19% <mark>61</mark>	%	
17.4	HORMONE METABOLISM, DRASSINOS LEKOID, SIGNAL TRANSDUCTION HORMONE METABOLISM, CYTOKININ	40%	50%	-32% -43%	55% 25	8%	36%		38%	-23%	
17.4.2	HORMONE METABOLISM.CYTOKININ.SIGNAL TRANSDUCTION	1	24%	-37% -50%	45% 32	2%	42% 34%	29%	29% 42%	-26%	
17.5	HORMONE METABOLISM.ETHYLENE	42% -2	8% 26%	29%		-24%		23% 35%	43%		23%
17.5.1	HORMONE METABOLISM. ETHYLENE.SYNTHESIS-DEGRADATION	23%	36%	29%	2.545		38%	41% 34%	41%	· 0/	34% 25%
17.5.1.2	HORMONE METABOLISM.ETHYLENE.SYNTHESIS-DEGRADATION ACO HORMONE METABOLISM ETHYLENE SIGNAL TRANSDUCTION	55% 4 45% 2	5% 45%	-2.3% 3.3%	35%	48%	60%	30% 43%	65% -35 54%	70	38%
17.5.3	HORMONE METABOLISM. ETHYLENE.INDUCED-RESPONSIVE-ACTIVATE	44%	-29%	-38%							-47%
17.6	HORMONE METABOLISM.GIBBERELIN				-3	0%		-40% -21%	-16%		-28%
17.6.1	HORMONE METABOLISM.GIBBERELIN.SYNTHESIS-DEGRADATION		-42%					-39%	-17%		-44% -28%
17.7	HORMONE METABOLISM JASMONATE	26%		28%			-30%				
17.7.1.2	HORMONE METABOLISM. JASMONATE. STNTHESIS-DEUKADATION HORMONE METABOLISM. JASMONATE. SYNTHESIS-DEGRAD LIPOXYGENASE	2076		39%			-20%	71%	36%		
17.8	HORMONE METABOLISM.SALICYLIC ACID	-3	3% -42%				-46%		-29%		
17.8.1	HORMONE METABOLISM.SALICYLIC ACID.SYNTHESIS-DEGRADATION	-3	8% 43%	-14%			-48%	L		_	
19	TETRAPYRROLE SYNTHESIS	-42%	-26%	-31%		47%	57%	1	40% -57% 26	%	56%

se nadaljuje

		NahG-Désirée spodnji	Désirée spodnji	Désirée zgornji						
BIN	Funkcionalne anotacije	1 3 4 5 7	1 3 4 5 7	1 3 4 5 7 8 9 11						
20.1.2	STRESS.BIOTIC.RECEPTORS	46% 25% 34% 22%	-22% 41%	33% -37% 32%						
20.1.3	STRESS.BIOTIC.SIGNALING	26% 51% 37%	-34%							
20.1.7	STRESS.BIOTIC.PR-PROTEINS	19% <mark>-34%</mark> 27% 32%	-22% <mark>24%</mark> -31%	24% 27% -17% 34% -24%						
20.1.7.6	STRESS.BIOTIC.PR-PROTEINS.PROTEINASE INHIBITORS	-32% -30% -32% 35%	-22% <mark>39%</mark>	22% 30% 41% -16% -29%						
20.1.99	STRESS.BIOTIC.MISC	42% 17%	-50%	-38%						
20.2.1	STRESS.ABIOTIC.HEAT	30%	25% 30% 35%	<u>19% 21%</u> -33% -22%						
20.2.2	STRESS.ABIOTIC.COLD	33% 46% 50%	29% 33% 29%	38% 54% -29% 46%						
20.2.3	STRESS ABIOTIC TOUCH WOUNDING		50%	25% 42% 36%						
20.2.99	STRESS ABIOTIC UNSPECIFIED		3078	2376 4076						
21	REDOX			-33%						
21.1	REDOX. THIOREDOXIN			-28% 34% 46%						
21.2	REDOX.ASCORBATE AND GLUTATHIONE		22%							
21.2.1	REDOX.ASCORBATE AND GLUTATHIONE.ASCORBATE	-45%	-70%	-55%						
21.2.2	REDOX.ASCORBATE AND GLUTATHIONE.GLUTATHIONE		37% 26%	44%						
21.4	REDOX.GLUTAREDOXINS	-36%	-22%	-42%						
21.0	REDOX.DISMUTASES AND CATALASES	-26% -32% -	48%	32% 35%						
22.1	POLTAMINE METADOLISM POLYAMINE METADOLISM SYNTHESIS	47% 40%	1.40/	-30% 20%						
23	NUCLEOTIDE METABOLISM	3,50/	-1 470	32%						
23.1	NUCLEOTIDE METABOLISM.SYNTHESIS	26%	29%	50% 56% 65%						
23.1.2	NUCLEOTIDE METABOLISM.SYNTHESIS.PURINE		52% 39%	39% 70%						
23.2	NUCLEOTIDE METABOLISM.DEGRADATION	-40%	31%	56%						
23.3	NUCLEOTIDE METABOLISM.SALVAGE	42% 50% 46%	42%	35% 46%						
23.4	NUCLEOTIDE METABOLISM.PHOSPHOTRANSFER AND PYROPHOSPHATASES	<mark>49%</mark>	-49%	-35%						
23.5	NUCLEOTIDE METABOLISM.DEOXYNUCLEOTIDE METABOLISM	-	-53% -43%	-30% -47%						
25	C1-METABOLISM			48% 65%						
26.1	MISC.MISC2	2.54	23%	38%						
26.3	MISC. UDP GLUCOSYL AND GLUCORONYL TRANSFERASES	25%	33%	-31% -28% -28%						
26.4	MISC BETA 1.3 GLUCAN HYDROLASES	-24% 28% 24%	-45%	-48%						
26.7	MISC.OXIDASES - COPPER, FLAVONE ETC	43% 23%	31%	31% 41%						
26.8	MISC.NITRILASES, *NITRILE LYASES, BERBERINE BRIDGE ENZYMES, ,	29%	_	-29% -13% 13%						
26.9	MISC.GLUTATHIONE S TRANSFERASES	32% -29% 34% 38% -	-26% 38% 34%	-34% -28%						
26.10	MISC.CYTOCHROME P450	-26% -25% 22%	25%	<u>35%</u> 30% 20% -22% -25% -20%						
26.12	MISC.PEROXIDASES	32% 37%	-41%	32% 29% -20% 29% 25% 20%						
26.13	MISC. ACID AND OTHER PHOSPHATASES	-27% 20%								
26.10	MISC.MYROSINASES-LECTIN-JACALIN	32% 40%	-30% -25%	-36%						
26.19	MISC PLASTOCYANINJIKE	19% 33%	-33% 24% -43%	-52% -38% -52%						
26.21	MISC PROTEASE INHIBITOR SEED STORAGE LIPID TRANSFER PROTEIN (LTP)	-24%	20% -29%	27% -25%						
26.28	MISC.GDSL-MOTIF LIPASE	-42% -57%	-33% -30%	-42% -29% -38% -19% -33%						
27.1.2	RNA.PROCESSING.RNA HELICASE	37% -31%	44% 21%							
27.3.3	RNA.REGULATION OF TRANSCRIPT. APETALA2_ETHYLENE-RESPONSE	-41% -30%	-28%	23%						
27.3.6	RNA.REGULATION OF TRANSCRIPTION.BHLH, BASICHLH FAMILY	-27% -40% -28%								
27.3.7	RNA.REGULATION OF TRANSCRIPTION.C2C2(ZN) CO-LIKE, CONSTANS-	21%		<u>52%</u> <u>38%</u> -24%						
27.3.8	RNA.REGULATION OF TRANSCRIPTION.C2C2(ZN) DOF ZINC FINGER FAMILY	39%	-56% -33%	-37% -33%						
27.3.11	RNA.REGULATION OF TRANSCRIPTION C2U2(ZN) GATA IF FAMILY RNA.REGULATION OF TRANSCRIPTION C2H2 ZINC FINGER FAMILY	-30%		-2176						
27.3.12	RNA.REGULATION OF TRANSCRIPTION.C3H ZINC FINGER FAMILY	-28% -48%		-36% -32% -20%						
27.3.21	RNA.REGULATION OF TRANSCRIP.GRAS TRANSCRIPTION FACTOR FAMILY	43% -57%								
27.3.22	RNA.REGULATION OF TRANSCRIPTION.HB,HOMEOBOX TF FAMILY	-36% -45% -47%	33%	37% 24%						
27.3.24	RNA.REGULATION OF TRANSCRIPTION.MADS BOX TF FAMILY			-16%						
27.3.25	RNA.REGULATION OF TRANSCRIPTION.MYB DOMAIN TF FAMILY	-29%	-41%	-30%						
27.3.26	RNA.REGULATION OF TRANSCRIPTION.MYB-RELATED TF FAMILY	-34% -34% -51% -30%	-28%	-34% 28% -34% -34%						
27.3.27	RNA.REGULATION OF TRANSCRIPTION.NAC DOMAIN TF FAMILY	41% -43% 27%	27% 37%	33% -29% 45% -35% 25% -39%						
27.3.28	KNA. REGULATION OF TRANSCRIPTION.SBP, SQUAMOSA PROMOTER BINDING	-40%	-55% -40%	-30% -40%						
27 3 30	RIVA. REGULATION OF TRANSCRIPTION WRKY DOMAIN TE	42% 31% 40% 25% 45%	37%	45% 40% 35% 31% 47% 30%						
27.3.35	RNA REGULATION OF TRANSCRIPTION BZIP TF	-47% -23% -44%	-2.9%	-35% -29% -29%						
27.3.36	RNA.REGULATION OF TRANSCRIPTION.ARGONAUTE		/ 0	40% -30% 35%						
27.3.44	RNA.REGULATION OF TRANSCRIPTION.CHROMATIN REMODELING FACTORS			-33%						
27.3.50	RNA.REGULATION OF TRANSCRIPTION.GENERAL TRANSCRIPTION	-57%								
27.4	RNA.RNA BINDING	18% 22%	21% 17%	27% 22% 22%						
28.1	DNA.SYNTHESIS_CHROMATIN STRUCTURE	27%	-35%	-37% 31%						
28.1.3	DNA.SYNTHESIS_CHROMATIN STRUCTURE.HISTONE	42% 36% 26%	42% 30% 20%	-28% -53% 30%						

nadaljevanje Preglednice 13: Rezultati analize gensko obogatitvene metode (GSEA)

se nadaljuje

		NahG-Désirée spodnj	i Désirée spodnji	Désirée zgornji
BIN	Funkcionalne anotacije	1 3 4 5 7	1 3 4 5 7	
29.1	PROTEIN.AA ACTIVATION	41	%	-33% 66%
29.2.1	PROTEIN SYNTHESIS RIBOSOMAL PROTEIN	-33% 48% 35% -47	% -45% -53%	-27% -59% 49% 57%
29.2.1.1	PROTEIN.SYNTHESIS.RIBOSOMAL PROTEIN.PROKARYOTIC	-38% 58% 33% -56	% -47% <mark>20%</mark> -47%	-60% 49% 35%
29.2.1.99	PROTEIN.SYNTHESIS.RIBOSOMAL PROTEIN.UNKNOWN	52% <u>39%</u> -39	% -48% -76%	-39% -61% 48% 67%
29.2.3	PROTEIN SYNTHESIS INITIATION	449/ 429/	2.09/	-32% 43%
29.3	PROTEIN STATISTICS ELONGATION PROTEIN TARGETING	31% 36	5970	40%
29.3.1	PROTEIN. TAR GETING. NUCLEUS			-41% 39%
29.3.2	PROTEIN. TARGETING. MITOCHONDRIA			-40%
29.3.3	PROTEIN.TARGETING.CHLOROPLAST	L	-52%	-52% 48% 58%
29.3.4	PROTEIN. TARGETING. SECRETORY PATHWAY	34% 41% 43°	/6	32%
29.3.4.2	PROTEIN TARGETING SECRETORY PATHWAY GOLGI	48% 39	2 4 9 4	2.99/
29.3.4.99	PROTEIN TARGETING.SECRETORY PATHWAY.UNSPECIFIED	42% 42	5470 %	32%
29.4.1	PROTEIN.POSTRANSLATIONAL MODIFICATION.KINASE	22% 38*	<mark>/6</mark>	_
29.4.1.57	PROTEIN.POSTRANSLATIONAL MODIFICATION.KINASE.RECEPTOR	28% 38% 50	<mark>//</mark>	
29.5.1	PROTEIN.DEGRADATION.SUBTILASES	-42% 28*	-29% -35%	36% -35% 28% 21%
29.5.3	PROTEIN. DEGRADATION. CYSTEINE PROTEASE	32% 43*	43% 45% 36%	38% 53%
29.5.4	PROTEIN DEGRADATION ASPARTATE PROTEASE		250/	-38% 23% 16%
29.5.11.1	PROTEIN. DEGRADATION. JERINE FROTEASE PROTEIN. DEGRADATION. UBIQUITIN. UBIQUITIN	32%	2076	37%
29.5.11.3	PROTEIN.DEGRADATION.UBIQUITIN.E2	<mark>47%</mark> -38%	40% 43% 28% 12%	27% 33% 27% -40%
29.5.11.4.3	PROTEIN.DEGRADATION.UBIQUITIN.E3.SCF	36%		
29.5.11.4.3.1	PROTEIN.DEGRADATION.UBIQUITIN.E3.SCF.SKP		30% 30% 43%	30% 48%
29.5.11.4.3.2	PROTEIN.DEGRADATION.UBIQUITIN.E3.SCF.FBOX	36%		
29.5.11.4.5	PROTEIN.DEGRADATION.UBIQUITIN.E3.BTB_POZ CULLIN3	55%	55%	60% 45%
29.5.11.20	PROTEIN DEGRADATION UBIQUITIN UBIQUITIN PROTEASE	60	37% 36%	-48%
29.6	PROTEIN.FOLDING	40%	-41% 34%	-35% -38% 38%
29.7	PROTEIN.GLYCOSYLATION	_	-62%	-43%
29.8	PROTEIN.ASSEMBLY AND COFACTOR LIGATION	-27% -49% -41	2/6	-51% -30% <mark>51</mark> %
30.1	SIGNALLING.IN SUGAR AND NUTRIENT PHYSIOLOGY	-21% -34% 32% 21	42% -47% -47%	-32% -18% -24%
30.2.3	SIGNALLING.RECEPTOR KINASES.LEUCINE RICH REPEAT III	35%	33% -48%	-60% -40% 48% -55% 52% 35% -45%
30.2.8.2	SIGNALLING RECEPTOR KINASES LEUCINE RICH REPEAT VIII SIGNALLING RECEPTOR KINASES LEUCINE RICH REPEAT VIII 2	43% 39	-41% 45% 41%	48% 42% 39%
30.2.11	SIGNALLING.RECEPTOR KINASES.LEUCINE RICH REPEAT XI	33% 33%		
30.2.12	SIGNALLING.RECEPTOR KINASES.LEUCINE RICH REPEAT XII	-31%	-38%	-35%
30.2.16	SIGNALLING.RECEPTOR KINASES.CATHARANTHUS ROSEUS-	36%	_	
30.2.17	SIGNALLING.RECEPTOR KINASES.DUF 26	46% 44% 29	-27%	-51%
30.2.24	SIGNALLING.RECEPTOR KINASES.	38% 54% 38	~ -35% 31%	-27%
30.11	SIGNALLING.CALCHOM	43% -27% -44%	-31/0	
30.11.1	SIGNALLING.LIGHT.COP9 SIGNALOSOME			42%
31.1	CELL.ORGANISATION	23%		
31.2	CELL.DIVISION			-27%
31.4	CELL. VESICLE TRANSPORT	51% 42% 42% 31	36%	45%
33.1	DEVELOPMENT DEVELOPMENT STOR AGE PROTEINS	-30% -28%	-19% -23%	-17%
33.99	DEVELOPMENT. UNSPECIFIED	28%	1970 2970 21970	-3070-2070-2070
34.1	TRANSPORT.P- AND V-ATPASES	44%	1	44%
34.2	TRANSPORT.SUGARS	38%	<u> </u>	-46%
34.3	TRANSPORT.AMINO ACIDS	51% -26% 36	36%	39% -28%
34.0	TRANSPORT.SULPHATE	-52% -48% 57*	-74% -43%	-48% -52% -52% -52% -35%
34.9	TRANSFORT.METABOLITE TRANSFORTERS AT THE ENVELOPE MEMBRANE TRANSPORT.METABOLITE TRANSPORTERS AT THE MITOCH MEMBRANE	-29%	-3576	-34% -42% -27%
34.10	TRANSPORT.NUCLEOTIDES	43% -43%	30%	22% 26%
34.12	TRANSPORT.METAL	29%		26% -32% 23%
34.13	TRANSPORT.PEPTIDES AND OLIGOPEPTIDES	-41%	1	-30%
34.15	TRANSPORT.POTASSIUM	42%	I _	
34.10	TRANSPORT.ABC TRANSPORT AND MULTIDRUG RESISTANCE SYSTEMS	29%	-52%	-30% -32%
34.19	TRANSFORT. MAJOR INTRINSIC PROTEINS	-38% -31% -42%	44% 48% 52%	33% 33% 40%
34.19.1	TRANSPORT.MAJOR INTRINSIC PROTEINS.PIP	-54% -50% -46% -36	% 54% 54%	-39% -43% 46%
34.22	TRANSPORT.CYCLIC NUCLEOTIDE /CALCIUM REGULATED CHANNELS	44%	-28%	44% -24% -56%
34.99	TRANSPORT.MISC			24%
35.1.1	NOT ASSIGNED.NO ONTOLOGY.ABC1 FAMILY PROTEIN	-36% -54% -43% -46	% 43% 46% 46%	-50% -46% -57%
35.1.3	NOT ASSIGNED NO ONTOLOGY ARMADILLO_BETA-CATENIN REPEAT	38%	2007	228/ 208/
35.1.19	NOT ASSIGNED NO ONTOLOGY .PENTATRICOPEPTIDE NOT ASSIGNED NO ONTOLOGY C2. DOMAIN_CONTAINING PROTEIN	-36	-51%	-32% -39%
35.1.21	NOT ASSIGNED.NO ONTOLOGY.EPSIN	50	1 6	
35.1.40	NOT ASSIGNED.NO ONTOLOGY.GLYCINE RICH PROTEINS		32%	
35.1.41	NOT ASSIGNED.NO ONTOLOGY.HYDROXYPROLINE RICH PROTEINS	30%		50% 40%

nadaljevanje Preglednice 13: Rezultati analize gensko obogatitvene metode (GSEA)



4.3.3.6 Dinamika izražanja genov povezanih s primarnim metabolizmom



Slika prikazuje značilno spremenjeno izražanje genov vključenih v primarni metabolizem za rastline 'Désirée' (levo) in rastline NahG-Désirée (desno) 1., 3., 4., 5. in 7. dpi po okužbi z virusom PVY^{NTN}. Prikazani so statistično značilno spremenjeno izraženi geni (FDR p<0.05). Barve prikazujejo diferencialno izražanje: rdeča-indukcija genov, zelena: znižano izražanje. Vizualizirano z orodjem MapMan glede na Map Man ontologijo.

Figure 30: Transcriptional dynamics of genes involved in primary metabolism

Gene expression for cultivar 'Désirée' (left) and NahG-Désirée (right) plants infected with PVY^{NTN} are visualized at 1, 3, 4, 5 and 7 dpi. Only statistically significant DE genes (FDR p<0.05) are shown. Results are color-coded: red up-regulation, green down-regulation. Visualized with MapMan tool according to Map Man ontology.

Dinamiko izražanja genov smo analizirali tudi na nivoju posameznih genov, ki so pripadali določenemu procesu identificiranim z obogatitveno analizo. Dinamiko izražanja genov smo preverili tudi na nivoju genov. Gene smo povezali z njihovimi funkcijami na podlagi ontologije MapMan in jih vizualizirali z orodjem MapMan (Slika 30). Na sliki 30 je predstavljena dinamika izražanja genov v različnih časovnih točkah po okužbi z virusom PVY. Predstavljeni geni so vključeni v primarne metabolne poti. Geni vključeni v svetlobne reakcije, Kalvinov cikel ter metabolizem sladkorjev so se dinamično regulirali skozi čas. Izražanje genov vključenih v svetlobne reakcije fotosinteze je v mutantah NahG-Désirée močno spremenjeno.

Izražanje genov, ki kodirajo za različne podenote proteina RuBisCO je specifično regulirana. Okužba rastlin 'Désirée' z virusom PVY je značilno spremenila izražanje treh malih podenot proteina RuBisCO. Vsaka od malih podenot ima specifičen profil izražanja. Medtem ko je virusna okužba znižala izražanje podenote 1 v 1. in 5. dpi po okužbi se je izražanje ostalih dveh podenot močno (RuBisCO podenota 2) ali pa rahlo (RuBisCO podenota 3) induciralo v vseh preiskovanih časovnih točkah. Izražanje velike podenote proteina RuBisCO je sledilo vzorcu izražanja malih podenot 2 in 3 ter je bilo večino časa inducirano.


-1.5 0.0 1.5

Slika 31: Transkripti RuBisCO so specifično regulirani v virusno induciranem odzivu

Vrednosti izražanja genov, ki kodirajo za male in velike podenote RuBisCO ter njegove regulatorje, so podane v obliki logaritma vrednosti izražanja med vzorci okuženimi z virusom PVY in slepo okuženimi rastlinami (log₂FC). Statistično značilne spremembe so predstavljene (FDR corrected p-value < 0.05). NTnetransgene rastline 'Désirée', NahG- rastline NahG-Désirée Barve prikazujejo diferencialno izražanje: rumeno-inducirano izražanje, modro-znižano izražanje, sivo-ni značilne razlike v izražanju

Figure 31: RuBisCO transcripts are specifically regulated in virus-induced responses.

Gene expression values of RuBisCO small and large subunits and its regulators were log_2 transformed and a fold change difference (log_2FC) was calculated for PVY versus mock. Only statistically significant differences between PVY and mock inoculated leaves are presented (FDR corrected p-value < 0.05). The results for two genotypes are shown: NT - nontransgenic plants of cultivar 'Désirée', NahG – transgenic plants of cultivar 'Désirée' overexpressing NahG. Yellow-up-regulated genes; blue-down regulated genes; grey-no statistically significant difference in gene expression.

4.3.3.7 Dinamika izražanja genov iz modela signalizacijskih poti

Ločeno smo interpretirali spremembe v izražanju genov, ki so del našega modela rastlinskega imunskega odgovora (glej poglavje 4.1). V analizo smo vključili tudi njihove direktne interaktorje, kot jih je identificirala študija interaktoma navadnega repnjakovca (Consortium, 2011). Rezultati so prikazani v prilogi (Priloga F).

Nekateri transkripti ET signalne poti se po virusni okužbi povišano izrazijo. Transkripti gena EBF1 (MICRO.1924.C1, MICRO.1924.C2) se po okužbi inducirajo v 1., 5. in 7. dpi, še močnejšo indukcijo kot na mestu virusnega vstopa, pa zaznamo v zgornjih sistemskih listih. Tudi transkripti gena EIL1 in EIN2 se dinamično inducirajo v vseh preiskovanih točkah razen 4. dpi. Nekatere komponente ET signalizacijske poti pa se na virusno okužbo ne odzovejo (EIN5). Izražanje spet drugih genov pa virusna okužba inhibira le v eni sami časovni točki; tako se izražanje gena ERF104, komponente ET signalizacijske poti, zniža le 4. dpi. Zanimivo je profil izražanja istega gena (ERF104) v neokuženih sistemskih listih popolnoma drugačen, tam namreč zaznamo statistično značilno inducirano izražanje gena. ACS, ACO in SAM so encimi vključeni v zaporedne reakcije biosintezne poti ET. Produkt encimske reakcije, ki jo katalizira SAM je substrat za encimsko reakcijo ACS, zadnji v kaskadi encimskih reakcij pa sodeluje encim ACO. Tudi v kaskadnih reakcijah biosinteze je regulacija izražanja genov specifična in časovno natančno regulirana. Virusna okužba na inokuliranih listih ne povzroči sprememb v izražanju genov prve stopnje biosinteze (SAM), izražanje genov, ki kodirajo za encim ACS se le rahlo spremeni, medtem ko virusna okužba najbolj spremeni izražanje gena zadnje stopnje biosinteze ET (ACO). Izmed teh je najmočnejša indukcija transkriptov MICRO.2939.C2, MICRO.2939.C3, POACS09TV in bf arrayxxx 0008a01.t7m.scf, ki jo zaznamo v vseh časovnih točkah. Tudi zgornji sistemski listi na okužbo odgovorijo s spremenjenim izražanjem teh genov v določenih časovnih točkah. Zanimivo se v sistemskih listih zniža število transkriptov gena SAM, 1., 3., 5. in 7., ki je v inokulirani listih neodziven. V rastlinah NahG-Désirée se profili izražanja genov močno spremenijo glede na netransgene rastline. Na primer geni vključeni v ET odgovor rastline (PR3, PR4) se močno inducirajo predvsem pri rastlinah NahG-Désirée v poznih časovnih točkah (5. in 7. dpi).

Večino genov vključenih v signalizacijsko pot JA ter odziv povezan z JA je bodisi neodzivnih na virusno okužbo ali pa se njihovo izražanje po okužbi zniža. Znižano izražanje teh genov zaznamo pulzno, le v določenih časovnih točkah, tako pri netransgenih rastlinah kot genotipu z onemogočeno akumulacijo SA (NahG-Désirée). V inokuliranih listih rastlin 'Désirée' zaznamo tudi znižano izražanje centralnega gena signalizacije poti JA (COI1) predvsem v 5.dpi. Tudi biosintezni geni JA so specifično in

natančno časovno regulirani. Tako v rastlinah 'Désirée' kot tudi mutantah NahG-Désirée po virusni okužbi zaznamo tako indukcijo kot represijo izražanja genov, ki kodirajo za ključne encime biosinteze JA.

Eden najbolj ključnih regulatorjev SA signalizacijske poti, NPR1, se je na virusno okužbo odzval le z rahlo represijo (identifikator MICRO.17159.C1). V NahG-Désirée rastlinah, ki imajo onemogočeno akumulacijo SA, se inducira izražanje genov biosintezne poti SA (PAL1). Največjo indukcijo detektiramo zadnji preiskovani dan (7. dpi). Tudi gen PAD4, ki poveča akumulacijo SA se inducira 5. in 7. dpi. PR2 geni se na okužbo v rastlinah 'Désirée' niso odzvali s spremenjenim izražanjem, smo pa zaznali močno indukcijo teh genov 5. in 7. dpi v rastlinah NahG-Désirée. Tudi nekateri drugi SA odzivni geni (PR5) so se v rastlinah NahG-Désirée inducirali. Na virusno okužbe pa se z močnim dinamičnem reprogramiranjem odzovejo nekateri drugi geni signalizacijske poti SA (TGA6, TGA1, TRX3).

4.3.3.8 Validacija rezultatov DNA-mikromrež z metodo PCR v realnem času

Za validacijo metode mikromrež smo vzporedno analizirali iste vzorce z metodo PCR v realnem času. Analizirali smo 8 biološko relevantnih genov vključenih v fotosintezo (klorofil vezavni protein a-b: CAB in RuBisCO aktivaza: RA), metabolizem sladkorjev (granularn vezana škrobna sintaza I: GBSSI in CwINV: invertaza celične stene) ter odgovor rastline na patogene (β -1,3-glukanaze: Glu-I, Glu-II, Glu-III in s patogenezo povezan protein1b: PR-1b). Analizirali smo vzorce obeh genotipov, ki smo jih podredili mikromrežnim analizam ('Désirée' in NahG-Désirée). Primerjali smo vrednosti izražanja genov v spodnjih listih in sicer 1., 3., 4., 5. in 7 dan po inokulaciji. Rezultati obeh metod so visoko korelirali (korelacijski koeficient = 0,74), kar je pomenilo, da smo uspešno validirali pridobljene rezultate (Preglednica 14).

Preglednica 14: Validacija mikromrežnih podatkov s pomočjo metode RT-qPCR.

Mikromrežne podatke smo validirali s pomočjo metode PCR v realnem času na osmih različnih biološko relevantnih genih (CAB, RA, Glu-I, Glu-II, Glu-III, PR-1b, GBSSI in CwINV). Rezultate smo prikazali kot razliko logaritmiranih (log₂) vrednosti izražanja med PVY^{NTN} in slepo inokuliranimi vzorci za inokulirane liste 'Désirée' in NahG-Désirée pri 1., 3., 4., 5. in 7. dpi. Statistično signifikantne vrednosti (p < 0.05) so prikazane z odebeljeno pisavo. qPCR-vrednosti pridobljene s pomočjo metode RT-qPCR; µm - vrednosti pridobljene s pomočjo mikromrež

Table 14: Validation of microarray results by RT-qPCR.

Microarray results were validated by analyzing eight biologically relevant genes (CAB, RA, Glu-I, Glu-II, Glu-II, PR-1b, GBSSI and CwINV) by quantitative real-time PCR. Expression values were log₂ transformed, and a fold-change difference (log₂FC) was calculated for PVY^{NTN} versus mock in 'Désirée' and NahG-Désirée bottom leaves at 1, 3, 4, 5 and 7 dpi. Statistically significant values (p < 0.05) are marked with bold. qPCR - results of RT-qPCR analysis; μ m – results of microarray

					'De	ésirée'								1	NahG	-Désirée	e				
Ime	Tarčna	1 0	dpi	3	dpi	4	dpi	5 (dpi	7 0	lpi	1	dpi	3	dpi	4	dpi	5	dpi	7	dpi
gena	proba	μm o	qPCR	μm	qPCR	μm	qPCR	μm	qPCR	μm	qPCR	μm	qPCR	μm	qPCR	μm	qPCR	μm	qPCR	μm	qPCR
	cSTD1O21THB	1,4	0,3	0,3	-0,4	1,1	1,3	-0,5	0,4	0,1	2,1	1,0	-0,8	0,1	0,0	0,0	-0,6	0,2	1,3	-0,1	0.6
	MICRO.331.C90	0,1		0,0		0,5		0,1		-0,1		-0,1		-0,1		0,0		0,2		0,0	
	MICRO.331.C84	1,2		0,6		0,6		-0,6		-0,6		-1,1		-0,5		-1,4		-0,7		-1,0	
	MICRO.331.C81	3,5		2,9		2,7		3,3		3,0		-0,8		-0,5		0,6		0,5		-0,8	
	MICRO.331.C62	0,9		0,8		0,8		0,8		0,2		-0,9		0,1		0,0		0,2		-0,3	
CAD	MICRO.331.C60	0,2		-0,1		1,8		-0,1		-0,3		-0,4		0,2		-0,6		0,5		0,0	
CAB	MICRO.331.C89	1,1		-0,4		2,3		-0,9		0,2		-1,4		1,2		0,3		1,6		0,7	
	MICRO.331.C79	0,6		-0,1		2,2		-0,5		-0,4		-0,3		-0,2		-1,8		0,4		0,1	
	MICRO.331.C76	0,9		-0,2		1,4		-0,6		-0,3		0,7		-0,1		-0,1		0,3		0,3	
	MICRO.331.C27	1,7		0,3		2,5		-0,1		1,3		-1,7		0,8		1,0		1,3		0,4	
	MICRO.331.C12	0,8		0,7		0,5		0,1		0,1		0,8		0,0		0,4		0,4		-0,4	
	MICRO.331.C9	0,5		0,1		1,8		-0,1		0,1		0,3		0,5		0,4		0,8		0,3	
CwINV	STMIM75TV	-0,6	-0,6	0,3	0,0	0,0	-1,0	0,1	-1,7	0,5	1,0	0,4	1,1	-0,5	1,0	1,4	1,1	1,5	2,2	1,8	1,7
CDCCI	MICRO.920.C5	0,2	0,4	-0,3	0,4	0,3	0,9	-1,4	-0,8	-0,3	0,3	-0,5	-2,1	0,0	-0,3	-1,3	-1,5	-0,3	-0,3	-0,5	-0,1
GB881	MICRO.920.C2	0,3		-0,4		0,7		-1,5		0,0		-0,4		0,1		-1,4		-0,2		-0,4	
Glu-I	MICRO.2526.C3	0,2	1,5	-0,1	-0,2	0,0	1,8	-0,2	-0,6	0,1	1,8	0,3	4,5	0,2	0,6	0,3	2,8	0,1	2,2	0,4	3,0
	MICRO.2286.C42	-0,6	-0,3	-0,7	-0,6	0,1	0,7	-0,6	-1,7	-0,2	-1,2	0,4	-0,2	-0,7	2,4	-0,8	-1,4	2,1	2,5	3,7	4,3
Glu-II	MICRO.2286.C15	-0,3		-0,7		0,2		-0,9		-0,1		0,7		-0,8		-0,9		1,8		3,9	
Glu-III	MICRO.6187.C2	-0,4	-0,5	-0,3	-0,5	0,4	0,5	0,2	-1,0	0,4	-0,4	-0,3	-0,2	-1,1	-0,5	1,4	0,5	3,6	3,1	3,9	4,6
	MICRO.6187.C1	-0,4		-0,2		0,9		-0,1		0,4		0,1		-1,8		0,6		3,8		4,5	
PR-1b	MICRO.5426.C4	-0,2	-0,6	-1,7	-0,8	0,5	1,3	-1,3	-1,6	1,3	1,5	-1,2	-3,8	-2,3	-2,0	-0,4	0,0	4,4	5,6	5,9	5,4
RA	MICRO.4141.C1	0,2	-0,6	-0,4	-1,0	-0,4	-0,6	-1,3	-1,5	-1,7	-1,8	0,6	-0,9	-0,3	-0,4	-1,0	-0,9	-0,4	0,5	-0,1	0,8

4.3.4 Dinamika fotosinteznih parametrov

Dinamiko fotosinteznih parametrov smo analizirali pri vseh treh genotipih rastlin krompirja ('Désirée', NahG-Désirée in Désirée coi1-RNAi). Spremljali smo dinamiko fotosinteznih parametrov kot posledica virusne okužbe in sicer v 0., 0.13., 1., 3., 4., 5., 7., 8. in 11. dpi v spodnjih in zgornjih istih. Prikazani so rezultati za vzorce slepo inokuliranih rastlin in rastlin okuženih z virusom PVY.

4.3.4.1 Meritve vsebnosti klorofila (SPAD)

Na sliki je prikazana dinamika vsebnosti klorofila v spodnjih inokuliranih (Slika 32) in zgornjih listih (Slika 33) za vse tri genotipe 'Désirée' (NT), NahG-Désirée (NahG) in Désirée coi1-RNAi (COI) merjene v različnih dneh po okužbi.

Vsebnost klorofila je pri vseh spodnjih listih tekom analiziranih dni postopoma padala in dosegla minimum zadnje opazovane dni (8. in 11. dpi). Padec je bil pri okuženih rastlinah močnejši, znižanje pri kontrolnih rastlinah je znak senescence rastlin zaradi starosti oziroma pomanjkanja hranil. Tudi v zgornjih listih smo opazili zmanjšano vrednost klorofila v 11 dnevu (Slika 33).



Slika 32: Vsebnost klorofila v spodnjih listih krompirja 'Désirée' (NT), NahG-Désirée (NahG) in Désirée coi1-RNAi (coi1-RNAi).

Desno so prikazani rezultati meritev za vzorci inokulirane z virusom PVY^{NTN} (PVY), levo pa rezultati meritev izvedenih na slepo inokuliranih listih (MOCK).

Figure 32: Chlorophyll content in bottom potato leaves of cultivar 'Désirée' (NT), NahG-Désirée (NahG) in Désirée coi1-RNAi (coi1-RNAi).

On the right measurements for PVY^{NTN} virus-inoculated plants are shown (PVY), on the left results of measurements on mock treated plants are shown (MOCK).



dpi

Slika 33: Vsebnost klorofila v zgornjih listih krompirja 'Désirée' (NT), NahG-Désirée (NahG) in Désirée coi1-RNAi (coi1-RNAi).

Desno so prikazani rezultati meritev za vzorci inokulirane z virusom PVY^{NTN} (PVY), levo pa rezultati meritev izvedenih na slepo inokuliranih listih (MOCK).

Figure 33: Chlorophyll content in upper potato leaves of cultivar 'Désirée' (NT), NahG-Désirée (NahG) in Désirée coi1-RNAi (coi1-RNAi).

4.3.4.2 Dinamika fotosinteznih parametrov pri spodnjih inokuliranih listiih

Na spodnji sliki (Slika 34) je prikazana dinamika neto fotosinteze, merjene v μ mol CO₂ m⁻² s⁻¹ v spodnjih listih. Meritev smo izvedli na treh genotipih istega kultivarja; 'Désirée' (NT), NahG-Désirée (NahG) in Désirée coi1-RNAi (coi1-RNAi) ter odziv spremljali do 11. dneva po inokulaciji. Pri vseh genotipih je virusna okužba povzročila statistično značilno znižanje neto fotosinteze iz 4. v 5. dpi (Preglednica 15). Pri rastlinah 'Désirée' in NahG-Désirée je hitremu znižanju v 5. dpi sledilo zvišanje neto fotosinteze v naslednjem dnevu (7. dpi). Pri rastlinah Désirée coi1-RNAi smo predhodno zaznali statistično značilno indukcijo neto fotosinteze iz 3. na 4. dpi (Preglednica 15).





Desno so prikazani rezultati meritev za vzorci inokulirane z virusom PVYNTN (PVY), levo pa rezultati meritev izvedenih na slepo inokuliranih listih (MOCK).

Figure 34: Net photosynthesis in bottom potato leaves of cultivar 'Désirée' (NT), NahG-Désirée (NahG) in Désirée coi1-RNAi (coi1-RNAi).

Na sliki (Slika 35) je prikazana dinamika prevodnosti listnih rež (Slika 35) merjena v mol $H_2O~m^{-2}~s^{-1}$ v spodnjih listih. Meritev smo izvedli na treh genotipih istega kultivarja; 'Désirée' (NT), NahG-Désirée (NahG) in Désirée coi1-RNAi (coi1-RNAi) ter odziv spremljali do 11. dneva po inokulaciji. Statistična analiza je pokazala, da se je prevodnost listnih rež v odgovor na virusno okužbo zmanjšala iz 4. na 5. dpi pri rastlinah vseh treh kultivarjev (Preglednica 15).





Slika 35: Prevodnost listnih rež (mol H₂O m⁻² s⁻¹) v spodnjih listih krompirja 'Désirée' (NT), NahG-Désirée (NahG) in Désirée coi1-RNAi (coi1-RNAi).

Desno so prikazani rezultati meritev za vzorci inokulirane z virusom PVY^{NTN} (PVY), levo pa rezultati meritev izvedenih na slepo inokuliranih listih (MOCK).

Figure 35: Stomatal conductivity (mol H₂O m⁻² s⁻¹) in bottom potato leaves of cultivar 'Désirée' (NT), NahG-Désirée (NahG) in Désirée coi1-RNAi (coi1-RNAi).

Na sliki (Slika 36) je prikazana dinamika transpiracije, merjena v mmol H₂O m⁻² s⁻¹ v spodnjih listih. Meritev smo izvedli na treh genotipih istega kultivarja; 'Désirée' (NT), NahG-Désirée (NahG) in Désirée coi1-RNAi (coi1-RNAi) ter odziv spremljali do 11. dneva po inokulaciji. Za z virusom PVY okužene rastline 'Désirée' in rastline NahG-Désirée smo izmerili podobno dinamiko transpiracije. Začetnemu porastu je sledilo znižanje v 4. dpi, ki je doseglo minimum 5. dpi in zopet rahlo povišanje v sledečih dneh. Pri okuženih rastlinah Désirée coi1-RNAi pa smo statistično značilno povečanje transpiracije zaznali 4. dpi (Preglednica 15).



Slika 36: Transpiracija (mmol H2O m⁻² s⁻¹) v spodnjih listih krompirja 'Désirée' (NT), NahG-Désirée (NahG) in Désirée coi1-RNAi (coi1-RNAi).

Desno so prikazani rezultati meritev za vzorci inokulirane z virusom PVY^{NTN} (PVY), levo pa rezultati meritev izvedenih na slepo inokuliranih listih (MOCK).

Figure 36: Transpiration (mmol H2O m⁻² s⁻¹) in bottom potato leaves of cultivar 'Désirée' (NT), NahG-Désirée (NahG) in Désirée coi1-RNAi (coi1-RNAi).

Na sliki (Slika 37) je prikazana dinamika dejanske fotokemične učinkovitosti (Fv'/Fm'), v spodnjih listih. Ta florescentni parameter je v večini povezan z učinkovitostjo fotosistema II (PSII) (Schreiber, 2004). Meritev smo izvedli na treh genotipih istega kultivarja; 'Désirée' (NT), NahG-Désirée (NahG) in Désirée coi1-RNAi (coi1-RNAi) ter odziv spremljali do 11. dneva po inokulaciji. Pri neokuženih rastlinah 'Désirée' je fotokemična učinkovitost skozi čas zelo stabilna. Okužba z virusom PVY povzroči prehodni padec v fotokemični učinkovitosti 5. dpi. Rastline z onemogočeno akumulacijo SA na okužbo odgovorijo tudi s spremembami na nivoju svetlobnih reakcij saj Fv'/Fm' postopoma pada od 5. dpi dalje. Pri rastlinah Désirée coi1-RNAi je postopno znižanje v fotosintetski učinkovitosti zaznati od 4. dpi naprej tako v okuženih kot v kontrolnih rastlinah.



dpi

Slika 37: Dejanska fotokemična učinkovitost (Fv'/Fm') v spodnjih listih krompirja 'Désirée' (NT), NahG-Désirée (NahG) in Désirée coi1-RNAi (coi1-RNAi).

Desno so prikazani rezultati meritev za vzorci inokulirane z virusom PVY^{NTN} (PVY), levo pa rezultati meritev izvedenih na slepo inokuliranih listih (MOCK).

Figure 37: Actual photochemical efficiency (Fv'/Fm') in bottom potato leaves of cultivar 'Désirée' (NT), NahG-Désirée (NahG) in Désirée coi1-RNAi (coi1-RNAi).

4.3.4.3 Dinamika fotosinteznih parametrov pri zgornjih neinokuliranih listih

Na sliki (Slika 38) je prikazana dinamika neto fotosinteze, merjene v μ mol CO₂ m⁻² s⁻¹ v zgornjih listih. Meritve smo izvedli na treh genotipih istega kultivarja; 'Désirée' (NT), NahG-Désirée (NahG) in Désirée coi1-RNAi (coi1-RNAi) ter odziv spremljali do 11. dneva po inokulaciji. Tudi v zgornjih listih smo največjo spremembo zaznali 5. dpi. Takrat je bila neto fotosinteza pri vseh kultivarjih močno inhibirana, a se je začela vračati na začetni nivo v sledečih dneh (Slika 38).



dpi

Slika 38: Meritve neto fotosinteze (µmol CO₂ m⁻² s⁻¹) v zgornjih listih krompirja 'Désirée' (NT), NahG-Désirée (NahG) in Désirée coi1-RNAi (coi1-RNAi).

Desno so prikazani rezultati meritev za vzorci inokulirane z virusom PVY^{NTN} (PVY), levo pa rezultati meritev izvedenih na slepo inokuliranih listih (MOCK).

Figure 38: Net photosynthesis in upper potato leaves of cultivar 'Désirée' (NT), NahG-Désirée (NahG) in Désirée coi1-RNAi (coi1-RNAi).

Na sliki (Slika 39) je prikazana dinamika prevodnosti listnih rež, merjena v mol $H_2O m^{-2} s^{-1} v zgornjih listih. Meritev smo izvedli na treh genotipih istega kultivarja; 'Désirée' (NT), NahG-Désirée (NahG) in Désirée coi1-RNAi (coi1-RNAi) ter odziv spremljali do 11. dneva po inokulaciji. Dinamika prevodnosti listnih rež v zgornjih listih rastlin 'Désirée' in NahG-Désirée je pokazala, da prehodnemu znižanju do 5.dpi sledi povišana prevodnost v naslednjih dneh. Rastline Désirée coi1-RNAi so se na okužbo z virusom odzvale s prehodnim povečanjem prevodnosti listnih rež v 4. dpi.$



dpi

Slika 39: Prevodnost listnih rež (mol H₂O m⁻² s⁻¹) v zgornjih listih krompirja 'Désirée' (NT), NahG-Désirée (NahG) in Désirée coi1-RNAi (coi1-RNAi).

Desno so prikazani rezultati meritev za vzorci inokulirane z virusom PVY^{NTN} (PVY), levo pa rezultati meritev izvedenih na slepo inokuliranih listih (MOCK).

Figure 39: Stomatal conductivity (mol H₂O m⁻² s⁻¹) in upper potato leaves of cultivar 'Désirée' (NT), NahG-Désirée (NahG) in Désirée coi1-RNAi (coi1-RNAi).

Na sliki (Slika 40) je prikazana dinamika transpiracije, merjena v mmol H₂O m⁻² s⁻¹ v zgornjih listih. Meritev smo izvedli na treh genotipih istega kultivarja; 'Désirée' (NT), NahG-Désirée (NahG) in Désirée coi1-RNAi (coi1-RNAi) ter odziv spremljali do 11. dneva po inokulaciji. Transpiracija, parameter, ki je direktno povezan s prevodnostjo listnih rež, v zgornjih listih rastlin 'Désirée' in NahG-Désirée prav tako pada do 5. dpi in počasi narašča v sledečih dneh. Rastline Désirée coi1-RNAi se na okužbo z virusom odzovejo s prehodnim povečanjem v 4. dpi.



dpi

Slika 40: Transpiracija (mmol H₂O m⁻² s⁻¹) v zgornjih listih krompirja 'Désirée' (NT), NahG-Désirée (NahG) in Désirée coi1-RNAi (coi1-RNAi).

Desno so prikazani rezultati meritev za vzorci inokulirane z virusom PVY^{NTN} (PVY), levo pa rezultati meritev izvedenih na slepo inokuliranih listih (MOCK).

Figure 40: Transpiration (mmol H₂O m⁻² s⁻¹) in upper potato leaves of cultivar 'Désirée' (NT), NahG-Désirée (NahG) in Désirée coi1-RNAi (coi1-RNAi).

Na sliki (Slika 41) je prikazana je dinamika dejanske fotokemične učinkovitosti, v zgornjih listih. Meritev smo izvedli na treh genotipih istega kultivarja; 'Désirée' (NT), NahG-Désirée (NahG) in Désirée coi1-RNAi (coi1-RNAi) ter odziv spremljali do 11 dneva po inokulaciji. Fotosintetska učinkovitost zgornjih listih je veliko bolj stabilna kot v spodnjih listih. Večjih statistično značilnih sprememb v rastlinah okuženih z virusom PVY v primerjavi s kontrolnimi rastlinami tu ni zaznati.





Desno so prikazani rezultati meritev za vzorci inokulirane z virusom PVY^{NTN} (PVY), levo pa rezultati meritev izvedenih na slepo inokuliranih listih (MOCK).

Figure 41: Actual photochemical efficiency (Fv'/Fm') in upper potato leaves of cultivar 'Désirée' (NT), NahG-Désirée (NahG) in Désirée coi1-RNAi (coi1-RNAi) after viral infection (PVY) and in mock (MOCK) treated plants.

4.3.4.4 Povzetek statistične analize dinamike fotosinteznih parametrov

Preglednica 15: Statistična analiza parametrov fotosintetske aktivnosti po okužbi z virusom PVY v inokuliranih listih

Statistično značilno povečanje (+++: p<0,001, ++: p<0,01, +: p<0,05, •: p<0,1) ali zmanjšanje (---: p<0,001, --: p<0,01,-: p<0,05, •: p<0,1) fotosinteznih parametrov je prikazano za zaporedne časovne točke; na primer 1:0 označuje statistično analizo razlik glede na primerjavo med izmerjenimi vrednostmi v 1. dpi in vrednostmi v 0. dpi. Vsi podatki so normalizirani PVY proti slepi kontroli. Rezultati statistične analize so prikazani za vse tri genotipe; 'Désirée', NahG-Désirée in Désirée coi1-RNAi. Prazno polje označuje neznačilno spremembo., Pn- neto fotosinteza, SPAD- vsebnost klorofila, Fv'/Fm'-dejanska fotokemična učinkovitost, Fv/Fm-potencialna fotokemična učinkovitost, ETR-hitrost transporta elektronov, Prev-prevodnost listnih rež, Transp-transpiracija, NA-nimamo podatkov

Table 15: Statistical analysis of photosynthetic parameters following PVY infection in inoculated leaves

The significance of increase (+++: p<0.001, ++: p<0.01, +: p<0.05, •: p<0.1) or decrease (---: p<0.001, --: p<0.01,-: p<0.05, •: p<0.1) in measured parameters of photosynthetic activity is shown for consecutive time points; example 1:0 dpi denotes statistical comparison between measured parameter at 1 dpi compared to the results at 0 dpi. All the data is normalized PVY versus mock treated plants. The statistics for three genotypes is shown: 'Désirée' NT, 'Désirée'-NahG and Désirée coi1-RNAi. An empty field denotes no significance. dpi-days post infection, Pn- net photosynthetic rate, SPAD- chlorophyll content, Fv'/Fm'actual photochemical efficiency, Fv/Fm-potential photochemical activity, ETR-electron transport rate, Prev- stomatal conductivity, Transp- transpiration, NA-data not available,

	dpi	Pn	SPAD	Fv'/Fm'	ETR	Prev	Trans
Désirée NT	0.13:0						
	1:0.13					+	
	3:1						
	4:3				NA	•	-
	5:4				-		
	7:5	+++		+		+	+
	8:7			++			
	11:8					-	-
Désirée- NahG	0.13:0						
	1:0.13						
	3:1						
	4:3	+			NA		-
	5:4		•	-	•	-	•
	7:5					•	+
	8:7			-			
	11:8						
Désirée coil-RNAi	0.13:0					-	-
	1:0.13					•	
	3:1				++		
	4:3	+++		+	NA	+++	+++
	5:4	-		-			
	7:5						
	8:7						
	11:8						

4.3.5 Kopičenje kaloze

V krompirjevih listih okuženih z virusom PVY^{NTN} smo spremljali kopičenje kaloze. Krompirje sorte 'Désirée' (NT) in NahG-Désirée (NahG) smo bodisi okužili z virusom bodisi slepo tretirali kot je opisano v poglavju 3.2.1. Kalozo smo obarvali z barvilom anilin modrim fluorokromom (poglavje 3.2.7) in vizualizirali s pomočjo konfokalnega mikroskopa. Vzorce smo pregledovali 3., 4. in 8. dan po inokulaciji. Pri inokuliranih listih rastline 'Désirée' nismo opazili kaloznih depozitov v nobeni od pregledanih časovnih točk (Slika 42). Kaloza se je deponirala, le pri genotipu z okvarjeno signalizacijsko potjo SA (NahG-Désirée). V PVY^{NTN}-okuženih listih NahG-Désirée rastlin smo opazili kalozne depozite, ki so obdajali nekrotično tkivo lezij in žil. Akumulacija kaloze je sovpadala s pojavom lezij in sicer 4. dan po inokulaciji.



Slika 42: Akumulacija kaloze v listih krompirja 'Désirée' (NT) in NahG-Désirée (NahG) po okužbi z virusom (PVY) in v slepo inokuliranih rastlinah (mock).

Modro-kaloza obarvana z anilin fluorokromom, rdeče-autofluorescenca klorofila, siva-transmisijsko polje, najnižja slika predstavlja superpozicijo.

Figure 42: Callose accumulation in potato leaves of cultivar 'Désirée' (NT) and NahG-Désirée (NahG) after viral infection (PVY) and in mock (mock) treated plants.

Blue for aniline blue, red for background fluorescence, gray for transmission field, most bottom panel for superposition.

Pregledali smo tudi vse slepo inokulirane rastline obeh genotipov, kjer nismo zaznali akumulacije kaloze v nobeni izmed pregledanih časovnih točk.

4.3.6 Virusno-povzročene spremembe proteoma

Spremljali smo kopičenje proteinov v lamini krompirja 'Désirée' (NT), NahG-Désirée (NahG) in Désirée coi1-RNAi. Rastline smo predhodno okužili z virusom ali pa slepo tretirali, kot je opisano v poglavju 3.2.1. Vzorce smo pobirali 4 dan po inokulaciji – ta dan se nam je zdel najprimernejši, saj sovpada z rezultati kopičenja virusa (4.1.1).

Identificirali smo 339 peptidov, od tega jih je 24 bilo statistično značilno izraženih v vsaj enem genotipu. Vrednosti njihovega izražanja so prikazane v spodnji preglednici (Preglednica 16) v obliki logaritmirane vrednosti kvocienta izražanja (log₂FC) med virusno okuženimi vzorci in slepo tretiranimi vzorci. Statistično značilne vrednosti so obarvane rdeče za inducirane proteine ter zeleno za proteine z zmanjšanim izražanjem. Proteinske identifikatorje smo povezali z njihovimi opisi ter MapMan ontologijo, da bi jim določili funkcijo.

Večina identificiranih proteinov je vključenih v proces fotosinteze in sodelujejo bodisi v svetlobnih reakcijah, dihanju ali Kalvinovem ciklu. Ostali identificirani proteini sodelujejo v procesih metabolizma aminokislin, sinteze DNA in tetrapirola, sinteze ter razgradnje proteinov ter transporta. Virusno-odvisna regulacija proteinov je zelo genotipno specifična. V mutantah, ki imajo onemogočeno signalizacijo SA (NahG-Désirée) oziroma JA (Désirée coi1-RNAi) kot statistično značilno izražen protein pojavljajo večinoma drugi proteini kot v netransgenih rastlinah (NT).

Preglednica 16: Analiza krompirjevega proteoma po okužbi z virusom

Preglednica prikazuje proteine v listih krompirja, katerih količina se značilno spremeni ob okužbi z virusom. Analizirali smo lamino spodnjih listov rastlin 'Désirée' (NT), NahG-Désirée (NahG) in Désirée coi1-RNAi (COI) 4. dan po okužbi z virusom PVY^{NTN}. Preglednica prikazuje povprečno razmerje (log₂FC) proteinskega izražanja (PVY proti slepo inokuliranim rastlinam). Značilne vrednosti so obarvane rdeče za inducirane proteine in zeleno za proteine z zmanjšanim izražanjem.

Table 16: Analysis of potato proteome after viral infection

The table shows statistically differentially abundant proteins after PVY^{NTN} infection. Lamina of bottom leaves of 'Désirée' (NT), NahG-Désirée (NahG) and Désirée coi1-RNAi (COI) has been analyzed at 4 dpi. Table show average ratio (log₂FC) of the protein abundance (PVY vs. mock). Significant values (p < 0.05) are colored either red (for up-regulated proteins) or green (for down regulated proteins).

	Identifikator StNIB*	Opis procesa (MapMan BIN)	Protein	NT	NahG	Coi
	01703	PS lightreaction photosystem II	Oxygen-evolving enhancer protein 1 of photosystem II	-0,1	-0,3ª	-0,1
	01703	PSII polypeptide subunits	Oxygen-evolving enhancer protein 1 of photosystem II	0,0	-0,4 ª	-0,1
tion	02747		Photosystem I reaction center subunit IV B	-0,7	-0,3	0,5
htreac	06447		Photosystem I reaction center subunit IV A	0,1	-0,3	0,3
S. Lig	10276	PS.lightreaction.photosystem I. PSI polypeptide subunits	Photosystem I reaction centre protein PsaF, subunit III	0,1	0,2	0,3
Sd	10578		Photosystem I reaction center subunit II protein PsaD	-0,3 ^b	-0,3	0,6
	04304		Photosystem I reaction center subunit VI	2,0	-0,1	-4,1
	10039	PS.lightreaction.ATP synthase	ATP synthase subunit b'	0,8	1,1	-1,4
pirati	02758	PS. photorespiration. aminotransferases peroxisomal	Serine-glyoxylate aminotransferase	-0,8ª	-0,1	0,3
PS. tores	08482	PS.photorespiration.	-0,5 ^b	-0,1	0,0	
Pho	01308	glycine cleavage.	Glycine cleavage system H protein 1	-1,3 ^b	-0,1	-0,7
	09522	PS.calvin cycle.	Ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase	-0,1	0,0	0,2
ı cycle	09522	rubisco interacting	Ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase	-0,2	0,0	0,2
alvir	12767	PS.calvin cycle.TPI	Triosephosphate isomerase	0,4	1,2	0,1
PS c	06521		Fructose-bisphosphate aldolase, class-I	0,2	0,2	-0,2
	12391	PS.calvin cycle.aldolase	Fructose-bisphosphate aldolase	1,4 ^b	0,2	-0,2
	07543		Amino acid binding protein, chloroplastic	1,0	-0,2	-0,3
	11026	amino acid metabolism	Cysteine synthase 2 plastidic	0,2	0,6	-2,4
	07506	tetrapyrrole synthesis.GSA	Glutamate-1-semialdehyde-aminomutase; Tetrapyrrole synthesis	0,2	3,0	2,3
ctions	09597	DNA.synthesis/chromatin structure.histone	Histone H2A variant 1	1,8	2,8 ^b	-0,2
er fun	08144	protein.synthesis.ribosomal protein.prokaryotic.chloroplast	50S ribosomal protein L3	1,3	0,4	-0,3
Oth	07560	protein.degradation.serine protease	ATP-dependent clp protease ATP-binding subunit	0,0	2,7 ^b	-0,9
	12339	transport.p- and v-ATPases. H+-transporting two-sector ATPase	Vacuolar H+-ATPase A2 subunit isoform	2,9ª	0,3	0,3
	15512	not assigned	Thylakoid lumen 18.3 kDa protein	1,9 ^b	1,2	0,6

*(Ramšak in sod., 2014)

^a Podoben trend se nakazuje na nivoju genskega izražanja 4 dpi.

^b Drugačen trend opazimo na nivoju genskega izražanja 4 dpi

rezultate proteomske analize smo primerjali z analizami izražanja genov. Gene in proteine smo med seboj povezali preko unikatnega identifikatorja (Ramšak in sod., 2014). Ker lahko različna zaporedja POCI predstavljajo isti gen, alelno varianto gena ali pa sorodne genske družine se unikatni proteinski identifikator StNIB lahko prevede v več genskih identifikatorjev POCI. Za to so proteinski rezultati povežejo s številnimi mikromrežnimi probami (Preglednica 17).

Preglednica 17: Izražanje genov, ki pripadajo proteinom iz preglednice 14

Preglednica prikazuje vrednosti izražanja genov, ki kodirajo za proteine identificirane v preglednici 14. Prikazane so vrednosti (log₂FC) izražanja genov v 'Désirée' (NT) in NahG-Désirée (NahG) pridobljene z mikromrežami. Vrednosti so barvno kodirane (rdeče-povečano izražanje, zeleno-zmanjšano izražanje. Statistično značilno različne vrednosti izražanja so odebeljene.

Table 17: Expression of genes corresponding to proteins identified in Table 16

The table shows expression of genes corresponding to proteins identified in (Table 16). Gene expression values (log₂FC) form microarray analysis are shown for 'Désirée' (NT) and NahG-Désirée (NahG) plants. The values are color-coded (red-induction of gene expression, green-repression of expression). Statistically significant values are marked as bold.

StNIB			NT						NahG				
	ID	POCI identifikator	1 dpi	3 dpi	4 dpi	5 dpi	7 dpi	1 dpi	3 dpi	4 dpi	5 dpi	7 dpi	
	01703	BPLI18F9TH	1.3	0.6	1.0	-0.3	0.1	-0.3	0.2	-0.5	0.0	-0.7	
		MICRO.1238.C1	0.5	0.4	0.8	0.7	0.4	0.1	0.0	-0.4	-0.5	0.1	
		MICRO.1238.C2	0.0	-0.4	0.2	-1.2	-0.5	-0.8	0.4	-0.7	0.2	-0.8	
		MICRO.1238.C3	0.3	0.1	0.6	-0.8	0.0	-0.9	0.4	-0.6	0.3	-0.8	
		MICRO.1238.C4	0.5	0.1	0.0	0.2	-0.4	0.3	-0.3	-0.4	-0.7	0.1	
		MICRO.3625.C2	0.4	0.4	0.8	0.5	0.3	-0.2	0.1	-0.5	-0.5	0.3	
_		POACT93TP	-0.4	-0.3	0.0	-0.8	-0.5	-0.2	0.1	-0.6	0.2	-0.2	
ction	02747	MICRO.1036.C9	1.0	0.5	0.6	-0.2	-0.2	0.2	0.0	0.0	0.0	-0.6	
reac		MICRO.2391.C1	0.1	0.3	0.1	0.1	0.1	-1.1	0.3	0.0	0.3	-0.6	
ight		MICRO.2391.C2	0.8	0.3	1.0	-1.6	-0.3	-1.1	0.5	-0.8	0.1	-0.6	
S.L	10578	MICRO.1036.C4	N/A										
Ę,	10276	MICRO.3206.C1	0.5	0.0	0.7	-0.9	-0.3	0.0	0.0	-0.6	0.2	-0.4	
		MICRO.3206.C2	-0.3	-0.1	1.1	-1.1	-0.3	-1.5	1.0	-0.8	0.8	-0.3	
		bf mxlfxxxx 0069g12.t3m.scf	0.3	0.3	0.5	0.3	0.1	0.1	0.3	-0.4	-0.3	0.2	
	04304	 MICRO.9133.C3	-0.1	-0.5	0.3	-1.3	-0.4	-1.7	0.4	-0.9	0.2	-0.9	
	10039	BPLI18N7TH	0.1	0.3	0.5	-0.1	0.2	-1.5	0.6	-0.3	0.2	-0.8	
		MICRO.5176.C2	0.2	0.2	0.2	0.0	0.1	-0.1	0.1	0.0	-0.2	-0.1	
		MICRO.5176.C3	0.2	0.2	0.3	-0.2	0.0	-0.5	0.1	-0.2	0.4	-0.8	
	02758	bf arrayxxx 0068e11.t3m.scf	0.5	0.8	-0.3	0.8	0.4	0.4	-0.7	-0.8	-0.8	-0.3	
	08482	bf mxflxxxx 0013e03.t3m.scf	-0.1	-0.1	1.7	0.6	1.1	-0.5	0.6	0.9	1.1	-0.3	
S.		 MICRO.477.C1	-0.7	0.2	0.5	-1.1	-0.2	-1.8	0.4	-1.4	0.5	-0.4	
		MICRO.477.C2	-0.1	0.3	0.6	-1.0	-0.6	-0.3	0.2	-1.3	0.1	0.1	
	01308	MICRO.6371.C1	0.0	0.0	0.0	-0.1	-0.2	0.0	-0.1	0.0	-0.1	0.0	
	09522	cSTB29F24TH	1.3	0.9	0.1	1.0	0.5	-0.9	-0.5	-0.1	0.0	-0.5	
		MICRO.4141.C1	0.2	-0.4	-0.4	-1.3	-1.7	0.6	-0.3	-1.0	-0.4	-0.1	
		MICRO.4141.C2	0.5	-0.2	0.1	-0.7	-0.6	0.6	-0.5	-1.2	-0.7	-0.2	
e		STMDB44TV	0.6	0.4	0.0	-0.2	-0.3	-0.2	-0.4	-0.6	0.2	-0.8	
cyc	12767	MICRO.405.C1	N/A										
vin	06521	MICRO.541.C2	-1.2	-0.6	-0.8	-1.6	-0.7	-1.7	-0.4	-2.3	-0.4	-1.5	
cal	12391	bf_ivrootxx_0045e08.t3m.scf	0.0	-0.1	-0.1	0.2	0.1	-0.2	0.0	0.2	0.2	-0.2	
PS		bf_suspxxxx_0047f04.t7m.scf	0.1	0.0	0.0	0.1	0.3	-0.5	0.2	-0.1	0.0	-0.3	
		cSTS19O24TH	1.7	1.5	0.7	0.6	0.7	-1.7	-0.2	-1.0	0.5	-0.3	
		MICRO.541.C3	-0.8	-0.3	-0.8	-1.0	-1.0	-0.6	-0.3	-1.2	0.0	-0.5	
		MICRO.541.C5	-0.8	-0.4	-0.7	-0.9	-0.6	-0.3	-0.4	-0.7	0.0	-0.3	
	07543	MICRO.1369.C1	-0.1	0.2	-0.2	0.6	0.3	2.2	-0.7	1.0	-0.5	1.0	
		MICRO.1624.C1	0.2	-0.1	0.8	0.2	0.5	1.1	0.5	0.8	0.2	0.4	
	11026	MICRO.3588.C1	0.1	-0.1	0.4	-0.5	-0.5	-0.1	0.7	-0.1	0.0	-0.1	
	07506	bf_swstxxxx_0046f10.t3m.scf	-0.2	0.0	0.3	-0.5	-0.1	0.2	0.4	-0.2	0.5	0.3	
		MICRO.341.C1	0.3	0.1	0.3	0.1	-0.1	-0.3	-0.1	0.1	0.0	0.0	
		MICRO.341.C3	-0.5	0.1	0.2	-0.5	0.6	-0.2	0.5	-0.1	0.8	-0.1	
ions		STMCK81TV	0.4	0.1	0.1	0.2	-0.4	-0.3	-0.1	-0.3	-0.4	-0.4	
Inct		bf_arrayxxx_0047b05.t7m.scf	0.2	0.4	0.5	0.6	0.1	-0.3	0.2	0.4	0.0	0.1	
ər fi	09597	MICRO.2902.C1	-0.3	0.5	0.3	-0.6	0.0	-0.4	0.4	-0.6	0.5	-0.7	
Othe	08144	MICRO.1364.C2	0.0	0.4	-0.2	-0.3	-0.6	1.4	-0.2	0.0	-0.2	0.1	
Ŭ	07560	MICRO.1364.C3	0.6	1.4	0.7	1.4	0.4	1.0	-0.8	0.1	-0.1	0.2	
		POACY64TV	0.9	1.8	0.9	1.4	0.6	1.4	-0.9	-0.2	-0.2	0.4	
		MICRO.443.C1	-0.1	-0.2	-0.2	-0.1	-0.1	-0.1	0.1	0.2	0.2	0.2	
		POADO10TP	0.3	0.3	0.2	0.3	0.1	-0.2	0.1	0.1	0.1	0.0	
	12339	POADO10TV	0.0	0.0	0.2	0.0	0.3	0.3	1.8	2.5	0.2	1.2	
	15512	MICRO.2431.C1	-0.2	-0.2	-0.4	-0.8	-0.8	-1.0	0.2	-0.6	0.2	-0.7	

4.4 DOLOČITEV KLJUČNIH KOMPONENT ODGOVORU RASTLINE NA VIRUSNO OKUŽBO

4.4.1 Izbor glede na transkriptomske analize in podatke modela signalizacijskih poti odgovora rastline na stres

Transkriptomskih analiz smo biološko ovrednotili glede na vključenost v posamezne dele signalizacijskih poti (JA, ET SA), njihovo gensko ontologijo in biološke opise ter poiskali do sedaj še nepoznane gene, ki so kazali visoko odzivnost na virusno okužbo (visoko diferencialno izražanje – log_2FC).

Identificirali smo 176 prob z visokimi značilnimi razlikami v izražanju genov povezanih z omrežjem signalizacije imunskega odziva. Izmed njih smo se osredotočil na 9 biološko relevantnih prob POCI (MICRO.5245.C2, MICRO.5245.C3, MICRO.1134.C1, MICRO.1134.C2, MICRO.1134.C3, MICRO.1134.C4, MICRO.12023.C1, STMGP26TV, MICRO.9054.C1), s statistično značilnimi različnimi vrednostmi izražanja (Preglednica 18, Preglednica 19) in jih podredili natančnejši analizi.

Preglednica 18: Identifikatorji krompirjevih genov StSAPK8, StPK11, StPP2C in StAVR9 in njihovi ortologi v navadnem repnjakovcu

Table 18:	Potato gene	identifiers	of StSAPK8,	StPK11,	StPP2C	in StAVR	9 and	their	Arabidops	is
orthologs										

Gen	Identifikator POCI	Transkript	Identifikator	Tair opis
			TAIR	
StSAPK8	MICRO.1134.C4	gi 76160944 gb DQ191635.1 .1	AT5G66880	SNRK2.3
Serin/treoninska	MICRO.1134.C3	PGSC0003DMT400066617	AT4G33950	SNRK2.6
proteinska kinaza	MICRO.1134.C2	Sotub01g045450	AT3G50500	SNRK2.2
StSAPK8-like	MICRO.1134.C1	FitoID 12090	AT1G10940	SNRK2.4
protein		trQ3HVN8Q3HVN8	AT5G63650	SNRK2.5
StPK11	MICRO.5245.C2	PGSC0003DMT400067426	AT4G33950	SNRK2.6
Serin/treoninska	MICRO.5245.C3	PGSC0003DMT400067427	AT1G10940	SNRK2.4
proteinska kinaza	bf_swstxxxx_0059e01.t3m.scf	PGSC0003DMT400067424	AT1G60940	SNRK2.10
		PGSC0003DMT400067425	AT5G66880	SNRK2.3
		Sotub08g02332	AT5G63650	SNRK2.5
		FItoID 12209		
StPP2C	MICRO.12023.C1	PGSC0003DMT400052937	AT1G07160	PP2C family
Proteinska fosfataza	STMGP26TV	PGSC0003DMT400052938	AT2G30020	AP2C1
2C		PGSC0003DMT400052936	AT2G40180	PP2C5
		gi74474910	AT1G67820	PP2C family
		Sotub09g020420	AT4G08260	PP2C family
		FItoID 7411		
StAVR9	MICRO.9054.C1	PGSC0003DMT400078065	AT1G07160	PP2C family
StAVR9/Cf-9	MICRO.10750.C1	PGSC0003DMT400078066	AT2G30020	AP2C1
rapidly elicited		PGSC0003DMT400078067	AT2G40180	PP2C5
protein 284		Sotub06g032840	AT1G67820	PP2C family
		FitoID13613	AT4G08260	PP2C family

Preglednica 19: Spremembe izražanja genov StSAPK8, StPK11, StPP2C in StAVR9 po okužbi z virusom

V preglednici so prikazane vrednosti (log₂FC) izražanja genov StSAPK8, StPK11, StPP2C in StAVR9 v vzorcih 'Désirée' NT ter transgeni rastlini 'Désirée' NahG za inokulirane liste pri 1., 3., 4., 5. in 7. dnevu po inokulaciji. Vrednosti izražanja za 'Désirée' NT za zgornje, sistemske liste so prikazani za 1., 3., 4., 5., 7., 8., 9. in 11. dpi. Značilnost razlik je predstavljena z barvo polja: zeleno- znižano izražanje, rdeče- povišano izražanje. Stastistično značilne spremembe v izražanju gena so odebeljene (FDR q<0.05).

Table 19: Gene expression profiles following viral infection for StSAPK8, StPK11, StPP2C and StAVR9

Relative gene expression values (log₂FC) for genes StSAPK8, StPK11, StPP2C and StAVR9 are shown 'Désirée' and NahG-Désirée plants for inoculated leaves at 1, 3, 4, 5 and 7 dpi. For systemic leaves in 'Désirée' plants results are shown for 1, 3, 4, 5, 7, 8, 9 and 11 dpi Statistical difference in expression is represented by the colour of cells in the table-green down regulation, red-up regulation. Statsticaly significant changes in gene expression values are bolded (FDR q<0.05).

		Na	NahG-Désirée_spodnji				D	Désirée NT_spodnji				Désirée NT_zgornji							
		1	3	4	5	7	1	3	4	5	7	1	3	4	5	7	8	9	11
	MICRO.5245.C2	-0.3	-0.4	-1.4	-1.1	-1.0	0.5	0.4	-0.3	0.5	-0.2	0.6	0.3	0.0	1.2	-0.4	-0.3	-0.3	-0.6
tPK11	MICRO.5245.C3	0.4	-0.7	-0.7	-0.9	-0.5	0.7	0.4	0.1	0.2	-0.4	0.2	0.2	-0.2	0.9	-0.7	-0.2	-0.4	-0.3
S	bf_swstxxxx_0059e01.t3m.scf	0.0	-0.6	-1.6	-1.0	-1.2	0.0	0.2	-0.4	-0.5	-1.0	-0.2	0.0	-0.6	0.7	-1.5	-0.9	-0.7	-1.2
	MICRO.1134.C1	0.5	1.3	2.1	0.9	0.6	0.4	0.2	0.8	0.1	0.7	0.1	1.1	0.8	0.8	1.1	0.7	0.6	0.5
ıpk8	MICRO.1134.C2	1.0	0.8	1.0	0.5	1.0	0.2	0.2	0.7	0.0	0.6	-0.1	0.5	0.4	0.4	0.6	0.2	0.4	0.3
StSe	MICRO.1134.C3	1.1	1.6	3.1	1.0	1.3	0.8	0.5	1.7	0.6	1.3	0.4	1.3	1.5	1.4	1.4	0.9	1.0	0.8
	MICRO.1134.C4	1.0	1.6	3.2	1.1	1.2	1.0	0.7	1.8	0.8	1.6	0.8	1.3	1.2	1.5	1.7	1.0	1.0	0.9
P2C	MICRO.12023.C1	0.4	-1.3	1.8	-0.6	0.7	-0.6	-0.6	-1.2	-0.4	-0.1	-0.4	0.0	-0.2	0.4	0.1	0.1	0.0	-0.2
StPI	STMGP26TV	0.8	-1.9	2.7	-0.8	0.7	-1.0	-0.7	-1.9	-0.6	-0.1	-0.9	-0.1	-0.1	0.3	0.1	-0.1	-0.1	-0.3
vr9	MICRO.10750.C1	1.4	-1.3	2.4	0.4	1.5	0.1	0.2	-0.6	0.8	0.6	-0.3	0.0	-0.4	0.9	-0.6	0.0	0.3	-0.4
StAv	MICRO.9054.C1	2.3	-1.4	2.3	0.2	2.0	0.4	0.5	-0.2	0.8	0.5	-0.2	0.2	-0.5	0.7	-0.8	0.3	0.0	-0.3

S primerjavo zaporedij z javnimi viri podatkov smo anotirali izbrane sonde POCI kot dve kinazi, StSAPK8 in StPK11, ter dve fosfatazi StPP2C in StAVR9. Obe kinazi pripadata skupini serin/treoninskih kinaz in imata na N- koncu identificirano funkcionalno kinazno domeno z dvojno specifičnostjo (serinsko in treonisko) ter ATP-vezavno domeno. Kot StSAPK8 smo identificirali proteinsko kinazo z genskim identifikatorjem gi|76160944|gb|DO191635.1. ki nalega PGSC0003DMT400066617 najbolj identifikatorju iz krompirjevega genskega modela, vendar obe zaporedji nista identični. PGSC0003DMT400067426, PGSC0003DMT400067427, Sorodna zaporedja PGSC0003DMT400067424, PGSC0003DMT400067425 iz genskega modela krompirja smo podobno analizirali in sestavili v soseske ter predvideli, da opisujejo isto serin/treoninsko kinazo, ki smo jo poimenovali StPK11. Zaporedja identifikatorjev PGSC0003DMT400052937, PGSC0003DMT400052938, genskega modela PGSC0003DMT400052936, PGSC0003DMT400078065, PGSC0003DMT400078066 in PGSC0003DMT400078067 so se poravnala v dve različni soseski, tako smo identificirali dve različni fosfatazi, ki smo ju poimenovali StPP2C in StAVR9.

Z medsebojnem poravnavanjem zaporedij smo identificirali še dve dodatni probi POCI (bf_swstxxx_0059e01.t3m.scf, MICRO.10750.C1), ki hibridizirata s transkripti genov StPK11 in StSAPK8 (Preglednica 18). V preglednici z vrednostmi izražanja genov (Preglednica 19). so predstavljene spremembe v izražanju (log₂FC) za vseh 11 prob.

Transkriptomski rezultati so pokazali, da je bil gen StSAPK8 induciran v vseh opazovanih časovnih točkah, ter v vseh listih tako inokuliranih kot sistemskih okuženih listih rastlin 'Désirée'. V rastlinah NahG-Désirée se gen še močneje inducira in doseže maksimalno izražanje 4. dpi. Druga serin/treoninska kinaza StPK11 ima drugačen profil izražanja. Pri spodnjih listih genotipa 'Désirée' smo zaznali šibkejše odzive, močneje pa se je odzvala v genotipu NahG, kjer je bilo izražanje inhibirano od 3. dneva naprej. V zgornjih listih je začetni indukciji (1. dpi in 5. dpi) sledila inhibicija (7., 8., in 11. dpi). Prav tako smo analizirali izražanje fosfataz po virusni okužbi. NahG-Désirée rastline so se na virusno okužbo odzvale z močno indukcijo obeh fosfataz 4. dpi, izražanje gena StAVR9 pa se je povečalo tudi 1. in 7. dpi. Predhodni dan (3. dpi) smo zaznali močno znižano izražanja gena StPP2C v virusno okuženih rastlinah, ki se je do 4 krat zmanjšalo glede na kontrolo. Podobno zmanjšano izražanje gena StPP2C smo zaznali tudi pri spodnjih listih netransgenih rastlin 'Désirée' in sicer v 4. dnevu.

Gene smo interpretirali v kontekstu signalizacijskih poti imunskega odziva, tako da smo ovrednotili njihov položaj v modelu, ki smo ga predhodno zgradili. Ortologi identificiranih kinaz (StSAPK8 in StPK11) v navadnjem repnjakovcu proteinske družine SnRK2 (AtSnRK2.4 -AT1G10940 in AtSnRK2.1 - AT5G08590) interagirajo s tremi komponentami modela vključenimi v signalizacijsko pot ET (EBF1- AT2G25490 in EBF2- AT5G25350) ter JA (COI1-AT2G39940) (Slika 47A). EBF1/2 sta F box proteina, ki sodelujeta pri razgradnji proteina EIN3. COI1 je ključni regulator sigalizacijske poti JA, ki ima prav tako F-box regulatorno enoto in sodeluje pri JA-odvisni proteasomski razgradnji proteinov JAZ. Ovrednotili smo tudi vključenost fosfataz v signalizacijo imunskega odziva. Ortologi fosfataz StPP2C in StAvr9 v navadnem repnjakovcu (AtAP2C1-AT2G30020) delujejo kot fosfataze MAPK, ki negativno regulirajo MPK4 (AT4G01370) in MPK6 (AT2G43790) (Slika 48 A) (Schweighofer in sod., 2007). Kinazi MAP MPK4 in MPK6 v modelu sodelujeta pri regulaciji komponent biosintezne poti SA (Slika 17).

4.4.2 Analiza nukleotidnega zaporedja genov StSAPK8, StPK11, StPP2C in StAVR9 krompirja sorte 'Désirée'

Gene StSAPK8, StPK11, StPP2C in StAVR9 smo pomnožili iz cDNA krompirja sorte 'Désirée' in jih sekvencirali. Rezultate sekvenciranja smo primerjali z referenčnim zaporedji genov iz podatkovnih.

Zaporedje gena StSAPK8 iz krompirja sorte 'Désirée' smo poravnali z referenčnim zaporedjem gena SAPK8 (gi|76160944|gb|DO191635.1) izoliranega iz sorte 'Kuras' (Slika 43 A). Zaporedje v krompirjih sorte 'Désirée' se od referenčnega zaporedja razlikuje v 2 nt in sicer na mestu 84, kjer je prišlo do zamenjave adenina (A) v timin in na mestu 634, kjer je timin (T) zamenjal gvanin (G). Na aminokislinskem zaporedju se zamenjavi odražata v le eni substituciji. Sekvencirano zaporedje gena StPK11 iz krompirja sorte 'Désirée' smo poravnali s PGSC0003DMT400067426 zaporedjem in identificirali 20 nt razlik med zaporedjema, ki na nivoju proteinskega zaporedja odražata v 2 substitucijah, na mestu 308 asparginsko kislino (D) zamenja glutaminska (E) in na mestu 312 prolin (P) zamenja histidin (H) (Slika 43 B). Podobno smo iz sorte 'Désirée' pomnožili in določili tudi zaporedja sorodna referenčnim zaporedjem izbranih fosfataz. Zaporedje gena StPP2C smo poravnali z zaporedji genskih identifikatorjev gi|74474910|dbj|AB206783.1 in PGSC0003DMT400052936, ter identificirali 26 razlik na nivoju nukletotidnega zaporedja ter 18 nt dolgo delecijo na mestu 278 (Slika 43 C). Nukleotidne spremembe so se na aminokislinskem nivoju odražale v obliki 9 substitucij in delecije 6 aminokislin. Tudi sekvencirano zaporedje gena StAvr9 smo poravnali z referenčnim zaporedjem PGSC0003DMT400078065, vendar med njima nismo identificirali razlik (Slika 43 D).

Slika 43: Poravnava kodirajočih zaporedij krompirjevih genov StSAPK8, StPK11, StPP2C in StAVR9 z referenčnimi zaporedji.

Sekvencirano zaporedje genov pomnoženih iz cDNA krompirja sorte 'Désirée' smo poravnali z referenčnim krompirjevim genom. Kodirajoče zaporedje StSAPK8 je dolgo 1059 nt (A), gena StPK11 1020 nt (B), StPP2C 1161 nt (C) gena StAVR9 pa 1140 nt (D).

Figure 43: Alignment of coding sequences of genes StSAPK8, StPK11, StPP2C in StAVR9 with reference gene sequences.

Nucleotide sequence from potato cultivar 'Désirée' cDNA is aligned to reference potato sequence. Coding sequence of StSAPK8 is 1059 bp long (A), of gena StPK11 1020 bp (B), StPP2C 1161 bp (C) and StAVR9 1140 bp long (D).



4.4.3 Izražanje genov StSAPK8, StPK11, StPP2C in StAVR9 v drugih krompirjevih sortah

Spremembo izražanja genov StSAPK8, StPK11, StPP2C in StAVR9 po okužbi z virusom PVY smo analizirali tudi v drugih krompirjevih sortah, ki so na virus rezistentne ('PW363') in taki, ki kot odgovor na okužbo razvije hipersenzitivni odgovor ('Rywal') ter istemu genotipu, z onemogočeno akumulacijo SA NahG-Rywal (Preglednica 20). Podatke smo pridobili iz mikromrežnih eksperimentov (Baebler in sod., 2014). V eksperimentu so analizirali odgovor rastline v treh časovnih točkah; 1., 3. in 6. dan po infekciji z virusom PVY^{NTN}.

Preglednica 20: Vrednosti izražanja genov StPK11, StSAPK8, StPP2C in StAVR9 v sortah krompirja 'PW363', 'Rywal' in NahG-Rywal

Prikazane so log₂FC vrednosti statistično značilnega (p<0,05) izražanja za gene StSAPK8, StPK11, StPP2C in StAVR9 in njihove tarčne mikromrežne probe. Vrednosti izražanja so predstavljene v treh časovnih točkah (1., 3. in 6. dan po inokulaciji). Statistična značilnost razlik je predstavljena z barvo polja: zelenoznačilno znižano izražanje, rdeče-značilno povišano izražanje, prazna polja-v tej časovni točki gen ni bil značilno izražen.

Table 20: Expression values of genes StPK11, StSAPK8, StPP2C and StAVR9 in potato cultivar. 'PW363', 'Rywal' and NahG- Rywal

Relative statistically significant gene expression values (log₂FC) (p<0.05) for genes StSAPK8, StPK11, StPP2C and StAVR9 are shown. Gene expression was measured in three time points (1, 3, 6 days post inoculation-dpi) for each genotype ('PW363', 'Rywal', NahG-Rywal). Statistical difference in expression is represented by the color of cells in the table-green statistically significant down regulation, red-statistically significant up regulation, empty field-in this time point gene was not significantly differentially regulated

			PW363	5		Rywal		Nal	nG-Ryv	wal
		1 dpi	3 dpi	6 dpi	1 dpi	3 dpi	6 dpi	1 dpi	3 dpi	6 dpi
1	MICRO.5245.C2	-0.2	-0.7	-0.6	1.0	1.1	0.1	0.8	0.3	-0.3
tPK1	MICRO.5245.C3	-0.1	0.0	-0.3	0.2	-0.6	0.2	0.0	0.1	0.0
S	bf_swstxxxx_0059e01.t3m.scf	1.1	1.5	0.3	-1.2	-1.1	0.2	0.0	0.7	1.1
	MICRO.1134.C1	0.5	0.9	0.9	-1.4	-1.5	0.1	-0.5	0.0	0.8
PK8	MICRO.1134.C2	0.7	0.9	1.0	-1.5	-1.5	0.4	-0.9	0.1	1.5
StSA	MICRO.1134.C3	0.7	0.9	0.8	-1.4	-1.0	0.0	-0.4	0.1	1.0
	MICRO.1134.C4	0.5	0.7	0.3	-0.2	0.3	0.3	0.3	0.0	0.4
P2C	MICRO.12023.C1	0.5	0.0	-0.2	0.2	1.7	1.3	0.6	1.2	1.4
StPI	STMGP26TV	-0.3	-0.7	-0.5	0.6	1.9	0.6	1.0	1.3	1.2
VR9	MICRO.9054.C1	-0.1	0.0	-0.1	-0.4	0.7	0.7	0.6	1.9	2.8
StAV	MICRO.10750.C1	-0.2	-0.5	-0.8	0.3	1.9	2.1	0.8	1.8	2.4

4.4.4 Potrditev rezultatov mikromrež za gen StSAPK8 z RT-qPCR

Načrtali smo oligonukleotidne začetnike in probo za analizo izražanja gena StSAPK8 z metodo qPCR (Preglednica 2). Rezultate izražanja gena StSAPK8 pridobljenih z metodo qPCR smo primerjali z rezultati mikromrež. Rezultati obeh metod so zelo primerljivi (Slika 44).

Slika 44: Primerjava profila izražanja gena StSAPK8 pridobljenega z dvema metodama, mikromrežami cDNA(zgoraj) in z RT-qPCR (spodaj).

Vrednosti izražanja za gen StSAPK8 analizirane z cDNA mikromrežami (zgoraj) in z metodo RT-qPCR (spodaj). V preglednici so prikazane vrednosti (log₂FC) izražanja genov v vzorcih 'Désirée' NT in 'Désirée' NahG za inokulirane liste pri 1., 3., 4., 5. in 7. dnevu po inokulaciji. Značilnost razlik je predstavljena z barvo polja: zeleno-značilno znižano izražanje, rdeče-značilno povišano izražanje. Statistično značilno različne vrednosti izražanja gena so odebeljene (FDR q<0,05 za mikromrežne rezultate in t-test p< 0.05 za RT-qPCR).

Figure 44: Comparison of gene expression profiles for StSAPK8 as obtained by two methods, cDNA microarray (upper) an RT-qPCR (bottom).

Gene expression values for StSAPK8 analyzed with a cDNA microarray (upper) and RT-qPCR (bottom) are shown. Gene expression values (log2FC) for gene StSAPK8 are shown in 'Désirée' and NahG-Désirée plants for inoculated leaves at 1, 3, 4, 5 and 7 dpi. Statistical difference in expression is represented by the color of cells in the table-green statistically significant down regulation, red-statistically significant up regulation. Statistically significantly differentially expression is marked as bold. (FDR q<0.05 for microarray results and t-test p< 0.05 for RT-qPCR).

			NahG-	Désirée_	spodnji		Désirée NT_spodnji					
		1	3	4	5	7	1	3	4	5	7	
	MICRO.1134.C1	0.5	1.3	2.1	0.9	0.6	0.4	0.2	0.8	0.1	0.7	
8	MICRO.1134.C2	1.0	0.8	1.0	0.5	1.0	0.2	0.2	0.7	0.0	0.6	
APK	MICRO.1134.C3	1.1	1.6	3.1	1.0	1.3	0.8	0.5	1.7	0.6	1.3	
StS	MICRO.1134.C4	1.0	1.6	3.2	1.1	1.2	1.0	0.7	1.8	0.8	1.6	
	RT-qPCR amplikon	0.9	1.2	2.9	1.3	1.2	1.0	0.5	1.9	0.1	1.1	

4.5 FUNKCIONALNE ANALIZE

Aminokislinska zaporedja kinaz in fosfataz smo podredili filogentski analizi. Poiskali smo vse predstavnike ortologne družine v katero spadata kinazi StSAPK8 in StPK11 ter fosfatazi StPP2C in StAVR9 glede na različne predikcije ortolognih skupin. Za kinazi smo identificirali 24 proteinov, ki spadajo v 5 unikatnih ortolognih skupin glede na predikcijo PLAZA in 6 glede na predikcijo šibkih komponent. Za fosfataze pa 16 proteinov, ki spadajo v 2 unikatni ortologni skupin glede na predikcijo PLAZA in eno skupino glede na predikcijo šibkih komponent. Njihova aminokislinska zaporedja smo poravnali ločeno za fosfataze in kinaze ter vizualizirali s filogenetskim drevesom (Slika 45).



Slika 45: Filogenetski drevesi kinaz (A) in fosfataz (B) z ortologi v krompirju in navadnem repnjakovcu

Filogenetsko drevo serin/treoninskih kinaz StSAPK8 in StPK11 ter njunih ortologov (A) ter filogenetsko drevo fosfataz StPP2C in StAVR9 ter njunih ortologov. Prikazani so geni iz krompirja (Sotub) in navadnega repnjakovca (AT). Poravnavo smo izvedli s pomočjo MUSCLE algoritma, filogenetsko analizo pa s pomočjo NJ metode. Številke na razcepih vej predstavljajo stopnjo zaupanja po metodi »bootstrap« z 1000 ponovitvami.

Figure 45: Phylogenetic tree of serine/threonine kinases and phosphatases with their orthologues in potato and Arabidopsis

Phylogenetic tree of serine/threonine protein kinases StSAPK8 and StPK11 and their orthologues (A) and phylogenetic tree of phosphatases StPP2C and StAVR9 with their orthologues. Genes from two species, potato (Sotub) and Arabidopsis (AT) are shown. Alignment has been performed using MUSCLE algorithm and phylogenetic tree using NJ method. The numbers on the nodes are percentages from a bootstrap analysis of 1000 replicates.

Rezultati filogenetske analize kinaz (Slika 45A) so ločili med dvema kinazama. Proteinsko zaporedje StSAPK8 je v primerjavi s kinazo StPK11 bolj sorodno proteinom SnRK2 iz navadnega repnjakovca. To so serin/treoninske proteinske kinaze, ki pripadajo naddružini SnRK (Sucrose non-fermenting 1-related protein kinases). V navadnem repnjakovcu je družina SnRK2 sestavljena iz 10-ih članov SnRK2.1-SnRK2.10 (Halford in Hey, 2009). Glede na njihove funkcionalne domene, jih razdelimo na tri podskupine (1., 2. in 3. podskupino), ki so označene v fiogenetskem drevesu (Slika 45 A). V 1. skupino spadajo kinaze, katerih izražanje se ne spremeni ob tretiranju z hormonom ABA, v 2. tiste , ki se na tretiranje z hormonom ABA rahlo odzovejo , v 3. pa tiste, kinaze, ki imajo ABA inducibilno domeno. StSAPK8 je najbolj soroden SnRK2.2, SnRK2.3 in SnRK2.6 proteinom, ki imajo t.im ABA-vezavno domeno. StPK11 kaže v primerjavi s proteinom StSAPK8 nizko sorodnost z ostalimi kinazami navadnega repnjakovca (Slika 45 A).

Filogenetska analiza fosfataz (Slika 45B) je pokazala, da smo identificirali dve ločeni fosfatazi, ki pripadata vsaka svoji ortologni skupini; StPP2C pripada ORTHO03D003042 ortologni skupini, (PP2C sorodni proteini), StAVR9 pa ORTHO03D003429 ortologni skupini (domnevni PP2C proteini) in s tem potrdila pravilnost predikcijo ortologni skupin PLAZA.

V naslednji stopnji smo določili funkcionalne domena StSAPK8 na nivoju aminokislinskega zaporedja glede na študijo Kulik in sodelavcev (Kulik in sod., 2011) (Slika 46), ki so analizirali domene proteinov SnRK2. Da bi predvideli ali je tudi protein StSAPK8 eden izmed ABA-odvisnih kinaz smo proteinsko zaporedje StSAPK8 poravnali z zaporedjem vseh proteinov SnRK2 navadnega repnjakovca (AtSnRK2). Na sliki je prikazana poravnava in z označenim aktivnim mestom serinske/treoninske kinaze, ter domeni I in II. StSAPK8 ima tako domeno odgovorno za odgovor na osmotski stres, kakor tudi ABA-specifično domeno. Glede na aminokislinske ponovitve aspartata (D) na C-koncu zaporedja smo protein StSAPK8 uvrstili v skupino 3 skupaj s pripadniki navadnega repnjakovca SnRK2.2, SnRK2.3 in SnRK2.6, ter predvideli njegovo inducibilnost z hormonom ABA. Tudi glede na rezultate filogenetske analize (Slika 45) se je StSAPK8 najbolj soroden proteinom SnRK2.2, SnRK2.3 in SnRK2.6 iz navadnega repnjakovca, ki imajo ABA-inducibilno domeno.



Slika 46: Poravnava zaporedja krompirjevega proteina StSAPK8 z ortologi navadnjega repnjakovca iz družine SnRK2 in analiza njegovih domen

Struktura krompirjevega proteina StSAPK8 je določena glede na struktura proteinov družine SnRK2 navadnega repnjakovca (Kulik in sod., 2011). Katalitična domena serin/treoninskih kinaz je obarvana z zeleno, domena I potrebna za ABA neodvisni odgovor povezan z osmotskim stresom je obarvana z vijolično, domena II potrebna za odgovor povezan s hormonom ABA pa z rdečo. Proteini SnRK2 in StSAPK8 so razdeljeni v skupine (1, 2, 3) glede na aktivacijo z ABA.

Figure 46: Alignment of potato StSAPK8 sequence with Arabidopsis orthologs from SnRK2 family and its domain analysis

Structure of potato protein StSAPK8 is assigned according to the structure of protein family members SnRK2 from Arabidopsis (Kulik in sod., 2011). Catalytically serine/threonine kinase domain is colored in green, domain I -domain involved in ABA-independent activation in response to osmotic stress, characteristic for all SnRK2 colored in violet, II- domain needed for ABA-dependent activation of SnRK2s colored in red. SnRK2s and SAK8 proteins are grouped according to their ability to be activated by ABA.

4.5.1 Proteinski interaktorji kinaz in fosfataz v navadnem repnjakovcu

S pomočjo nadgradnje model s proteinskimi interaktorji ugotovili, da člani skupine kinaz SnRK2 v navadnem repnjakovcu interagirajo s komponentami modela JA in ET (poglavje 4.4.1). Poiskali smo proteinske interaktorje vseh članov skupine AtSnRK2 (AtSnRK2.1-2.10) (Slika 47). Proteina SnRK 2.4 in SnRK2.1 interagirata s komponentami modela, SnRK2.5, SnRK2.7, SnRK2.8 in SnRK2.9 pa nimajo identificiranega proteinskega interaktorja.



Slika 47: Proteinski interaktorji kinaz AtSnRK2.1, AtSnRK2.2, AtSnRK2.3, AtSnRK2.4, AtSnRK2.6 in AtSnRK2.10

A) Interaktorji proteinskih kinaz AtSnRK2.4 in AtSnRK2.1. B) Proteinski interaktorji ABA odvisnih kinaz AtSnRK2.2, AtSnRK2.3 in AtSnRK2.6. C) Proteinski interaktorji ostalih AtSnRK2 proteinov (samo AtSnRK2.10 ima identificirane proteinske identifikatorja). Z močno rumeno je označen preiskovani protein, s svetlo rumeno pa njegovi interaktorji. Z zeleno so obarvane komponente modela signalizacijske poti imunskega odziva, ki smo ga izgradili (poglavje 4.1 in 4.2).

Figure 47: Protein interactors of AtSnRK2.1, AtSnRK2.2, AtSnRK2.3, AtSnRK2.4, AtSnRK2.6 and SnRK2.10

A) Protein interactors of kinase AtSnRK2.4. and AtSnRK2.1 B) Protein interactors of ABA dependent kinases AtSnRK2.2, AtSnRK2.3 in AtSnRK2.6. C) Protein interactors of other AtSnRK2 members (only SnRK2.10 has identified interactors). The investigated proteins are marked with dark yellow and their interactors with light yellow. The components of plant immune signaling model that we build (section 4.1 and 4.2) are colored in green.

Natančneje smo analizirali proteinske interaktorje SnRK2 kinaz navadnega repnjakovca, ki so regulirane s hormonom ABA (AtSnRK2.2, AtSnRK2.3 in AtSnRK2.6) (Slika 47 B). To so kinaze, ki so po filogenetski analizi najbolj sorodne krompirjevi kinazi StSAPK8 in imajo ABA inducibilno domeno. Vse tri kinaze (AtSnRK2.2, AtSnRK2.3 in AtSnRK2.6) interagirajo s proteinom AtABI (AtABI1 in AtABI2), članom podskupine A PP2C fosfataz, ki je vključen v signalizacijsko pot ABA. ABI fosfataze so negativni regulatorji ABA odvisnih SnRK-ov (Kulik in sod., 2011). Proteina AtSnRK2.2 in AtSnRK2.3 pa direktno interagirata tudi s proteinom RCAR11, (imenovanim tudi

PYR/PYL protein), ki je receptor hormona ABA. Tudi protein HAB1, s katerim interagira AtSnRK2.6, je del signalizacijske poti hormona ABA. SnRK2.6 pa interagira tudi z nekaterimi drugimi proteini, ki so vključeni v procese fotosinteze (PPD5), oksidativni stres (CDI3 in RBOH F), v metabolizem maščobnih kislin (RIE3) ter kalcijevo signalizacijo elongacijskih faktorjev (Ca²⁺ binding EF hand family).

Analizirali smo tudi proteinske interaktorje fosfataz AT2G30020 in AT1G07160, ki spadata v skupino PP2C proteinskih fosfataz in sta ortologa fosfataze StAVR9 (Sotub06g032840). Obe fosfatazi se fizično vežeta na komponente MAPK kaskadne poti. Interagirata s proteinsko kinazo MPK4 in proteinsko kinazo MAPK6 (Slika 48). Fosfataza AP2C1 (AT2G30020, ortolog Sotub06g032840) interagira s komponentami signalizacijske poti ABA preko direktne interakcije z receptorjem RCAR11. Zanimiva je tudi povezava fosfataze s kloroplastnimi proteini, AT1G07160 namreč interagira proteinom fostosistema II (PSII) imenovanim HHP2.



Slika 48: Proteinski interaktorji fosfataz PP2C

Interaktorji proteinske fosfataze AP2C1-AT2G30020 (levo) in fosfataze AT1G07160 (desno). Z močno rumeno je označen preiskovani protein, s svetlo rumeno pa njegovi interaktorji. Z zeleno so obarvane komponente modela signalizacijske poti imunskega odziva, , ki smo ga izgradili (poglavje 4.1 in 4.2)

Figure 48: Protein interactors of PP2C phosphatases

Protein interactors of phosphateses AP2C1-AT2G30020 (left) and AT1G07160 (right). The investigated proteins are marked with dark yellow and their interactors with light yellow. The components of plant immune signaling model that we build (section 4.1 and 4.2) are colored in green.

4.5.2 Prehodno utišanje gena StSAPK8

V rastlinah krompirja 'Désirée' in NahG-Désirée smo poskušali z agroinfiltracijo prehodno utišati aktivnost gena StSAPK8. Rezultati analize izražanja StSAPK8 po utišanju so prikazani na spodnji sliki (Slika 49). Kvantificirali smo izražanje gena StSAPK8 v vseh vzorcih pobranih 3. dpi z virusom (oziroma 7. dan po agroinfiltraciji) in primerjali izražanje gena StSAPK8 v rastlinah 'Désirée' in NahG-Désirée.



Slika 49: Relativno izražanje gena StSAPK8 v vzorcih krompirja 'Désirée' (zgoraj) in NahG-Désirée (spodaj).

Prikazani so rezultati izražanja gena StSAPK8 po okužbi z virusom (PVY) ter slepi kontroli (mock). kontrola-rastline predhodno niso bile tretirane z agrobakterijo, agroinf - rastline smo predhodno agroinfiltrirali z agrobakterijo s praznim vektorjem, agroinf_StSAPK8 - rastline smo predhodno agroinfiltrirali z agrobakterijo z vstavljenim konstruktom za utišanje gena StSAPK8.

Figure 49: Relative gene expression of StSAPK8 in potato plants 'Désirée' (upper) and NahG-Désirée (bottom).

Expression of gene StSAPK8 is shown after in plants infected with virus (PVY) and mock inoculated plant. Control - plants with no additional treatment with agrobacteria, agroinf - plants with empty vector agroinfiltration, agroinf_StSAPK8-plants with StSAPK8 silencing construct agroinfiltration

Virusna okužba v vzorcih, ki niso bili tretirani z agrobakterijo je povzročila indukcijo izražanja gena StSAPK8 pri obeh genotipih ('Désirée' in NahG-Désirée). Tako smo še enkrat potrdili rezultate prejšnjih analiz (Poglavje 4.4.4). Pri rastlinah z utišanim genom StSAPK8 nismo zaznali popolnega utišanja, smo pa zaznali utišanje virusno-pogojene indukcije izražanja gena. Pri rastlinah agroinfiltriranih s konstruktom za utišanje gena (agroinf_StSAPK8) namreč ni bilo zaznati razlik med virusno/slepo inokuliranimi rastlinami pri nobenem od proučevanih genotipov ('Désirée' in NahG-Désirée), medtem ko se je v kontrolnih rastlinah obeh genotipov po okužbi z virusom izražanje gena StSAPK8 povečalo.

4.5.3 Analiza dvohibridnega sistema kvasovk identificira StSAPK8 interaktorje

Da bi določili fizične interaktorje krompirjevih kinaz (StSAPK8, StPK11C) in fosfataz (StPP2C, StAVR9, smo izvedli analizo dvohibridnega sistema kvasovk (poglavje 3.2.10.7). Ker kinaze in fosfataze obeh družin v navadnem repnjakovcu vzajemno interagirajo, vendar ne vsak član družine z vsakim, smo preverili, specifično medsebojno interakcijo, da bi predvideli ali predstavljajo verigo v signalizacijski potiimunskega odziva krompirja. Prav tako smo analizirali interakcijo z vektorjem, ki vsebuje zaporedje za krompirjevo fosfatazo StMKP1, in kinazo StWIPK, ki sta se v prejšnjih študijah izvedenih v naši skupini izkazali kot pomembeni regulatorni enoti odziva rastline na okužbo z virusom PVY (Lazar, neobjavljeno).

Rezultati dvohibridnega sistema kvasovk so pokazali, da proteinska kinaza StSAPK8 fizično interagira z vsemi analiziranimi fosfatazami (StMKP1, StPP2C in StAVR9). Kinaza StPK11 pa nasprotno ne reagira s fosfatazo StPP2C niti s fosfatazo StAVR9. Interakcije med proteinom StMKP1 in proteinom StPK11 zaradi tehničnih težav nismo mogli ovrednotiti. Prav tako smo analizirali interakcijo vseh treh fosfataz s kinazo StWIPK, ki je krompirjev ortolog kinaze AtMKP3 navadnega repnjakovca. Rezultati so pokazali, da med njimi ni interakcije.

	StMKP1	StPP2C	StAVR9
StWiPK	Ø	Ø	Ø
StSAPK8	ν	ν	ν
StPK11	N/A	Ø	Ø

Slika 50: Shema rezultatov dvohibridnega sistema kvasovk

Kinaze (StSAPK8, StPK11 in StWIPK) smo vstavili v vektor pGBKT7, ki v sistemu služi kot vektor vabe, fosfataze (StPP2C, StAVR9 in StMKP1) pa v vektor pGADT7, ki služi kot vektor plena. V-potrjena interakcija, Ø–proteina nista v medsebojni interakciji, N/A-rezultati niso na voljo

Figure 50: Scheme of Y2H results.

Interaction between kinases (StSAPK8, StPK11 in StWIPK) and phosphatases (StPP2C, StAVR9 in StMKP1) were evaluated with yeast two hybrid screen. The results of the interaction are shown: V-confirmed interaction, \emptyset -proteins do not interact, N/A-data not available

4.5.4 Vpliv različnih hormonov na izražanje gena StSAPK8

Analizirali smo izražanje gena StSAPK8 v rastlinah, ki so bile tretirane z različnimi fitohormoni; JA, ET, SA in ABA. Rastline krompirja 'Désirée', NahG-Désirée in Désirée coi1-RNAi smo tretirali z različnimi rastlinskimi hormoni (JA, ET, SA, ABA). Po 24 urah smo liste tretiranih rastlin vzorčili in analizirali količino StSAPK8 transkriptov z metodo PCR v realnem času. Relativne vrednosti izražanja gena StSAPK8 v listih krompirja 'Désirée', NahG-Désirée in Désirée coi1-RNAi po tretiranju z različnimi fitohormoni so prikazane na spodnji sliki.

Tretiranje rastlin 'Désirée' z ABA in ET inducira izražanje gena StSAPK8, medtem ko JA povzroči znižanje izražanja gena StSAPK8. Po tretiranju netransgenih rastlin 'Désirée' s SA se izražanju gena StSAPK8 ni spremenilo. Pri transgenih rastlinah NahG-Désirée je imelo največji vpliv na izražanje StSAPK8 tretiranje s SA (uporabili smo analog SA, ki ga encim NahG ne more razgraditi). Relativno izražanje gena je bilo za več kot 2 krat nižje pri SA-tretiranih NahG-Désirée rastlinah kot pri kontrolnih rastlinah. Vpliv drugih hormonov je bil zanemarljiv. Na izražanje StSAPK8 pri transgenih rastlinah z onemogočeno signalizacijsko potjo JA (Désirée coi1-RNAi), sta najbolj vplivala ET in SA. Oba hormona sta v rastlinah Désirée coi1-RNAi statistično značilno povečala izražanje gena StSAPK8.



Slika 51: Relativno izražanje gena StSAPK8 po tretiranju rastlin s fitohormoni JA, ET, SA in ABA Prikazane so vrednosti izražanja gena StSAPK8 v rastlinah 'Désirée', NahG-Désirée in Désirée coi1-RNAi po tretiranju z različnimi hormoni. '*': p<005, '' : p<0,1. Na grafu je označena standardna napaka.

Figure 51: Relative gene expression of StSAPK8 after phytohormone JA, ET, SA and ABA treatment Relative gene expression values are shown for StSAPK8 in 'Désirée', NahG-Désirée and Désirée coil-RNAi plants after different hormonal treatment. '*': p<005, ''': p<0,1. Error bars denote standard error.
5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Manualna izgradnja modela signalizacijskih poti imunskega odziva

S pristopi sistemske biologije smo želeli opisati, raziskati in razumeti imunski odziv rastline na virusno okužbo. Imunski rastlinski odziv je na molekularnem nivoju zelo kompleksen, saj v njem sodelujejo številne komponente, ki ne delujejo neodvisno, temveč so v medsebojni interakciji (Mandadi in Scholthof, 2012, 2013). Interakcije med komponentami so hkrati tudi natančno časovno regulirane (Moore in sod., 2011), kar naredi sistem še kompleksnejši, v funkcijo vpliva vstavi novo spremenljivko, čas.

Da bi razumeli interakcije med komponentami, smo v prvi fazi izgradili model, ki opisuje imunski odziv rastline na virusno okužbo. Modeliranje je poenostavitev realnega stanje, tako da ga razčlenimo in opišemo le s ključnimi komponentami - to omogoča lažjo in boljšo analizo kompleksnih sistemov. Osredotočili smo se na signalizacijske poti treh fitohormonov SA, JA in ET, ki so po dosedanjem znanju ključni regulatorji rastlinskega imunskega odziva (Koornneef in Pieterse, 2008; Love in sod., 2005; Naseem in sod., 2012; Vos in sod., 2015).

Vloga SA pri odgovoru rastline na virusno okužbo je bila opažena že zelo zgodaj. SA sproži številne virusno pogojene spremembe v okuženi rastlini: reprogramiranje izražanja številnih genov, akumulacijo reaktivnih kisikovih zvrsti, razgradnjo jedra in jedrca, indukcijo hipersenzitivnega odgovora, programirane celične smrti, akumulacijo kaloze, in spremembe v obliki in velikosti kloroplastov (Baebler in sod., 2014; Caplan in sod., 2015; Dinesh-Kumar in sod., 2000). JA je hormon, največkrat povezan z napadom rastlinojedih žuželk oziroma nekrotrofičnih patogenov, vendar pa je v zadnjem času prepoznana tudi njena direktna in indirektna (preko regulacije SA) vloga pri odgovoru rastlin na virusne okužbe. Pri kompatibilnih interakcijah so ovrednotili vlogo JA predvsem pri zgodnjem odzivu, kasneje pa naj bi bila njena funkcija manj pomembna (Alazem in Lin, 2015). Dvojna okužba rastlin z virusom PVY in virusom PVX oziroma okužba z virusom PVY je povzročila povečano izražanje genov, ki kodirajo za biosintezne gene oksidolipidne poti (García-Marcos in sod., 2013; Pacheco in sod., 2012). Obe študiji sta pokazali tudi, da se v mutantah, ki imajo okvarjeno signalizacijsko pot JA (COII) v zgodnji fazi okužbe pospeši razvoj simptomov in akumulacija virusnih delcev. V kasnejših fazah okužbe, avtorji niso zaznali razlik v virusni akumulaciji med mutantami in divjim tipom rastlin, kar nakazuje na to, da je imunski odgovor z JA fazno specifičen (Alazem in Lin, 2015). Podobne rezultate kažejo tudi študije drugih kompatibilnih interakcij z virusom na primer rastlina navadnega repnjakovca okužena z virusom CaMV in rastline *Brachypodium distachyon* okužene z virusom *Panicum mosaic virusom* (Love in sod., 2005, 2012; Mandadi in Scholthof, 2012). Lahko-hlapni rastlinski hormon ET ima pomembno vlogo pri različnih razvojnih fazah rastlin, senescenci in zorenju plodov. ET je vključen tudi v imunski odziv rastlin na virusno okužbo in deluje sinergistično z JA (Anderson in sod., 2004). Sodeluje tudi pri razvoju simptomov v rastlinah kumar okuženih z virusom mozaika kumar (CMV), simptomi navadnega repnjakovca okuženega z virusom mozaika cvetače (CaMV) pa so odvisni od interakcije virusnega proteina P6 z nekaterimi komponentami signalizacijske pot ET (Alazem in Lin, 2015; Geri in sod., 2004). Kljub temu, da je njegova vloga pri virusnih okužbah na rastlinah opažena, pa je ET prav tisti hormon, katerega vloga je v tej funkciji najmanj raziskana (Alazem in Lin, 2015).

Izbrali smo primeren formalizem ter ontologijo za modeliranje rastlinskega imunskega odziva (Slika 14) ter določili hierarhije na nivoju komponent in reakcij. Definirali smo biološke komponente ter reakcije med njimi. Komponente in različne tipe reakcij smo po potrebi združevali in tako uvedli hierarhijo na nivoju vozlišč in povezav (Slika 15). Hierarhično izgrajen model je omogočil omogočala primerno poenostavitev modela glede na tip analize, ki smo jo želeli izvesti, hkrati pa je omogočil bolj pregledno vizualizacijo ter interpretacijo vlog posameznih komponent v signalnih poteh. Združevanje v skupine se je izkazalo za optimalno saj je omogočalo enostaven prehod v fokus specifične komponente ter širši pogled z jasnejšo vizualizacijo v naslednjem koraku. Imunski odziv rastline smo opisali kot model s 175 komponentami signalizacijskih poti SA, JA in ET ter 148 interakcijami med njimi (Slika 16). Izgrajen model omogoča konceptualno klarifikacijo kompleksnih signalizacijskih kaskad imunskega odziva. Je uporabno orodje pri interpretaciji komponent imunskega odziva v širšem kontekstu. Omogoča nam, da ovrednotimo posledice sprememb v izražanju, koncentraciji ali aktivnosti gena, proteina ali metabolita. Biološke molekule v celici niso prisotne kot individualna komponenta, vendar medsebojno interagirajo in imajo močan medsebojni vpliv. Preko pozitivnih in negativnih regulacij, se sprememba na nivoju ene komponente lahko odraža v aktivaciji ali inhibiciji velikega števila tarčnih komponent. Povečana aktivnost transkripcijskega faktorja MYC2 regulira izražanje ne samo enega ampak številnih tarčnih genov (VSP2, PDF1.2, JR1, CLH1, THI2.1) in aktivacija se lahko potencira ali pa utiša zaradi dodatnih regulatornih povezav. Tako številni represorji družine JAZ proteinov (JAZ1-JAZ12) onemogočajo delovanje transkripcijskega faktorja MYC2. Številne interakcije je miselno težko zaobjeti in predvideti njihove posledice in produkte. Model signalizacijskih poti rastlinskega imunskega odziva, ki smo ga zgradili, je pri tem v veliko pomoč (Slika 16). Prvotno vizualizacijo in izgradnjo modela smo opravili v programu Cell Illustrator. Za vsako vrsto komponento in reakcijo smo definirali specifično grafično reprezentacijo (Slika 14). Cell Illustrator omogoča modeliranje z enostavnimi diferencialnimi enačbami (ODE), ki so končnemu uporabniku skrite preko uporabniku-prijaznega grafičnega vmesnika. V našem modelu smo se v začetni fazi odločili za uporabo enostavnih masno odzivnih reakcij (ang. mass action model), ki za izračun koncentracije izhodnih komponent (produkta) upoštevajo koncentracije vhodnih komponent (substrata) in hitrost pretvorbe, definirane v obliki avtomatsko ali manualno določene konstante. Tak pristop nam omogoča tudi modeliranje enostavnih povratnih zank, ki so v signalizacijskih poteh bioloških procesov pogosto prisotne. Največja pomanjkljivost modeliranja v Cell Illustrator-ju je, da program ne omogoča avtomatske optimizacije dinamičnih parametrov in ima omejitve pri postavitvi enačb za opis reakcij. Pomanjkljivost pride do izraza pri kinetičnem modeliranju, kadar se velikost in z njo kompleksnost modela povečujeta. V fazi topološkega modeliranja in enostavnega dinamičnega modeliranja se je je Cell Illustrator pokazal kot primerno izbrano orodje.

Kot časovno zelo zahteven proces se je izkazala izgradnja modelov na nivoju pridobivanja informacij. Večino informacij o interakcijah komponent SA, JA in ET je razdrobljenih v posameznih znanstvenih publikacijah. Le redke dele poti, predvsem tiste, ki so opisovale biosintezne poti hormonov, smo lahko pridobili v obliki zaporedno vezanih reakcij, po večini iz podatkovne baze KEGG (Kanehisa in sod., 2012). Ostale informacije so bile razdrobljene v publikacijah z različnimi biološkimi problemi, v najboljšem primeru povzete v opisnih člankih. V izogib izpustu določenih relevantnih informacij in potrditev novo opisanega modela smo se poslužili metod procesiranja naravnih jezikov s tekstovnim rudarjenjem. Izgradili smo Bio3graf metodo, ki sestoji iz serije korakov tekstovnega rudarjenja, pridobivanja informaciji ter vizualizacije pridobljenih povezav v obliki omrežja (Miljkovic in sod., 2012).

5.1.2 Večino novih povezav pridobljenih z Bio3graf metodo je indirektnih

Metoda Bio3graf nam je omogočila, da smo iz prosto dostopne literature pridobili informacije o povezavah med biološkimi komponentami, relevantnih za naš raziskovani problem. Metoda temelji na slovarju, ki smo ga zgradili iz komponent modela, in povečali z njihovimi sinonimi. Izgradnja slovarja, s sinonimi ki se uporabljajo v literaturi je ključnega pomena, saj na njem temelji kvaliteta pridobljenih povezav. Tudi termine, ki opisujejo potencialne interakcije med komponentami, smo oblikovali v slovar in na višjem nivoju abstrakcije združili v enostavne reakcije aktivacije, inhibicije, tvorbe in vezave. Z metodo smo ekstrahirali 1132 unikatnih tripletov, ki smo jih manualno validirali. Pravilne nove povezave smo vključili v osnovni model v obliki usmerjenega omrežja. Z metodo smo model signalizacijski poti SA, JA in ET razširili na 175

komponent in 524 reakcij (Slika 21). Izgrajen toploški model je predstavlja do takrat najbolj natančen opisni model rastlinskega imunskega odziva.

Z metodo smo ekstrahirali 14 novih direktnih povezav (Slika 22). Na primer inhibitorna povezava med EIN3 in EIL1 na ICS1 je ene izmed njih. EIN3 in EIL1 sta transkripcijska faktorja signalizacijske poti ET in tako po navadi študirana v raziskavah, ki analizirajo regulatorje ET poti. Z Bio3graf metodo pa smo odkrili, da sta tudi negativna regulatorja izražanja gena ICS1, ki je ključni člen v biosintezi SA. Z Bio3graf metodo smo prav tako identificirali pozicijo transkripcijskega faktorja WRKY70 ter z mitogeneom aktivirajočih kinaz MAPK. Proteini WKRKY 70 ter MPK3/6 so člani velike skupine transkripcijskih faktorjev imenovanih WRKY oziroma skupine kinaz MAPK, kjer ima vsak pripadnik skupine specifično funkcijo. Umestitev posameznega pripadnika v signalizacijsko pot predstavlja poseben izziv in dobro poznavanje njihovih funkcij. Z Bio3graf metodo smo identificirali nove povezave, reakcije, kjer sodelujejo ti pomembi regulatorji. Transkripcijski faktor WRKY70 inhibira z MeJA spodbujeno izražanje gena PDF1.2 ter izražanje gena ICS1 in s tem nakazuje na njegovo vlogo v navzkrižnem povezovanju med signalizacijskimi potmi JA in SA. Kinazi MPK3 ter MPK4 pa s fosforilacijo treonina 174 stabilizirata protein EIN3 in sta tako njegova pozitivna regulatorja.

Večino (123 novih povezav) pridobljenih povezav z metodo Bio3graf je bilo indirektnih (Slika 21). Le te služijo kot baza za novo znanje o signalizacijskih poteh. Indirektne povezave namreč pomenijo, da med njimi ni dokazov za direktno interakcijo, kljub temu pa količina oziroma aktivnost ene komponente vpliva na količino oziroma aktivnost druge komponente. Direktno povezavo smo namreč definirali kot prenos signala med dvema komponentama brez dodatne vmesne komponente. Na primer, vezava ET na njegov receptor ETR1 je direktna povezava, medtem ko je aktivacija proteina ERF preko signalizacijske poti ET definirana kot indirektna povezava. Dejstvo, da je bilo večino pridobljenih povezav indirektnih, je bilo pričakovano. Literatura namreč poroča o odvisnih interakcijah med komponentami, vendar mehanizem regulacije še mnogokrat ni poznan. Signalizacijske poti SA, JA in ET ne funkcionirajo ločeno, ampak so povezane preko sinergističnih in antagonističnih interakcij, da lahko natančno regulirajo imunski odziv rastline (Alazem in Lin, 2015). Regulacija je kompleksna in v prenos signala vključuje številne komponente. (M. De Vos in sod., 2005; Derksen in sod., 2013; Koornneef in Pieterse, 2008; Pieterse in sod., 2001). Večina indirektnih povezav pridobljenih z Bio3graf metodo je identificirala povezave med komponentami ločenih modelov oziroma povratnih zank regulacije ključnih encimov biosintezne poti hormona. Te informacije so še posebej pomembne za interpretacijo rezultatov v celostnem kontekstu.

Metoda Bio3graf omogoča iskanje povezav med izbranimi biološkimi komponentami (Miljkovic in sod., 2012). Za dodatno nadgradnjo modela z novimi regulatorji (biološkimi komponentami) je potrebna nadgradnja slovarja. Metodo Bio3graf je uporabna tudi za preverjanje novih bioloških dognanj, saj jo lahko ponovno impliciramo po določenem časovnem obdobju (na primer vsako leto) in tako pridobimo rezultate najnovejših raziskav (Miljkovic, 2015). Metodo lahko apliciramo tudi na drugih podatkih in tako pospešimo proces pridobivanja podatkov iz literature.

5.1.3 Konceptualni pregled nad interakcijami med komponentami signalnih poti

Izgradili smo model imunskega odziva, ki je opisuje komponente vključene v odziv rastline na virusno okužbo ter interakcije med njimi. Predstavljen model signalizacijskih poti smo uporabili kot osnovo za nadaljnje delo, različne nadgradnje ter translacijo na model signalizacijskih poti imunskega odziva pri krompirju. Model predstavlja konceptualno klarifikacijo celičnih procesov. Spodaj kot primer diskutiramo interakcije med komponentami signalizacijske poti SA, da bi podrobneje predstavli prostor za dodatne razjasnitve v razumevanju rastlinskega imunskega odziva.

Omejitve modela so večkrat posledica omejitev v bioloških znanjih o tako kompleksnih sistemih, določene komponente sistema še niso identificirane. Sinteza SA poteka po dveh poteh preko encima PAL in encima ICS. Rezultati analiz mutant ics in pal so pokazali, da je izohorizmatna pot primarna pot biosinteze SA pri rastlinah (Seyfferth in Tsuda, 2014). Pri drugi sinteza SA poteka preko večstopenjske encimske reakcije, ki vključuje encima ICS in piruvat liazno aktivnost (Vlot in sod., 2009). ICS v kloroplastih sintetizira pretvorbo horizmata v izohorizmat, ta pa se naprej pretvori v SA (Dempsey in sod., 2011; Seyfferth in Tsuda, 2014). V bakterijah to zadnjo pretvorbo katalizira izopiruvat liaza (IPL). V rastlinah zaenkrat še niso odkrili gena, ki bi kodiral za IPL (Dempsey in sod., 2011; Seyfferth in Tsuda, 2014). Predvidevajo, da obstaja v rastlinah še nedeterminiran kloroplastni encim s tako katalitično funkcijo (Seyfferth in Tsuda, 2014). Zato smo v modelu SA vozlišče encima, ki sodeluje v reakciji pretvorbe izohorizmata v SA poimenovali IPL, po bakterijskem identificiranem encimu, seveda pa zanj še ni poznan genski identifikator. Še vedno pa ni ovržena možnost, da poteka v rastlinah pretvorba izohorizmata v SA prek alternativne poti, ki je drugačna od karakterizirane bakterijske poti.

Izgradnja modela lahko pomaga tudi pri konceptualni razjasnitvi določenih pojavov. Na primer, sinteza SA je natančno regulirana. Po virusni okužbi se koncentracija SA hitro zviša (Carr in sod., 2010), hkrati pa mora biti natančno regulirana tudi njeno odstranjevanje, saj so različne študije pokazale, da ima konstitutivno izražanje SA

negativni vpliv na rast rastline. Ti rezultati nakazujejo, da obstajajo v celici zelo natančni regulatorni mehanizmi, z negativnimi in pozitivnimi povratnimi zankami, ki natančno regulirajo koncentracijo SA in rastlinski celici omogočijo preživetje virusne okužbe. Negativne povratne zanke upočasnijo signalne procese, medtem ko jih pozitivne pospešijo. V bioloških procesih ima pozitivna povratna zanka izjemno pomembno vlogo, saj omogoča hiter odgovor rastline na zunanji signal. V sistemu s pozitivnimi povratnimi zankami povečana koncentracija določenih komponent privede do ojačanja indukcije. Pozitivna povratna zanka je po navadi v povezavi z negativno, ki sistem spravi nazaj v ravnotežno stanje. V modelu smo v SA metabolizmu in signalizacijski poti opazili pozitivno ter negativno regulatorno zanko (Slika 17), kar bi lahko razložilo opaženo natančno regulacijo.

Nekateri mehanizmi regulacije še niso vključeni v model. V zadnjem času so na primer pokazali, da intracelularna koncentracije Ca²⁺ regulira izražanje gena biosintezne poti SA (ICS1) in gena EDS1, glavnega regulatorja pozitivne povratne zanke SA akumulacije (Seyfferth in Tsuda, 2014) preko transkripcijske regulacije s proteini, ki zaznavajo koncentracijo Ca²⁺ (kalcijevi senzorji). Še zmeraj ostaja nepojasnjeno kako rastline natančno časovno in lokalno koordinirajo pozitivne in negativne regulatorje sinteze in akumulacije SA.

Nekatere pomanjkljivosti modela pa izhajajo iz dejstva, da so reakcije določenega dela signalizacijskih/metabolnih poti lahko opisane in potrjene le v modelnem organizmu, ki je bolje raziskan, niso pa še opisane in identificirane v ekonomsko bolj pomembnih poljščinah , kot je krompir. Tako je v primeru encimov ICS1/2 ki sodelujeta v biosintezi SA. Rastlina navadnega repnjakovca vsebuje dva encima ICS (imenovana ICS1 in ICS2). Encima sta si v 83 % podobna v aminokislinskem zaporedju, vendar pa je ICS1 v večji meri sintetiziran v odgovor rastline na okužbo s patogenom (Dempsey in sod., 2011). Ko rastlinsko celico napade patogen, se v navadnem repnjakovcu 90 % vse SA sintetizira preko ICS1 encima (Vlot in sod., 2009). V krompirju s predikcijo še ni identificiran ortolog encimov ICS1 niti ICS2 iz navadnega repnjakovca. Obstaja pa več potencialnih ortolognih genov glede na predikcije PLAZA.

Podobno še ni natančno okarakterizirana percepcija SA. Kljub številnim različnim pristopom identifikacije receptorjev SA veljajo proteini NPR (non-expressor of pathogenesis-related genes) kot najverjetnejši receptorji in regulatorji imunskega odziva (Seyfferth in Tsuda, 2014). NPR1 lahko direktno fizično interagira s SA (Wu in sod., 2012) in regulira s SA-pogojen imunski odziv rastline (Pajerowska-Mukhtar in sod., 2013) zato smo ga v model vključili pod direktno interakcijo s SA. Najnovejše raziskave nakazujejo, na dodaten nivo regulacije. Vezava SA na receptor NPR1 v navadnem

repnjakovcu poteka s pomočjo disulfidnega mostička dveh cisteinov (cistein 521 in cistein 529) v aktivnem mestu receptorja. Ker ti dve cisteinski mesti nista ohranjeni med različnimi rastlinskimi vrstami, se postavlja pod vprašaj evolucijski vidik percepcije SA preko NPR1. Več neodvisnih raziskovalnih skupin je želelo identificirati receptor SA. Glede na širok nabor funkcij v katerih je vpletena SA, nekateri predpostavljajo, da imajo rastline več receptorjev za SA. Zadnja leta so identificirali več proteinov, ki vežejo SA, vendar pa popolno še ne opišejo SA mediiranega odgovora. Fu (Fu 2012) je s sodelavci identificiral dva homologa NPR1, NPR3 in NPR4, kot potencialna modulatorja recepcije SA, ki regulirata vezavo SA na NPR1 preko interakcije s proteinom NPR1. Pri nizkih koncentracijah SA NPR3 povzroči razgradnjo NPR1, pri visokih koncentracijah pa akumulacijo NPR1 regulira NPR3. Natančna regulacija številnih stopenj signalizacijskih poti potrjuje signifikanten pomen natančno časovno in lokalno regulirane signalizacije ter pomen hitre vzpostavitve celične homeostaze (Fu 2012).

Določene predhodno opisane komponente lahko z novimi dognanji dobijo nove vloge ali pa se njihove pozicije v signalizacijskih poteh zaradi novih dognanj spremenijo. Tako na primer protein EDS5 vpliva na akumulacijo SA, vendar je njegova pozicija v signalizacijski kaskadi negotova. Raziskave umestijo protein EDS5 nižje od SA celo pod regulacijo proteinov NPR1 (Dempsey in sod., 2011). Hkrati pa rezultati kažejo, kot na primer povečano izražanje EDS5 proteinov v mutantah *npr1*, da lahko NPR1 inhibira EDS5 (Serrano in sod., 2013). Oba tipa interakcij smo vključili v naš model. Prvega tako da protein EDS5 direktno aktivira biosintezo SA preko aktivacije izražanja gena ICS1 in ICS2 (Slika 17), drugega pa preko pozitivne povratne zanke, kjer SA odvisni proteini aktivirajo izražanje EDS5. Protein EDS5 pa dodatno opisujejo tudi kot transporter, na podlagi homologije skupini transporterjev MATE. Ta njegova funkcija še ni potrjena, predvidevajo pa da bi lahko transportiral regulatorje SA sinteze v kloroplast oziroma eksportiral SA iz kloroplastov v citosol (Serrano in sod., 2013) in jo bomo dodali v model, ko bodo na voljo eksperimentalni dokazi.

Zgoraj navedeno nakazuje na to, da je potrebna nenehna optimizacija modela in integracija novih dognanj. Področje je namreč zelo kompleksno, hkrati pa poteka na temo imunskega odziva rastline mnogo različnih raziskav, ki vsaka doprinese delček k razumevanju celotnega mehanizma. Pristopi sistemske biologije olajšajo integracijo novonastalih dognanj in biološko interpretacijo njihovega pomena v celem biološkem sistemu.

5.1.4 Nadgradnja modela s proteinskimi interaktorji in translacija na krompir

Izgrajen model signalizacijskih poti smo nadgradili ne le z novimi povezavami (metoda Bio3graf), temveč tudi z novimi komponentami. Informacije o novih komponentah smo v model dodali glede na podatke interaktoma navadnega repnjakovca (Consortium, 2011) (Slika 23). To so komponente, ki se fizično vežejo na komponente našega modela, zato so dobro izhodišče za potencialne nove regulatorje imunskega odziva. Predpostavili smo, da imajo lahko pomembno regulatorno funkcijo v imunskem odzivu rastline, zato smo jih dodali v model kot nov nivo regulacije osnovnih komponent manualno izgrajenega modela signalizacijskih poti.

Prevod novonastalega omrežja iz navadnega repnjakovca na krompir nam je omogočal direktno povezavo z mikromrežnimi rezultati izražanja genov. Zaporedja smo prevedli glede na nukleotidne poravnave s pomočjo algoritma BLAST. Tekom doktorskega dela pa je bila na našem inštitutu izgrajena baza GOMapMan (Ramšak in sod., 2014), ki omogoča translacijo genskih identifikatorjev enega organizma na drugega preko ortolognih skupin. V bazi so inkorporirani različni tipi predikcije ortolognih skupin (šibke komponente, PLAZA-dicots, PLAZA-monocots, ITAG-oMCL, ITAG-RSD, PGSC-oMCL (Li in sod., 2003; Proost in sod., 2009; Ramšak in sod., 2014), saj noben od uporabljenih algoritmov za predikcijo ni 100 % točen. Uporaba različnih tipov predikcij ortolognih skupin za prevod omrežja signalizacijskih poti imunskega odziva navadnega repnjakovca na krompir, bi nam lahko služila za dodaten nabor potencialno relevantnih krompirjevih genov.

Translacijska biologija, kjer se informacije iz modelnega organizma prevedejo na (ekonomsko) pomemben organizem postaja vse močnejša in pomembnejša veja bioloških raziskav. Je eden izmed prvih korakov za premostitev razdalj med bazičnim in aplikativnim znanjem (Nelissen in sod., 2014). Najbolj raziskana rastlinska vrsta je navadni repnjakovec, ki pa nima večjega gospodarskega pomena. S pomočjo translacijske biologije lahko znanja, o molekularnih mehanizmih iz navadnega repnjakovca uporabimo za povečanje tolerance na stres pri gospodarsko pomembnih kulturnih rastlinah. Omejitev translacijske biologije je dejstvo, da temelji na predpostavki o ohranjenost ključnih bioloških funkcij med dvema vrstama. Hipoteze, ki jih generiramo moramo zato preveriti v tarčnem organizmu. Metoda nam je omogočala identifikacijo več potencialnih ključnih regulatorjev imunskega odziva krompirja, ki sodelujejo pri obrambnih mehanizmih krompirja proti virusnim škodljivcem.

5.1.5 Odgovor krompirja na okužbo z virusom PVY je zelo dinamičen

Odgovor rastline na okužbo s patogenom je kompleksen in dinamičen proces, ki vključuje spremembe v izražanju velikega števila genov primarnega in sekundarnega metabolizma rastline in posledično obsežne fiziološke spremembe v rastlini (Pieterse in sod., 2012).

V doktorski nalogi smo spremljali kompleksnost rastlinskega imunskega odziva na različnih fizioloških/molekularnih nivojih v odvisnosti od časa okužbe. Kot proučevani sistem smo izbrali krompir sorte 'Désirée', ki se na okužbo z virusom PVY^{NTN} odzove s tolerantnim odgovorom (Mehle in sod., 2004). Poleg analize netransgenih rastlin smo se poslužili dveh transgenih linij, ki sta onesposobljeni v signalizacijskih poteh SA (NahG-Désirée) in JA (Désirée coi1-RNAi). Na ta način smo ovrednotili pomen obeh hormonov na različnih nivojih odziva rastline.

Spremljali smo fenotipske spremembe, ki jih na rastlinah povzroči okužba z virusom PVY^{NTN}, analizirali koncentracijo virusa v inokuliranih listih (Slika 26), ter širjenje virusa po rastlini v sistemske liste (Preglednica 11, Preglednica 12). Čeprav na rastlinah 'Désirée' nismo opazili simptomov (Slika 25), smo opazili povečano koncentracijo virusne RNA v inokuliranih listih od 5. dpi naprej. Virus smo v nizkih koncentracijah posameznih rastlin zaznali tudi v zgornjih listih in sicer prvič 7. dpi (Preglednica 11:). Razlik v virusnem širjenju med 1., 2. in 3. zgornjimi listi nismo mogli kvantificirati, zaradi majhne koncentracije in neenakomerne distribucije virusne RNA v neinokuliranih listih. Za razliko od netransgenih rastlin, so rastline NahG-Désirée pokazale večjo občutljivost na okužbo z virusom PVY^{NTN}. Simptomi v obliki nekrotičnih lezij ter kloroz, so se na okuženih listih začeli pojavljati 4. dpi in se v naslednjih dneh večali ter razvil tudi do žilnih nekroz (Slika 25). Pojav simptomov v NahG-Désirée rastlinah je sovpadal s prvo detekcijo virusne akumulacije, ki smo jo prav tako zaznali že 4. dpi. Rezultati so potrdili pomembno vlogo SA pri omejevanju virusne akumulaciji v okuženih listih kot tudi pri omejevanju virusnega širjenja v neinokulirane sistemske liste. Virus se je v rastlinah nezmožnih akumulacije SA razširil v zgornje neinokulirane liste močneje kot pri netransgenih rastlinah (Preglednica 12). Pri rastlinah, ki imajo okvarjeno signalizacijsko pot JA, Désirée coi1-RNAi, nismo opazili statistično značilne virusne akumulacije (Slika 26) v inokuliranih listih. Na okuženih listih nekaterih rastlin Désirée coi1-RNAi smo opazili obročkaste kloroze, vendar šele 11 dan po okužbi. To je čas, ko so pri večini rastlin tudi drugih dveh genotipov spodnji listi že odpadli. V naslednjih analizah smo se zato v večji meri osredotočili na analize sprememb v mutantah, ki imajo onesposobljeno signalizacijsko pot SA (NahG-Désirée).

Primerjali smo tudi virusno akumulacijo med različnimi deli lista. Primerjali smo tkivo, ki je obogateno z lamino (lamina) in tisto, kjer je večina predstavljala listno žilo (glavna žila) (Slika 27). V rastlinah sorte 'Désirée' je bila virusna RNA enakomerno porazdeljena med obema tkivoma, razliko smo zaznali v 4. dpi, ko je bila koncentracija virusne RNA malo, a signifikantno povečana v žili glede na lamino. Pri rastlinah NahG-Désirée smo povečanje koncentracije virusne RNA v lamini zaznali vzporedno s pojavom simptomov, medtem ko je koncentracija v tkivu obogatenem z žilnim tkivom (glavna listna žila) ostala precej konstantna skozi vse analizirane časovne točke. Rastlinski virusi izkoriščajo floem za premikanje na daljše razdalje, to je za sistemsko okužbo gostiteljske rastline (Vuorinen in sod., 2011). Natančen mehanizem transporta virusa PVY še ni znan (Hipper in sod., 2013). Glede na to, da se virusna koncentracija v žilah listov krompirja ni povečevala med razvojem bolezni, predpostavljamo, da so žile uporabljene predvsem za virusni transport. Nasprotno smo v lamini zaznali visoko virusno akumulacijo tekom analiziranih dni, kar namiguje na to, da je lamina tkivo, kjer se virus namnožuje.

Da bi razumeli razloge razlike v hitrosti virusnega širjenja, smo s fluorescenco vizualizirali kalozne depozite, ki sodelujejo pri restrikciji širjenja virus preko plazmodezem (Li in sod., 2012) depozite opazovali pod konfokalnim mikroskopom. Kalozni depoziti naj bi služili kot mehanske ovire pri širjenju virusa med celicami. Analizirali smo nalaganje kaloze v različnih časovnih točkah po okužbi tako v rastlinah 'Désirée' kot v NahG-Désirée genotipu (Slika 42). Akumulacijo smo zaznali samo v simptomatskih listih okuženih rastlin NahG-Désirée. Kalozni depoziti so obdajali nekrotične lezije in žilne nekroze. Čas akumulacije je sovpadal s pojavom prvih simptomov ter virusno akumulacijo (4 dpi). Analiza hipersensitivnega rezistentnega odgovora krompirja sorte 'Rywal' (kjer je virusno širjenje popolnoma omejeno) je pokazala, da so kalozni depoziti razmejili in ločili celice lezij od zdravega tkiva. V našem primeru pa so kalozni depoziti sicer obdali nekrotične lezije, vendar pa niso bili zadostni za pojav rezistence, saj niso omejili virusne akumulacije niti virusnega širjenja.

5.1.6 Virusna okužba povzroči reprogramiranje celičnega metabolizma

Transkriptom krompirja smo analizirali netarčno, da bi dobili celosten vpogled v dinamiko izražanja genov krompirja, in efektov, ki jih povzroči okužba z virusom PVY. Spremljali smo dinamiko izražanja genov 0., 1., 3., 4., 5. in 7. dan po inokulaciji v spodnjih listih krompirjev 'Désirée' in transgenih krompirjev NahG-Désirée. Sistemsko okužbo zgornji listov pa smo spremljali v 0., 1., 3., 4., 5., 7., 8., 9. in 11. dpi. Transkriptom listov rastlin okuženih z virusom PVY smo primerjali z izražanjem genov v slepo okuženih rastlinah. Virusna okužba je povzročila številne spremembe v izražanju genov, spremembe pa so izrazito dinamično regulirane (Slika 29). Pri netransgenih rastlinah 'Désirée' smo največji efekt virusne okužbe zaznali 5. dpi, ko je bilo največ genov statistično značilno izraženih. Efekt je najverjetneje direkten odgovor na virusno razmnoževanje, saj sovpada z dnevom, ko smo pri netransgenih rastlinah prvič zaznali virusno akumulacijo. Rastline genotipa NahG-Désirée so se na virusno okužbo odzvale s hitrim reprogramiranje celičnih procesov, saj so že v prvem dnevu zaznali izjemno veliko sprememb na nivoju izražanja genov (Slika 29). Zanimivo je tudi, da se signal o virusni okužbi znotraj rastline hitro širi po rastlini tudi v sistemske neinokulirane liste. Številni geni rastlin 'Désirée' so spremenili svoje profile izražanja že v prvem dnevu po inokulaciji z virusom PVY (Preglednica 13, Slika 29) dinamične spremembe na nivoju izražanja genov pa smo zaznali vse do 11 dneva po okužbi (Preglednica 13).

Za boljši pregled virusno induciranih sprememb v izražanju genov smo pogledali kako so spremembe opazne na nivoju procesov (Preglednica 13). Rezultati so identificirali dinamično regulacijo genov vključenih v vse stopnje fotosinteze. Predhodne raziskave so pokazale, da so geni, ki kodirajo za tilakoidne proteine močno regulirani ob biotskem stresu. Meta analiza različnih biotskih agensov (bakterij, gliv, virusov, ...) je pokazala, da je izražanje večine genov, ki kodirajo za proteine reakcijskega centra fotosistemov I (PSI) in II (PSII), gene ki kodirajo za ATP sintazo in različne elemente žetvenega kompleks za svetlobo (ang. light harvesting complex LHCII), zmanjšano po biotskem stresu (Bilgin in sod., 2010). Naše analize so pokazale, da so ti geni specifično značilno različno izraženi v različnih stopnjah okužbe. Virusna okužba rastlin 'Désirée' je močno spremenila izražanje genov, ki kodirajo za PSII in izražanje številnih transkriptov, ki kodirajo za proteine, ki se vežejo na klorofil (ang. CAB - clorophyll a and b binding protein) (Preglednica 13). Ti proteini klorofil vežejo na tilakoidno membrano in tako tvorijo P680 reakcijski center PSII (Berry in sod., 2013). Zaznali smo močno indukcijo genov CAB, predvsem 1. in 4. dpi, isti trend aktivacije izražanja pa smo zaznali tudi 3. dpi. Po začetni aktivaciji se je profil izražanja genov obrnil na močno inhibicijo izražanja 5. dpi. Podobni efekt smo zaznali tudi pri izražanju genov, ki kodirajo za PSI; prvotni indukciji je sledila hitra inhibicija izražanja. Čas obrata v izražanju genov sovpada z detekcijo virusnega namnoževanja 5. dpi. To je tudi čas, ko se rastlina 'Désirée' odzove z najštevilčnejšim reprogramiranjem izražanja genov (Slika 29). Prehodno zvečanje aktivnosti PSII in PSI nakazuje na povečano potrebo rastline po energiji potrebni za borbo proti virusnim napadalcem. Znižano izražanje obeh fotosistemov v sledečih dneh pa je verjetno znak reprogramiranja celičnega metabolizma, tako da namesto osnovnih metabolnih procesov prednjačijo obrambni mehanizmi. Morda leži vzrok v spremembi okuženih listov, ki se iz proizvajalcev energetsko bogatih molekul (vir) spremenijo v porabnike energije (ponor) (Lemoine in sod., 2013).

Virusna okužba zniža izražanje genov, ki kodirajo za prenašalce elektronov in so vključeni v tok elektronov iz PSI. Konstantno znižanje smo zaznali v vseh preiskovanih dneh, 1. - 7.dpi. Izražanje genov za feredoksin in feredoksin reduktaze se je močno zmanjšalo v rastlinah 'Désirée' okuženih z virusom PVY v primerjavi s slepo tretiranimi rastlinami. Raziskave poročajo tako o indukciji kot o represiji izražanja genov za feredoksin in feredoksin in feredoksin reduktazo v rastlinah okuženih z različnimi škodljivci, kar kaže na to da so geni pomembno vključeni v odziv rastline. Pred kratkim so dokazali, da plaščni protein virusa paradižnikovega mozaika (rod tobamovirusov) interagira s feredoksini (Sun in sod., 2013). Interakcija med potivirusnim proteinom HC-Pro in feredoksini je bila potrjena pri koruzi v interakciji z virusom mozaika sladkornega trsa (Cheng in sod., 2008). Avtorji so predpostavili, da bi interakcija lahko vodila v okvaro transporta proteina feredoksina v kloroplaste in tako pripomogla k razvoju kloroz v gostiteljski rastlini oziroma spremembi v strukturi in funkciji kloroplastov.

Pokazali smo, da okužba rastlin krompirja z virusom PVY močno prizadene izražanje genov vključenih v fotosintezo. Vsi procesi fotosinteze niso enako regulirani. Nekatere stopnje so konstantno inhibirane (feredoksin), pri drugih (PSI in PSII) pa zaznamo prehodno indukcijo genov, ki ji sledi hitra deaktivacija. Rezultati kažejo, da virusna okužba povzroči dinamično, pulzno regulacijo velikega števila fotosinteznih genov. Vse več rezultatov nakazuje na to, da je transkripcijska regulacija, kot posledica biotskega stresa dinamična in pulzna. Zdi se, da so za zaporedno pulzno regulacijo odgovorni različni rastlinski hormoni katerih koncentracija je prav tako pulzno regulirana (Moore in sod., 2011).

Kalvinov cikel je najpomembnejša pot fiksacije ogljika v rastlinah. Transkripti, ki sodelujejo v Kalvinovem ciklu, so prav tako dinamično regulirani. Njihov profil izražanja z rahlim zamikom sledi generalnemu trendu izražanja genov vključenih v transport elektronov. Na nivoju analize procesov (Preglednica 13) zaznamo indukcijo 3. dan po okužbi z virusom, ki ji sledi znižano izražanje v sledečih dneh (5. in 7. dpi). Na nivoju posameznih reakcij zaznamo tako indukcijo kot represijo posameznih reakcij znotraj Kalvinovega cikla, kar nakazuje na natančno in specifično regulacijo posameznih stopenj fiksacije ogljika.

Centralni encim za asimilacijo ogljikovega dioksida iz atmosfere v organsko obliko, je ribuloza 1,5-bifosfat karboksilaza/oksigenaza (RuBisCO) (Ellis, 1979; Portis in Parry, 2007). Pri višjih rastlinah je popoln in funkcionalen protein sestavljen iz 16 podenot, 8 velikih podenot in 8 majhnih podenot. Velike podenote so kodirane na kloroplastnem genomu, male pa v jedru in so iz jedra transportirane v kloroplaste. Za funkcionalen encim je potrebna ekvimolarna koncentracija obeh podenot (Lorimer, 1981; Makino in sod.,

1992). Okužba rastlin 'Désirée' z virusom PVY je značilno spremenila izražanje treh malih podenot proteina RuBisCO (Slika 31). Vsaka od malih podenot ima specifičen profil izražanja. Medtem ko je virusna okužba znižala izražanje podenote 1 v 1. in 5. dpi po okužbi, se je izražanje ostalih dveh podenot močno (RuBisCO podenota 2) ali pa rahlo (RuBisCO podenota 3) induciralo v vseh preiskovanih časovnih točkah. Izražanje velike podenote proteina RuBisCO je sledilo vzorcu izražanja malih podenot 2 in 3 ter je bilo večino časa inducirano. Dodatna vlogo RuBisCO malih podenot so ovrednotili v rastlinah Nicotiana bethamiana okuženih z virusom mozaika paradižnika (ToMV, tobamovirus). Pokazali so da ToMV virusni proteini odgovorni za premikanje (movement proteins) interagirajo z malo podenoto proteina RuBisCO. Utišanje gena male podenote RuBisCO je induciralo nekroze v inokuliranih listih in omogočilo generiranje novih infekcijskih mest. Interakcija je pomembna tudi za premikanje tobamovirusov (Zhao in sod., 2013). Interakcija med potivirusnimi proteini PIPO in obema podenotama proteina RuBisCO (malo in veliko podenoto) je bila potrjena. Predvidevajo, da je interakcija pomembna komponenta razvoja simptomov v gostiteljski rastlini (L. Lin in sod., 2011). Indukcija malih in velikih podenot proteina RuBisCO bi lahko kompenzirala za izgubo aktivnosti in sodelovala pri asimptomatskem statusu rastlin 'Désirée'.

Analize rastlin NahG-Désirée so pokazale pomembno vlogo SA pri imunskem odzivu. Onemogočena signalizacijska pot SA bistveno vpliva na fenotip rastline, virus se v rastlinah hitreje ter močneje akumulira in širi, razvijejo se tudi močni simptomi (Slika 25). Primerjalna analiza transkriptoma obeh genotipov ('Désirée' in NahG-Désirée) je pokazala, da je veliko induciranih sprememb v izražanju genov genotipno-specifičnih (Slika 29). To pomeni, da pomanjkanje SA vpliva na številne celične procese. Primerjava izražanja genov vključenih v primarni metabolizem rastline je identificirala številne razlike in pokazala na vključenost SA signalizacije v procese fotosinteze in metabolizma sladkorjev.

Rastline NahG-Désirée se na virusno okužbo odzovejo s splošno inhibicijo izražanja genov povezanih s fotosintezo. Znižano izražanje genov vključenih v svetlobne reakcije, svetlobno dihanje in Kalvinov cikel smo zaznali 1., 4. in 7 dpi, medtem ko je bilo 3. in 5. dpi večino genov neodzivnih. Pomankanje SA blokira virusno inducirano izražanje genov povezanih z obema fotosistemoma (PSI in PSII). V 1. in 4. dpi je indukcija obeh genov, ki smo jo zaznali pri netransgenih rastlinah, spremenjena v inhibicijo pri rastlinah NahG-Désirée (Preglednica 13). Tudi pri rastlinah NahG-Désirée zaznamo pulzno inhibicijo genov za oba PSI in PSII, saj se njihovo izražanje ne spremeni v 3. in 5. dpi (Stare in sod., 2015). Po drugi strani pa pomanjkanje SA nima večjega vpliva na profil izražanja genov, ki kodirajo za transporterje elektronov iz PSI, saj imajo le-ti po virusni okužbi večinoma znižano izražanje pri obeh genotipih (Preglednica 13).

Inhibicija fotosinteznih genov nakazuje na metabolizem z zmanjšano produkcijo energetsko bogatih molekul, ter predpostavlja, da so listi rastlin NahG-Désirée postali porabniki energije (ponor), že od prvega dne po okužbi. Reprogramiranje celičnega metabolizma zaznamo tudi na številu genov z značilno spremenjenim izražanje, saj je to pri rastlinah NahG-Désirée največje prav 1. dpi. Reprogramiranje je dinamično in se tudi pri rastlinah NahG-Désirée zgodi pulzno, saj so fotosintezi geni 3. in 5. dpi neodzivni. Signalizacijska pot SA vpliva tudi na virusno-inducirane spremembe v izražanju genov, vključenih v metabolizem sladkorjev. Med drugim imajo rastline NahG-inducirano izražanje genov za razgradnjo škroba, najverjetneje zaradi spremenjenih potreb po energetskih virih v okuženih listih (Preglednica 11, Slika 33).

5.1.7 Virusno inducirano reprogramiranje izražanja genov se le delno manifestira v meritvah fotosintetske aktivnosti

V naslednjem koraku smo raziskali ali se spremembe v transkripcijskem profilu genov povezanih s fotosintezo odražajo tudi v fotosintetski aktivnosti.

Fotosintetsko aktivnost smo spremljali tako v inokuliranih kot sistemsko okuženih listih ter jih primerjali s fotosintetsko aktivnostjo kontrolnih rastlin (poglavje 4.3.4). Merili smo vsebnost klorofila v listih krompirja sorte 'Désirée' in njegovih transgenov NahG-Désirée ter Désirée coi1-RNAi, analizirali dinamiko neto fotosinteze, prevodnosti listnih rež in transpiracije ter aktivnost tilakoidnih membran, predvsem PSII merili s parametrom dejanske fotokemične učinkovitosti (Schreiber, 2004). Vse fiziološke spremembe smo analizirali v dinamičnem kontekstu, to je v različnih časovnih točkah po okužbi z virusom PVY^{NTN}.

Ko se v rastlinah 'Désirée' začne virusno namnoževanje (5 dpi), zaznamo hiter obrat v zmanjšano izražanje genov povezanih s svetlobnimi reakcijami in obema fotosistemoma. Podobno tudi fotokemična učinkovitost, parameter, ki je večinoma povezan z učinkovitostjo PSII, upade 5. dpi (Slika 37) in se ponovno povrne na nivo fotokemične učinkovitosti slepo okuženih rastlin v 7. dpi. Torej ta dinamika prehodnega znižanja sovpada z dinamiko izražanja genov. Znižanje fotokemične učinkovitosti v odgovoru na virus ima poleg indirektnih sprememb v izražanju genov več mehanističnih razlag. Pri virusu tobakovega mozaika (TMV, tobamovirus) njegov plaščni protein direktno interagira s proteini PSII in jih inhibira (Hodgson in sod., 1989). Poleg interakcije proteina plašča (CP) s proteinom RuBisCO tudi druge potivirusne komponente interagirajo z različnimi kloroplastnimi proteini. Proteini PSI-K interagira z CI proteinom virusa PVY, kloroplastni protein NtMinD z virusnim (PVY) proteinom HC-Pro, protein citokrom kompleksa b6/f s proteinom P1 virusa SMV-P, kloroplastni prekurzor

ferodoksina FdV pa s proteini HC-Pro virusa SCMV (Li in sod., 2016; Lin in sod., 2011). Nekatere ali vse te interakcije skupaj bi lahko razložile zakaj se pri rastlinah okuženih s potivirusi zniža nivo fotosinteze. Nekateri predpostavljajo, da je znižana fotokemična učinkovitost posledica znižane učinkovitosti proteinskih popravljalnih mehanizmov, kot posledica ekstenzivne sinteze virusnih proteinov ali pa zaradi zmanjšanega transporta kloroplastnih proteinov, iz jedra v kloroplast (Synková in sod., 2006). Glede na naše transkriptomske rezultate pa je znižana fotokemične učinkovitosti lahko tudi le enostavna posledica znižanega izražanja genov za PSII.

Tudi v rastlinah NahG-Désirée smo zaznali signifikantno znižanje fotokemične učinkovitosti, ki je sovpadala s časom virusnega namnoževanja (4. dpi). V primeru transgenih rastlin nismo opazili le prehodnega znižanja učinkovitosti PSII, ampak se je le to konstantno zniževalo do zadnjega analiziranega dne 11. dpi (Slika 37). Tudi tukaj rezultati sovpadajo s transkriptomskimi rezultati, saj smo v rastlinah NahG-Désirée zaznali generalno znižanje fotosintetskih genov. Pulzna inhibicija, ki smo jo zaznali na nivoju transkriptomike se ni odražala v meritvah fotokemičen učinkovitosti.

V nasprotju z meritvami fluorescence, ki omogočajo direkten vpogled v kvaliteto tilakoidnih procesov, pa meritve izmenjave plinov integrirajo kompleksnost fotosinteze in kažejo njeno dejansko učinkovitost v danem trenutku. Analize transkriptoma so pokazale, da okužba s PVY lahko tako inhibira kot stimulira različne procese primarnega metabolizma. Spremembe v svetlobnih reakcijah, in ogljikovih reakcijah, spremembe procesov kot so svetlobno dihanje (fotorespiracija), dihanje (respiracija) ter metabolizem škroba in saharoze, ki so bili spremenjeni na nivoju izražanja genov končno rezultirajo v neto fotosintezi (Pn) (Pn= bruto fotosinteza-dihanje-svetlobno dihanje). Prav zaradi kompleksne integracije procesov, ki vodijo v učinkovitost fotosinteza le delno sledi meritvam fluorescence. Tako smo zaznali zmanjšanje neto fotosinteze 5. dpi v inokuliranih listih vseh treh genotipov ('Désirée', NahG-Désirée in Désirée coi1-RNAi) (Slika 34).

Znižana neto fotosinteza rastlin okuženih z virusom PVY je sovpadala z znižano prevodnostjo listnih rež (Slika 39) pri rastlinah 'Désirée' in NahG-Désirée. V rastlinah Désirée coi1-RNAi smo zaznali prehodno povečano prevodnost listih rež v času (4. dpi), ko smo zaznali tudi prehodno zvečanje neto fotosinteze (4. dpi). Znižana neto fotosinteza je lahko posledica omejene difuzije substrata (CO2) v list. Ta efekt je zelo indirekten in povezan z regulacijo listih rež. JA in ABA sta hormona, ki ju pogosto povezujejo z regulacijo odprtosti listih rež (Zhu in sod., 2012). Najverjetneje virus PVY preko

spremembe v signalizaciji hormonskih poti vpliva tudi na spremembe v prevodnosti listnih rež (Baebler in sod., 2014; Baebler in sod., 2009)

5.1.8 Vpogled v virusno inducirane spremembe na nivoju proteoma potrdijo pomen fotosinteznih komponent v rastlinskem imunskem odzivu

Za premostitev vrzeli med rezultati izražanja genov ter spremembami, ki so se odražali na fiziološki ravni, smo analizirali proteom krompirja sorte 'Désirée' 4. dan po okužbi z virusom in ga primerjali s proteomom slepo inokuliranih rastlin. To je dan ko smo v rastlinah NahG-Désirée zaznali prvo virusno namnoževanje in dan pred zaznanim namnoževanjem virusa v obeh drugih genotipih. Z analizo transgenih linij (NahG-Désirée in Désirée coi1-RNAi1) smo ovrednotili vpliv SA in JA v odgovoru rastline na virus na proteomskem nivoju. Identificirali smo 339 proteinov, ki so bili po večini vključeni v procese primarnega metabolizma, fotosinteze in Kalvinov cikel. V rastlinah 'Désirée' se je po virusni okužbi znižala koncentracija proteinov vključenih v proces fotosintetskega dihanja (Preglednica 16). Znižanje je sovpadalo z zmanjšanim izražanjem pripadajočih genov (Preglednica 17). V virusno okuženih listih se je povečala koncentracija fruktoza-bifosfat aldolaze, kar nakazuje na virusno inducirano aktivnost Kalvinovega cikla. Na nivoju izražanja genov so se geni vključeni v Kalvinov cikel inducirali že 3 dpi, z enodnevnim zamikom pa se je ta indukcija odražala tudi na nivoju proteinov.

Analiza proteoma transgenih rastlin je še enkrat dokazala pomembno vlogo hormona SA pri odgovoru rastline na virusno okužbo (Preglednica 16). Pri rastlinah NahG-Désirée nismo zaznali niti enega izmed signifikantno spremenjenih proteinov, ki smo jih identificirali pri rastlinah 'Désirée'. Tudi pri rastlinah Désirée coi1-RNAi smo identificirali le en protein, katerega virusno spremenjena koncentracija je bila enako regulirana tudi v netransgeni rastlini, kar nakazuje tudi na pomembno regulatorno vlogo JA. Profil proteinov, katerih koncentracija se spremeni po virusni okužbi, je torej genotipno-specifičen. V okuženih rastlinah NahG-Désirée je okužba povzročila znižano koncentracijo proteina, ki se veže na PSII. Znižanje je sovpadalo z znižanjem izražanja genov za pripadajoči protein (Preglednica 17). Tudi pri rastlinah NahG-Désirée je virus spremenil koncentracijo proteinov Kalvinovega cikla, z visoko indukcijo trioza-fosfat izomeraze. Virus je povzročil največje spremembe proteoma rastlin Désirée coi1-RNAi. Proteini svetlobnih reakcij so močno spremenjeni v tem genotipu. Zaznali smo različno regulacijo različnih podenot PSI, s podenotami, ki so inducirne in drugimi, katerih koncentracija se po okužbi zmanjša.

Spremembe, ki smo jih zaznali na nivoju transcripcijskega reprogramiranja izražanja genov so se le v delni meri manifestirali v spremembah na nivoju koncentracije različnih

proteinov. Proteom je bolj stabilen od transkriptoma, delno zaradi postranskripcijskih regulacijskih mehanizmov in razlik v življenjski dobi proteinov (Dressaire in sod., 2009; Maier in sod., 2011). Pogosto zaznamo tudi časovni zamik v odgovoru na proteinskem nivoju v primerjavi s transkriptomskim, kar je lahko posledica časovnega zamika med sintezo mRNA in proteina (Vogel in Marcotte, 2012). Razlike med obema nivojema pa so lahko tudi posledica tehničnih omejitev. Z mikromrežami spremljamo izražanje 40 000 genov hkrati, medtem ko masna spektrometrija (shotgun), ne omogoča analize celotnega proteoma, ampak po navadi identificira 300 do 2000 proteinov, odvisno od organizma in proučevanega tkiva (Hoehenwarter in sod., 2011).

5.1.9 Povezava modeliranja in eksperimentalnih podatkov vodi v identifikacijo novih komponent imunskega odziva krompirja

Za analizo dinamike izražanja genov povezanih s imunsko signalizacijo smo vključili vse komponente strukturnega modela imunskega odziva ter njihove prve proteinske interaktorje (Figure 47, Priloga F) in jih povezali s transkriptomskimi podatki. Identificirali smo gene, katerih izražanje je značilno regulirano po virusni okužbi in so potencialno pomembni v razvoju odziva krompirja na patogen (Priloga E). Izbrali smo 4 regulatorje, ter kinazi StSAPK8 in StPK11 ter fosfatazi StPP2C in StAVR9 podredili natančnejši analizi, ker vloga hormona ABA pri virusnih okužbah rastlin do sedaj še ni dobro pojasnjena.

Identificirani geni se zanimivo odzovejo s spremembo izražanja po virusni okužbi (Preglednica 19). Njihovo izražanje je dinamično regulirano tako v listih krompirja sorte 'Désirée' na mestu okužbe ter v zgornjih neinokuliranih listih, kot tudi okuženih listih mutante NahG-Désirée. Izražanje gena StSAPK8 v okuženih listih rastlin 'Désirée' se ob virusni okužbi inducira, indukcijo izražanja gena pa zaznamo v zgornjih sistemskih listih. Pri genotipu NahG-Désirée se je izražanje gena StSAPK8 še močneje induciralo, maksimum pa doseglo v 4. dpi. To je čas, ko v okuženih listih rastlin NahG-Désirée zaznamo prvo namnoževanje virusa ter pojav prvih simptomov v obliki nekrotičnih lezij, kar nakazuje na pomembno vlogo StSAPK8 pri obrambnem odzivu rastline tako na mestu vstopa virusa kot pri sistemski širitvi signala v neokužene liste. Tudi druga identificirana kinaza StPK11, je odzivna na virusno okužbo, vendar pa je dinamika njenega izražanja povsem drugačna. Spremenjen profil izražanja v genotipu, ki ima okvarjeno pot SA, nakazuje na virusno-inducirano pozitivno regulacijo gena preko SA. Dinamika izražanja gena StPK11 v zgornjih listih je bimodalna; indukciji v začetnih dneh sledi inhibicija v poznejših, obrat pa se zgodi iz 5. na 7. dpi. Identificirali smo dve kinazi, ki imata enako funkcionalno serin/treoninsko aktivno domeno, vendar različen profil izražanja. Vsaka ima torej specifično vlogo pri odgovoru rastline na virusno okužbo.

Da bi lahko bolje razumeli vlogi obeh kinaz v krompirju smo analizirali njune ortologe v navadnem repnjakovcu in ugotovili, da kinazi spadata v skupino SnRK (Sucrose non-fermenting 1-related protein kinases) serin/treoninskih kinaz. To so monomerne proteinske kinaze z molekulsko maso okrog 40 kDa. V navadnem repnjakovcu, kjer so kinaze najbolje okarakterizirane so identificirali 38 predstavnikov (Hrabak in sod., 2003), razdeljenih v tri družine: SnRK1, SnRK2 in SnRK3 (Dong Xue-Fei in sod., 2012). Analiza nukleotidnega zaporedja genov StSAPK8 in StPK11 je predvidela, sorodnost kinaz s pripadniki družine SnRK2 iz navadnega repnjakovca. SnRK2 je relativno majhna rastlinsko-specifična družina z desetimi člani SnRK2.1 - SnRK2.10 (Dong Xue-Fei in sod., 2012). Vsi predstavniki SnRK2 proteinov se aktivirajo ob odgovoru rastline na abiotski stres, nekateri (SnRK2.2, SnRK2.3, SnRK2.6) pa so vključeni tudi v signalizacijsko pot ABA (Tian in sod., 2013). Trojna mutacija genov (*snrk2.2/3/6*) v navadnem repnjakovcu povzroči neobčutljivost rastlin na hormon ABA (Coello in sod., 2011).

Da bi predvideli v katero skupino spadata novo identificirani krompirjevi serin/treoninski kinazi in predvideli njuno vlogo pri stresnih odzivih rastline, smo izvedli filogenetsko analizo. Poravnali smo aminokislinska zaporedja vseh predstavnikov družine SnRK2 v navadnem repnjakovcu z aminokislinskimi zaporedji krompirjevih kinaz (StSAPK8 in StPK11) in vseh ostalih ortologov krompirja. Rezultati filogenetske analize so pokazali, da je krompirjeva kinaza StSAPK8 sorodna kinazam SnRK2.2, SnRK2.3, SnRK2.6 v navadnem repnjakovcu, ki spadajo v skupino tistih kinaz, ki so inducirane s hormonom ABA (Slika 45). V isti skupini smo identificirali še 6 genov krompirja. Evolucijsko se je v krompirju gen pomnožil na več sorodnih zaporedij, ki morda opravljajo podobne funkcije. Kinaza StPK11 se je v evoluciji ločila že predhodno in nima direktnega evolucijskega sorodnika v navadnem repnjakovcu. S poravnavo aminokislinskega zaporedja proteina StSAPK8, smo identificirali njegov regulatorni C-končni del, ki vsebuje ponovitve kislih aminokislin aspartata (D), ter domeno II, ki je potrebna za aktivacijo serin/treoninskih kinaz s hormonom ABA (Slika 46).

Identificirali smo tudi dve fosfatazi, ki interagirata s komponentami modela signalizacijske poti imunskega odziva, izražanje njunih genov pa se po virusni okužbi spremeni. Transkriptomski rezultati so pokazali, da sta fosfatazi StPP2C in StAVR9 vključeni v obrambni mehanizem na mestu kjer virus vstopi v rastlino, ne sodelujeta pa pri sistemskem odgovoru (Pregldnica 19). V listih rastlin 'Désirée', ki so okuženi z virusom PVY se značilno zniža izražanje gena StPP2C v 4. dpi. Represija izražanja je očitno pod kontrolo SA, saj se v mutantah NahG-Désirée okuženih z virusom PVY gen močno inducira v isti časovni točki, dan prej (3. dpi) pa je zaznati močno represijo gena. Hitra sprememba v izražanju je najverjetneje povezano z virusnim namnoževanjem, ki ga

v zaznamo v istem časovnem obdobju, 4. dpi (Slika 26). Tudi izražanje fosfataze StAVR9 je značilno pod regulacijo SA (Preglednica 19). Pulzno se inducira v NahG-Désirée rastlinah 1., 4. in 7. dpi, medtem ko v natransgenih rastlinah ni zaznati njegove regulacije. Prav tako rezultati nakazujejo, da ne sodeluje v sistemskem odzivu rastlin, saj se njegovo izražanje ne spremeni v zgornjih neinokuliranih listih. Fosfatazi imata podoben profil izražanja.

Filogenetska analiza izbranih fosfataz je pokazala, da je njuno aminokislinsko zaporedje povezano v skupine, tako kot so napovedale predikcije ortologov v aplikaciji PLAZA (Proost in sod., 2009). Identificirali smo torej dve fosfatazi, ki spada v dve skupini t. im. PP2C-sorodnih fosfataz in predvidenih PP2C fosfataz (Slika 45). Proteinske fosfataze 2C (PP2C) so monomerni encimi, ohranjeni tako v prokariontih kot v evkariotskih organizmih. V navadnem repnjakovcu šteje družina PP2C proteinov 80 članov, v rastlini riža pa celo 90 članov. Defosforilacija, ki jo katalizirajo je ključna za natančno transdukcijo signalov po celici. Na tak način sodelujejo pri razvojnih procesih, celični diferenciaciji in rasti, primarnem metabolizmu (Schweighofer in sod., 2004), ter regulirajo odpornost na različne stresne dejavnike iz okolja (Sugimoto in sod., 2014).

Vlogo fosfataz PP2C pri virusnih okužbah so analizirali na rastlinah soje, okuženih z virusom sojinega mozaika (SMV). SMV je, tako kot virus PVY, potivirus. V rastlinah soje so identificirali rezistenčne gene (R gene) odgovorne za ekstremno rezistenco, ki jo rastline razvijejo proti virusnim efektorjem. Raziskave so pokazale, da je za rezistenten odziv potrebna ena izmed PP2C fosfataz (GmPP2C3a) (Seo in sod., 2014).

Regulacija aktivnosti SnRK2 se vrši preko skupine fosfataz PP2C, ki jih inaktivirajo preko defosforilacije serina in treonina v aktivnem mestu (Kulik in sod., 2011). Najbolj močne interakcije so med tipom A PP2C in od ABA-odvisnimi SnRK2. Za interakcijo je namreč potrebna negativno nabita domena II ABA-odvisnih SnRK2, ki stabilizira biokemično interakcijo med fosfatazo PP2C in SnRK2, zato so SnRK2.2, 2.3, 2.6 najmočneje inhibirani s PP2C.

Da bi preverili ali so identificirani kinazi StSAPK8 in StPK11 ter fosfatazi StPP2C in StAVR9 pomembni regulatorji imunskega odziva rastlin tudi v drugih tipih interakcij virus-rastlina, smo analizirali njihovo izražanje po infekciji z virusom PVY v različnih sortah krompirja (Preglednica 20). 'PW363' je sorta z ekstremno rezistenco na virus PVY, 'Rywal' pa razvije hipersenzitivni odgovor na okužbo in tako onemogoči širitev virusa v zgornje neinokulirane liste. Transgena rastlina NahG-Rywal, ki je nesposobna akumulacije SA razvije simptome ter omogoči virusno širjenje. Tudi tu je bilo izražanje kinaz StSAPK8 in StPK11 ter fosfataz StPP2C in StAVR9 močno značilno dinamično

regulirano po virusni okužbi. Profili izražanja genov variirajo med različnimi sortami. Tolerantni odgovor rastlin 'Désirée' pa je na nivoju izražanja genov StSAPK8, StPK11, StPP2C ter StAVR9 bolj primerljiv z rezistentno sorto 'PW363', kot sorto, ki razvije hipersenzitivni odgovor, 'Rywal'. Kljub temu, da bi bile za natančno razumevanje funkcije genov v različnih odgovorih potrebne dodatne študije, pa rezultati potrjujejo, da so identificirani proteini pomembni regulatorji rastlinskega imunskega odziva.

5.1.10 Virusno inducirana kinaza StSAPK8 povezuje biotsko signaliziranje s signalizacijsko potjo abscizinske poti

Vloga hormona ABA pri virusnih okužbah rastlin do sedaj še ni dobro pojasnjena. Glede na naše rezultate smo predpostavili njeno vključenost v krompirjev imunski odziv. Novo identificirani regulatorji (kinazi StSAPK8 in StPK11 ter fosfatazi StPP2C in StAVR9) so vpleteni v odziv rastline na okužbo z virusom PVY v krompirju, saj se po okužbi spremeni izražanje njihovih genov, dodatno pa smo hipotezirali tudi njihovo vpletenost v signalizacijsko pot hormona ABA. Njihovi ortologi v navadnem repnjakovcu so namreč vpleteni v odziv rastline na fitohormon ABA pa tudi opisi njihovih bioloških funkcij v krompirju sovpadajo s predpostavko. Tako smo kinaze in fosfataze interpretirali v kontekstu signalizacijske poti hormona ABA in hormonov, ki so tradicionalno povezani z biotskim stresom (SA, JA, ET). ABA je rastlinski hormon, ki ga klasično povezujejo z različnimi razvojnimi procesi, močno pa je povezana tudi z odgovorom na abiotski stres, predvsem sušo in slanostjo. (Andolfo in Ercolano, 2015; Collum in Culver, 2016; Vos in sod., 2013; Vos in sod., 2015). Ob pomanjkanju vode in pri drugih abiotskih stresih se v listih njena količina močno poveča, kar privede do zapiranja listnih rež, s tem se zmanjša oddajanje vode, kar omogoča rastlini da prestane kratko sušno obdobje. Nekatere raziskave pa prepoznavajo tudi vlogo ABA pri odgovoru rastline na biotski stres. Rezultati nakazujejo tako njeno pozitivno, kot tudi negativno regulacijo rastlinskega imunskega odziva, diferenciacija pa temelji glede na tip interakcije med patogenom in gostiteljsko rastlino, načinom okužbe, ter časa po okužbi (Singh in sod., 2015).Vloga ABA pri odzivu rastline je prepoznana tudi za virusno okužbo (Alazem in Lin, 2015).

Signalizacijska pot hormona ABA poteka preko zaznavanja hormona in transdukcije signala do efektorskih molekul. Receptor hormona v signalizacijska poti (PYR/PYL/RCAR) prenese signal preko PP2C fosfataz ter SnRK2 kinaz do tarčnih transkripcijskih faktorjev, ki jih te kinaze fosforilirajo (skupina bZIP). V normalnih pogojih fosfataze PP2C tipa A interagirajo s kinazami SnRK2 (ABA-inducibilnimi, ki imajo domeno II) in jih inhibirajo. PP2C fosfataze vežejo SnRK2 kinaze tako, da je njihovo aktivno mesto sterično ovirano in njihovo delovanje onemogočeno. Ob vezavi hormona ABA na receptor se ta konformacijsko spremeni in lahko učinkovito veže

fosfataze PP2C. Fosfatazna aktivnost proteinov PP2C je tako onemogočena, kinaze SnRK2, pa lahko fosforilirajo svoje tarče. V navadnem repnjakovcu je ABA signal zaznan z 14 ABA receptorji, ter prenesen preko devetih fosfataz in treh od ABA-odvisnih kinaz SnRK2. Različne interakcije med komponentami natančno regulirajo celično signalizacijo (Hirayama in Umezawa, 2010). Predpostavili smo regulacijo gena StSAPK8 z ABA. StSAPK8 je namreč soroden proteinom SnRK2.2, SnRK2.3 ter SnRK2.6 navadnega repnjakovca (Slika 45), ki so z njo aktivirani ima ima domeno potrebno za aktivacijo s hormonom ABA. Analizirali smo njegovo interakcijo s fosfatazami StPP2C in StAvR9, da bi ugotovili ali izbrani proteini sodijo v isto signalizacijsko pot.

Rezultati analize dvohibridnega sistema kvasovk so potrdili interakcijo StSAPK8 z obema fosfatazama StPP2C in StAvR9 (Slika 50) in pokazali, da proteini sodijo v isto signalizacijsko pot hormona ABA. Še več, StSAPK8 interagira tudi s fosfatazo StMKP1, ki je del signalizacijske kaskade z mitogenom aktvirajočih proteinskih kinaz (MAPK), ki so med drugim pomembno vpete v imunski odziv rastline (Pitzschke in sod., 2009). Naši rezultati kažejo na prepletenost signalizacijskih poti hormona ABA, ter MAPK kaskade preko skupnega regulatorja proteinske kinaze StSAPK8.

Za interakcijo med obema potema signalizacije obstajajo še drugi dokazi. Tudi fosfatazi AtAP2C1 v navadnem repnjakovcu (AT2G30020) in kloroplastna proteinska fosfataza AT1G07160, ki sta sorodni krompirjevi fosfatazi StAVR9 sta regulirani s hormonom ABA ter interagirata z MPK4 in MPK6 člani MAPK kaskade (Slika 48). Dokazano je, da AtAP2C1 deluje tudi kot MAPK fosfataza in z defosforilacijo inhibira delovanje MPK4 in MPK6 proteinskih kinaz (Schweighofer in sod., 2007). Z analizo dvohibridnega sistema kvasovk smo želeli ugotoviti ali sta tudi krompirjevi fosfatazi StPP2C in StAvr9 povezani s signalizacijsko kaskado MAPK. Analizirali smo njuno interakcijo s krompirjevo kinazo StWIPK (ortolog kinaze MPK3 iz navadnega repnjakovca), ki se je v predhodnih študijah izkazala za pomemben regulator odziva krompirja na virusno okužbo. Rezultati so pokazali, da nobena od fosfataz ne interagira s krompirjevo kinazo StWIPK. Analizirali smo tudi interakcije med kinazo StPK11 in fosfatazami, StPP2C in StAVR9, vendar nobene interakcije nismo mogli potrditi (Slika 50). StWIPK je krompirjeva kinaza, katere ortolog se v navadnem repnjakovcu imenuje MPK3. Glede na predikcije proteinskih interakcij v navadnem repnjakovcu pa želimo v nadaljnih raziskavaj analizirati interakcije med krompirjevima fosfatazama StPP2C in StAvr9 in kinazama StMPK4.1, StMPK4.2 in StMPK6, gen za kinazo MPK4 se je v krompirju namreč podvojil.

Da bi analizirali regulacijo gena StSAPK8 preko različnih signalizacijskih poti smo rastline krompirja tretirali s hormoni SA, JA, ET in ABA (Slika 51). Izražanje gena StSAPK8 v rastlinah tretiranih z različnimi hormoni smo primerjali z izražanjem gena v netretiranih rastlinah. Rezultati so pokazali, da je gen pod pozitivno kontrolo ET in ABA ter negativno regulacijo JA. Obe indukciji pa sta pogojeni s prisotnostjo funkcionalne signalizacijske poti SA, saj v rastlinah NahG-Désirée ne pride do indukcije. Predpostavili smo model regulacije gena StSAPK8 preko različnih signalnih poti rastlinskih hormonov.



Slika 52: Model regulacije izražanja gena StSAPK8 s hormoni JA, ET in ABA Gen StSAPK8 je pod pozitivno regulacijo hormonov ET in ABA, JA pa ima na njegovo izražanje negativen vpliv. Polna črta označuje močno, črtkana pa šibkejšo regulacijo izražanja gena.

Figure 52: Model of gene StSAPK8 expression regulation by hormones JA, ET in ABA StSAPK8 gene is under positive regulation of ET and ABA, while hormone JA is negative regulator of STSAPK8 gene expression. Solid line indicates strong regulation, while dashed line indikates moderate gene expression regulation.

Analiza izražanja genov je potrdila našo hipotezo o regulaciji gena preko hormona ABA. S tem pa še nismo pokazali kako natanko se ABA vplete v signalizacijo omrežje biotskega stresa, na primer ali virus direktno vpliva na dvig koncentracije ABA v okuženih listih, ki nato modificira odziv omrežja ostalih hormonov ali pa so signalizacijske poti različnih hormonov morda zaporedno povezane.

Vključenost proteina StSAPK8 v različne signalizacijske poti (MAPK kaskado, signalizacijsko pot hormona ABA, regulacije z JA ter ET) ter predvsem njegova močna indukcija po virusni okužbi dokazujeta, da smo identificirali pomemben regulator rastlinske signalizacije ter rastlinskega imunskega odziva. Vlogo gena StSAPK8 smo želeli še natančneje ovrednotiti, tako da smo gen v rastlini krompirja prehodno utišali s pomočjo siRNA (Slika 49). Izražanje gena po agroinfiltarciji ni bilo popolnoma utišano. Detektirali smo bazalni nivo izražanja gena v listih obeh genotipov ('Désirée' in NahG-Désirée), ki je bil primerljiv med virusno okuženimi in slepo okuženimi vzorci. Utišanje gena StSAPK8 je rezultiral v blokiranju virusne indukcije izražanja gena StSAPK8. V naslednji stopnji želimo proizvest stabilne transformante rastlin 'Désirée' z utišanim genom StSAPK8 in analizirati kakšen vpliv ima utišanje na virusno akumulacijo in širjenje ter izražanje obrambnih genov.

5.2 SKLEPI

Izgradili smo model rastlinskega imunskega odziva, ki konceptualno pojasnjuje glavno celično reprogramiranja, ki sledi virusni okužbi rastlin.

- Identificirali smo komponente vključene v imunski rastlinski odziv in njive interakcije opisali v obliki modelov hormonskih signalizacijskih poti. Izbrali smo HFPN formalizem in definirali ontologijo in hierarhijo na nivoju komponent ter reakcij. Na nivoju komponent smo ločili med metaboliti, proteini, geni ter proteinskimi kompleksi ter za vsako vrsto definirali specifično grafično reprezentacijo. Reakcije v katerih sodelujejo smo definirali kot izražanje genov, aktivacija proteinov, translokacija, vezava, razgradnja in inhibicija. Po potrebi smo komponente in interakcije hierarhično združevali na višjem nivoju abstrakcije.
- Izgradili smo tri ločene modele signalizacijskih poti SA, JA in ET. Opisali smo komponente in interakcije biosintezne poti vseh treh hormonov, percepcijo hormona ter način regulacije od SA/JA/ET odvisnih molekul. Natančno smo opisali regulatorne povezave med komponentami vključenimi v signalizacijsko pot in s tem omogočili boljše razumevanje poteka signala imunskega odgovora. V zadnji fazi smo vse tri modele združili v en velik model rastlinske imunske signalizacije.
- Razvili smo metodo Bio3Graf, iz literature pridobi informacije o interakcijah med komponentami in jih vizualizira v obliki usmerjenega grafa. S pomočjo metode smo potrdili in nadgradili povezave manualno izgrajenega modela rastlinskega imunskega odziva. V ta namen smo definirali slovarje bioloških komponent in reakcij, ki so za nas relevantne. Metoda Bio3Graf je uporabna za pridobivanje informacij iz literature o interakcijah med katerimikoli biološkimi komponentami.
- Na nivoju komponent smo model nadgradili s proteinskimi interaktorji, potencialnimi regulatorji imunskega odziva. Razširjen model smo iz navadnega repnjakovca prenesli na krompir, tako da smo definirali pripadajoče krompirjeve identifikatorje proteinov / genov vključenih v model. Tako smo z modelom opisali signalizacijske poti imunskega odziva krompirja.

Na različnih nivojih smo skozi perspektivo sistemske biologije analizirali dinamiko krompirjevega odziva na virusno okužbo. Preko analize mutant NahG-Désirée ter Désirée coi1-RNAi smo ovrednotili vlogo hormonov SA in JA pri tolerantnem odzivu rastlin krompirja 'Désirée' na okužbo z virusom PVY.

- V okuženih listih netransgenih rastlin 'Désirée' se je virus začel namoževati 5. dpi. V rastlinah NahG-Désirée, ki imajo okvarjeno signalizacijsko pot SA, smo povišano koncentracijo virusne RNA zaznali že 4. dpi, do 7. dpi pa je bila detektirana koncentracija virusne RNA v tem genotipu najvišja. V genotipu onesposobljenemu v signalizacijski poti JA nismo zaznali povišane koncentracije virusne RNA.
- Kljub temu, da se v tolerantni sorti krompirja 'Désirée' virus namnožuje pa okužene rastline niso razvile očitnih simptomov. Nasprotno pa so se točkovne in žilne nekroze razvile na rastlinah NahG-Désirée tako na inokuliranih (4. dpi) kot tudi sistemskih listih (11. dpi). Kaloza, ki se je kopičila okrog nekrotičnih lezij ni zadostovala za ustavitev virusnega širjenja. Virus se je pri rastlinah NahG-Désirée namreč širil v zgornje, sistemske liste, kjer smo ga zaznali že od 7. dpi. Rastline Désirée coi1-RNAi so na inokuliranih listih, ki še niso odpadli razvile klorotične obročke 11. dpi.
- Analiza celotnega transkriptoma inokuliranih listov krompirja 'Désirée' in NahG-Désirée ter sistemskih listov krompirjev 'Désirée' v različnih časovnih točkah je pokazala, da virusna okužba povzroči dinamične spremembe v izražanju številnih genov. Identificirali smo številne spremembe v izražanju genov vključenih v primarni metabolizem fotosinteze ter sladkorjev. Tudi geni iz signalizacijskih poti SA, JA in ET so dinamično regulirani. Spremembe so hitre in specifične; indukciji procesa v enem dnevu lahko sledi hitro reprogramiranje v naslednjem.
- Meritve fotosintetske aktivnosti v različnih časovnih točkah, so pokazale, da se virusno inducirano reprogramiranje izražanja genov le delno manifestira na fizioloških spremembah. Le-te so bolj stabilne od samega transkriptoma, kljub temu pa nekatere spremembe sovpadajo. Ko se v rastlinah 'Désirée' začne virusno namnoževanje (5. dpi), zaznamo hiter obrat v znižano izražanja genov povezanih z obema fotosistemoma. Podobno tudi dinamika fotokemične učinkovitosti sovpada s prehodnim upadom izražanja genov in se odraža v upadu učinkovitosti 5. dpi ter se ponovno povrne na nivo fotokemične učinkovitosti slepo okuženih rastlin v 7. dpi.
- Virusno inducirane spremembe proteoma krompirja 4. dpi se po večini nanašajo na proteine vključene v procese primarnega metabolizma, fotosintezo in Kalvinov cikel. Analiza obeh mutant je dokazala pomen hormonov SA in JA v odgovoru rastline na virusno okužbo.

Povezava modela signalizacijskih poti in eksperimentalnih podatkov je omogočila identifikacijo novih komponent imunskega odziva krompirja.

Identificirali smo dve kinazi StSAPK8 in StPK11 ter dve fosfatazi StPP2C in StAVR9, kot pomembne regulatorje. Filogenetske ter strukturne analize so predpostavili vključenost hormona ABA. Virusno inducirana kinaza StSAPK8 povezuje biotsko signaliziranje s signalizacijsko potjo ABA. Biotska signalizacija se najverjetneje vrši preko interakcije s komponentami JA (COI1) in ET (EBF1/EBF2) poti. Rezultati analiz proteinskih interakcij v kvasovkah ter hormonskih analiz nakazujejo na to, da kinaza StSAPK8, regulira ABA signalno pot najverjetneje v paru s fosfatazami StPP2C in StAVR9. Kinaza StSAPK8 je vključena tudi v kaskadno pot MAP kinaz preko interakcije s krompirjevo fosfatazo StMPK1.

Z doktorsko nalogo smo dosegli raziskovane cilje, saj smo izgradili model signalizacije imunskega odziva rastline na virusno okužbo, pridobili in integrirali nove eksperimentalne podatke, ter identificirali in ovrednotili nove ključne komponente sistema. Hkrati pa doktorska naloga tudi definira korake novega načina poteka dela v raziskavah sistemske biologije, ki je spreten prehod holističnega pogleda v fokus dotične komponente.

6 POVZETEK

Rastline so v naravnem okolju izpostavljene številnim povzročiteljem bolezni, kljub temu pa redko pride do razvoja bolezni, saj so razvile številne obrambne mehanizme, s katerimi prepoznajo povzročitelja bolezni in se pred njim branijo. Obramba pred povzročitelji bolezni vključuje sprožitev kompleksnih metabolnih in signalnih poti, ki vodijo v aktivacijo transkripcijskih faktorjev in s tem reprogramiranje izražanja genov, tako da namesto rutinskih celičnih potreb prednjačijo obrambni mehanizmi. S pristopi sistemske biologije smo analizirali molekularne mehanizme rastlinskega odziva na virusno okužbo.

Izgradili smo model signalizacijskih poti SA, JA in ET, glavnih fitohormonov rastlinskega imunskega odziva. Ker je najbolj proučena rastlina navadni repnjakovec (*Arabidopsis thaliana*) in imamo o njem na voljo največ podatkov, smo osnovni model zgradili na osnovi tega znanja. Povezave v modelu smo potrdili in razširili s povezavami, pridobljenimi z Bio3graf metodo za tekstovno rudarjenje, ki smo jo razvili tekom doktorskega dela. Z metodo smo iz strokovne literature pridobili povezave med komponentami modela v obliki tripletov, ki opisujejo dve komponenti in interakcijo v obliki reakcije med njima. V naslednji fazi smo v model dodali povezave s proteinskimi interaktorji komponent modela, ki so z netarčnimi pristopi že bile identificirane v navadnem repnjakovcu. Topološki model signalizacijskih poti rastlinskega imunskega sistema smo opisali v obliki usmerjenega grafa. Iz modelne rastline navadni repnjakovec smo model prevedli na kulturno rastlino krompir s pomočjo znanja o ortologiji genov.

Vzporedno z izgradnjo modela, smo analizirali dinamični odgovor krompirja (*Solanum tuberosum* L.) na okužbo s krompirjevim virusom Y (PVY). Virus PVY povzroča obročkaste nekroze gomoljev in zato bistveno vpliva tako na donose in kvaliteto pridelka ter povzroča veliko gospodarsko škodo v Sloveniji in v svetu. Kljub marsikaterim raziskavam na tem področju pa ostajajo molekularni mehanizmi odgovora rastline na virusno okužbo ter predvsem njihova dinamika precej nepojasnjena.

V doktorskem delu smo zato analizirali dinamični odziv krompirja na različnih molekularnih in fizioloških nivojih. S pomočjo omskih pristopov ter analize na nivoju fizioloških dejavnikov smo na različnih nivojih analizirali dinamiko odziva krompirja sorte 'Désirée' okuženega z virusom PVY^{NTN}. S pomočjo analize mutant smo želeli dodatno razdelati odgovor rastline v kontekstu signalizacijskih poti hormonov SA (NahG-Désirée) in JA (Désirée coi1-RNAi).

Virus PVY se v tolerantni sorti krompirja 'Désirée' sicer namnožuje vendar okužene rastline ne razvijejo očitnih simptomov. Nasprotno so se točkovne in žilne nekroze razvile

na rastlinah NahG-Désirée tako na inokuliranih kot tudi sistemskih listih. Kaloza, ki se je kopičila okrog nekrotičnih lezij okuženih listov tega genotipa ni zadostovala za ustavitev virusnega širjenja. V inokuliranih listih rastlinah Désirée coi1-RNAi se virusna koncentracija tekom preiskovaih dni ni povečevala, na okuženih listih nekaterih rastlin pa so se pojavili simptomi v obliki obročkasih kloroz.

Analiza izražanja genov krompirja pokazala, da je odgovor rastline na virusno okužbo vse prej kot statična aktivacija ključnih komponent. V nasprotju, opazili smo dinamično aktivacijo in inhibicijo velikega števila genov. Kljub ogromnim dinamičnim spremembam na nivoju izražanja genov, pa se le del teh nihanj odraža v spremembah na nivoju proteoma oziroma v končnih fizioloških spremembah.

S cDNA-mikromrežami smo analizirali izražanje genov celotnega transkriptoma v inokuliranih listih rastlin 'Désirée' in rastlin NahG-Désirée 0., 1., 3., 4., 5. in 7. dpi z virusom PVY ter v sistemskih listih rastlin 'Désirée' 0., 1., 3., 4., 5., 7., 8., 9. in 11. dpi. Rezultati so identificirali dinamično reprogramiranje velikega števila genov vključenih tako v primarni metabolizem kot signalizacijske poti hormonov. Pri rastlinah 'Désirée' so fotosintezni geni v prvih dneh po okužbi prehodno inducirani, ko pa se virus v rastlini namnoži se njihovo izražanje zmanjša. Rezultati so pokazali, da so spremembe izražanja genov vključene v signalizacijsko pot SA, JA in ET specifične in natančno časovno regulirane.

Virusno inducirano reprogramiranje izražanja genov se je le delno manifestiralo v meritvah fotosintetske aktivnosti. Spremembe fotosintetske aktivnosti smo ocenili z analizami dinamike neto fotosinteze, vsebnosti klorofila, fotokemične učinkovitost, hitrost transporta elektronov po tilakoidi, prevodnostjo listnih rež ter transpiracijo. Virusna okužba rastlin 'Désirée' prehodno zniža fotokemično učinkovitosti 5. dpi, vendar pa se ponovno povrne na nivo fotokemične učinkovitosti slepo okuženih rastlin v 7 dpi. Dinamika prehodnega znižanja sovpada z dinamiko izražanja genov povezanih s svetlobnimi reakcijami in obema fotosistemoma.

Analize proteoma po okužbi rastlin 'Désirée', NahG-Désirée in Désirée coi1-RNAi z virusom PVY so pokazale, da je stabilnost proteoma večja od stabilnosti transkriptoma. Identificirali smo 24 proteinov, katerih koncentracija se je statistično značilno spremenila po okužbi. Večina identificiranih proteinov je vključenih v primarni metabolizem fotosinteze in sodelujejo bodisi v svetlobnih reakcijah, dihanju ali Kalvinovem ciklu.

Novo pridobljeni eksperimentalni podatki o dinamiki odziva na kulturno pomembni rastlini krompir so omogočili izgradnjo mostu in povezave z informacijami modela signalizacijskih poti ter modelne rastline. Z integracijo obeh pristopov, modeliranja ter bioloških dinamičnih analiz, smo identificirali nove potencialno ključne komponente v odzivu rastline. Vlogo dveh kinaz (StSAPK8 in StPK11) ter dveh fosfataz (StPP2C in StAVR9) smo testirali s funkcionalnimi analizami. Filogenetske analize, rezultati prehodnega utišanja, identifikacija proteinskih interaktorjev z metodo dvohibridnega sistema kvasovk ter analiza izražanja krompirjevih genov po tretiranjih s hormoni ABA, JA, SA in ET so potrdile, da je StSAPK8 pomemben regulator rastlinskega imunskega odziva.

7 SUMMARY

Plants in the natural environment are constantly exposed to microorganisms, although due to the diverse plant defense mechanisms, with which the plant recognize the microorganism and defend itself, only a subset of the interactions result in a disease. Plant defense against pathogens includes activation of complex metabolic and signaling cascades resulting in activation of transcription factors, and reprogramming of cell metabolism which consequently balances between inductions of defense mechanism on one site and meeting routine cell needs on the other. Systems biology approach was used to analyze dynamics of plant response to virus infection.

A model including signaling pathways of SA, JA and ET, three main phytohormones responsible for plant immune response, has been constructed. Our first model based on the most studied and best characterized plant species, Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*). Reactions in the model have been validated and expanded with Bio3Graph, a text mining method, which was developed specifically for this task. The method enabled us to extract information about interaction between components of the model from publically available literature in the form of triplets, describing two components and the interaction/reaction between them. In the next step we introduced into the model interactions with protein interactors, which have previously been identified with non-targeted approaches. This topological model was constructed in the shape of directed graph and translated to the potato through orthologue genes.

In parallel with model construction, dynamics of potato (*Solanum tuberosum* L.) response to PVY was analyzed. PVY causes ring necrosis on the tubers and therefore critically affects quality and quantity of crop yield. It causes great economic losses in Slovenia and around the world. Despite extensive research in this field the molecular mechanisms in plant defense after virus infection, especially the dynamics of the response remains largely unknown.

Therefore in this work we have analyzed the dynamics of potato response on the level of transcriptomics and other phenotypic parameters. With the help of omics approaches and other physiological parameters we analyzed the dynamics of tolerant potato 'Désirée' response to PVY^{NTN}. The analysis of two genotypes enabled us to evaluate the importance of two hormones, SA (NahG-Désirée) and JA (Désirée coi1-RNAi) in the plant defense response.

In tolerant potato cultivar 'Désirée' PVY starts to accumulate however the leaves remain asymptomatic. On contrary NahG-Désirée plants develop necrotic lesions on inoculated

as well as on the systemic leaves. Calose deposits that demarcate necrotic lesions of inoculated NahG-Désirée leaves, are not sufficient to stop the virus spread. In inoculated leaves of Désirée coi1-RNAi plants, the PVY concentration did not accumulate, however, symptoms in the form of chlorotic lesions appeared at 11 dpi.

Gene expression profiles revealed that the potato response to PVY infection is far from being a static induction of key components. Instead, strong dynamics in the responses is observed. We show that while the dynamics of responses at the transcriptional level is extensive and bimodal, this is only partially translated to the protein level, and to the final functional outcome.

We used cDNA microarrays to analyze the differences in gene expression of whole transcriptome of inoculated leaves of cultivar 'Désirée' and NahG-Désirée plants following 0, 1, 3, 4, 5. and 7 dpi with PVY and following 0, 1, 3, 4, 5, 7, 8, 9, and 11 dpi in upper non-inoculated leaves of cultivar 'Désirée'. Analysis identified dynamic reprograming of gene expression involved in primary metabolism and hormonal signaling pathways as well as in other processes. In infected potato plants cultivar 'Désirée' the genes involved in photosynthesis were transiently induced, and inhibited after virus starts to multiply. Changes in expression of genes involved in SA, JA and ET signaling pathways are specific and carefully regulate in time.

Virus induced reprograming of gene expression was only partially manifested in changes of fotosinthetic activity. Changes in photosynthetic activity were evaluated with measurements of following parameters: net photosynthetic rate, chlorophyll content, photochemical efficiency, electron transport rate, stomatal conductivity and transpiration. In 'Désirée' plants, photochemical efficiency was relatively unresponsive and stable initially but transiently decreased at 5. dpi. The dynamics of chlorophyll fluorescence measurement corresponds to the expression pattern of light-reaction genes and genes coding for both photosystems.

Analysis of potato proteome changes of three genotypes 'Désirée', NahG-Désirée and Désirée coi1-RNAi indicated that proteome is more stable than the transcriptome. We identified 24 proteins which abundance was statistically altered after PVY infection. Most of the identified proteins are involved in primary metabolism of photosynthesis (Calvin cycle, light reactions and photorespiration).

Integration of both approaches, modelling and experimental data, enabled us to identify novel potentially crucial components in plant defense. The role of two kinases (StSAPK8 in StPK11) and two phosphatases (StPP2C in StAVR9) has been evaluated with

functional analysis. Phylogenetic analysis, results of transient silencing, identification of protein interactions with Y2H method and gene expression analysis of potato genes following hormonal treatment with ABA, JA, SA and ET confirmed that StSAPK8 is indeed an important regulator of plant defense.

8 VIRI

- Alazem, M., Lin, K.-Y. in Lin, N.-S. 2014. The abscisic acid pathway has multifaceted effects on the accumulation of Bamboo mosaic virus. Molecular plant-microbe interactions : MPMI, 27, 2: 177–189
- Alazem, M. in Lin, N.-S. 2015. Roles of plant hormones in the regulation of host-virus interactions. Molecular plant pathology, 16, 5: 529–540
- Albert, M. 2013. Peptides as triggers of plant defence. Journal of Experimental Botany, 1-11
- Alfred, J., Dangl, J. L., Kamoun, S. in McCouch, S. R. 2014. New Horizons for Plant Translational Research. PLoS Biology, 12, 6, e1001880. doi:10.1371/journal.pbio.1001880: 3 str.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. in Lipman, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. Journal of molecular biology, 215, 3: 403–10
- Anderson, J. P., Badruzsaufari, E., Schenk, P. M., Manners, J. M. in Desmond, O. J. 2004. Antagonistic Interaction between Abscisic Acid and Jasmonate-Ethylene Signaling Pathways Modulates Defense Gene Expression and Disease Resistance in Arabidopsis. Society, 16: 3460–3479
- Andolfo, G. in Ercolano, M. R. 2015. Plant Innate Immunity Multicomponent Model. Frontiers in plant science, 6, 987. doi:10.3389/fpls.2015.00987: 6 str.
- Arias, M. C., Lenardon, S. in Taleisnik, E. 2003. Carbon Metabolism Alterations in Sunflower Plants Infected with the Sunflower Chlorotic Mottle Virus. Journal of Phytopathology, 151, 5: 267–273
- Baebler, S., Krecic-Stres, H., Rotter, A., Kogovsek, P., Cankar, K., Kok, E. J., Gruden, K., Kovac, M., Zel, J., Pompe-Novak, M. in Ravnikar, M. 2009a. PVY(NTN) elicits a diverse gene expression response in different potato genotypes in the first 12 h after inoculation. Molecular plant pathology, 10, 2: 263–275
- Baebler, S., Krecic-Stres, H., Rotter, A., Kogovsek, P., Cankar, K., Kok, E. J., Gruden, K., Kovac, M., Zel, J., Pompe-Novak, M. in Ravnikar, M. 2009b. PVY(NTN) elicits a diverse gene expression response in different potato genotypes in the first 12 h after inoculation. Molecular plant pathology, 10, 2, 263–275. doi:10.1111/j.1364-3703.2008.00530.
- Baebler, Š., Witek, K., Petek, M., Stare, K., Tušek-Žnidarič, M., Pompe-Novak, M., Renaut, J., Szajko, K., Strzelczyk-Żyta, D., Marczewski, W., Morgiewicz, K., Gruden, K. in Hennig, J. 2014. Salicylic acid is an indispensable component of the Ny-1 resistance-gene-mediated response against Potato virus Y infection in potato. Journal of experimental botany, 65, 4: 1095–1109
- Baghalian, K., Hajirezaei, M.-R. in Schreiber, F. 2014. Plant Metabolic Modeling: Achieving New Insight into Metabolism and Metabolic Engineering. The Plant Cell, 26, 10: 3847–3866
- Barrett, T., Troup, D. B., Wilhite, S. E., Ledoux, P., Rudnev, D., Evangelista, C., Kim, I.

F., Soboleva, A., Tomashevsky, M., Marshall, K. A., Phillippy, K. H., Sherman, P. M., Muertter, R. N. in Edgar, R. 2009. NCBI GEO: archive for high-throughput functional genomic data. Nucleic acids research, 37: 885–890

- Benjamini, Y. in Hochberg, Y. 1995. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological), 57, 1: 289 300
- Berry, J. O., Yerramsetty, P., Zielinski, A. M. in Mure, C. M. 2013. Photosynthetic gene expression in higher plants. Photosynthesis research. doi:10.1007/s11120-013-9880-8: 30 str.
- Bilgin, D. D., Zavala, J. a, Zhu, J., Clough, S. J., Ort, D. R. in DeLucia, E. H. 2010. Biotic stress globally downregulates photosynthesis genes. Plant, cell & environment, 33, 10: 1597–613
- Bolouri Moghaddam, M. R. in Van den Ende, W. 2012. Sugars and plant innate immunity. Journal of experimental botany, 63, 11: 3989–3998
- Bolton, M. D. 2009. Primary metabolism and plant defense-fuel for the fire. Molecular Plant-Microbe Interactions : MPMI, 22, 5: 487–97
- Burra, D. D., Mühlenbock, P. in Andreasson, E. 2015. Salicylic and jasmonic acid pathways are necessary for defence against Dickeya solani as revealed by a novel method for Blackleg disease screening of in vitro grown potato. Plant Biology, 17, 5: 1030–1038
- Caarls, L., Pieterse, C. M. J. in Van Wees, S. C. M. 2015. How salicylic acid takes transcriptional control over jasmonic acid signaling. Frontiers in Plant Science, 6: 1-11
- Caplan, J. L., Kumar, A. S., Park, E., Padmanabhan, M. S., Hoban, K., Modla, S., Czymmek, K., Dinesh-Kumar, S. P. 2015. Chloroplast Stromules Function during Innate Immunity. Developmental Cell: 1–13
- Carr, J. P., Lewsey, M. G., Palukaitis, P. 2010. Signaling in induced resistance. V: Advances in virus research Vol. 76 1st ed. London, Acaddemic press.: 57-121
- Centro Internacional de la Papa 2010. Facts and figures about potato. http://cipotato.org/potato/publications/pdf/005449.pdf (18. 2. 2014)
- Chae, L., Lee, I., Shin, J., Rhee, S. Y. 2012. Towards understanding how molecular networks evolve in plants. Current Opinion in Plant Biology, 15, 2: 177–184
- Chandra-Shekara, a C., Navarre, D., Kachroo, A., Kang, H.-G., Klessig, D., Kachroo, P. 2004. Signaling requirements and role of salicylic acid in HRT- and rrt-mediated resistance to turnip crinkle virus in Arabidopsis. The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology, 40, 5: 647–659
- Cheng, Y.-Q., Liu, Z.-M., Xu, J., Zhou, T., Wang, M., Chen, Y.-T., Li, H.-F. in Fan, Z.-F. 2008. HC-Pro protein of sugar cane mosaic virus interacts specifically with maize ferredoxin-5 in vitro and in planta. The Journal of general virology, 89, 8: 2046–

2054

- Childs, K. L., Hamilton, J. P., Zhu, W., Ly, E., Cheung, F., Wu, H., Rabinowicz, P. D., Town, C. D., Buell, C. R., Chan, A. P. 2007. The TIGR Plant Transcript Assemblies database. Nucleic Acids Research, 35: 846–851
- Chu, Y., Corey, D. R. 2012. RNA sequencing: platform selection, experimental design, and data interpretation. Nucleic Acid Therapeutics, 22, 4: 271–274
- Chuang, H.-Y., Hofree, M., Ideker, T. 2010. A decade of systems biology. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 26: 721–744
- Clemente-Moreno, M. J., Díaz-Vivancos, P., Rubio, M., Fernández-García, N., Hernández, J. a. 2013. Chloroplast protection in plum pox virus-infected peach plants by L-2-oxo-4-thiazolidine-carboxylic acid treatments: effect in the proteome. Plant, Cell in Environment, 36, 3: 640–654
- Coello, P., Hey, S. J. in Halford, N. G. 2011. The sucrose non-fermenting-1-related (SnRK) family of protein kinases: potential for manipulation to improve stress tolerance and increase yield. Journal of experimental botany, 62, 3: 883–93
- Collum, T. D. in Culver, J. N. 2016. The impact of phytohormones on virus infection and disease. Current Opinion in Virology, 17: 25–31
- Consortium, A. I. M. 2011. Evidence for network evolution in an Arabidopsis interactome map. Science, 333, 6042: 601–607
- Coppola, V., Coppola, M., Rocco, M., Digilio, M. C., D'Ambrosio, C., Renzone, G., Martinelli, R., Scaloni, A., Pennacchio, F., Rao, R., Corrado, G. 2013. Transcriptomic and proteomic analysis of a compatible tomato-aphid interaction reveals a predominant salicylic acid-dependent plant response. BMC Genomics, 14, 515: 18 str.
- Coquoz, J., Buchala, a, Metraux, J. 1998. The biosynthesis of salicylic acid in potato plants. Plant Physiology, 117, 3: 1095–1101
- De Vos, M., Van Oosten, V. R., Van Poecke, R. M. P., Van Pelt, J. A., Pozo, M. J., Mueller, M. J., Buchala, A. J., Métraux, J.-P., Van Loon, L. C., Dicke, M., Pieterse, C. M. J. 2005. Signal signature and transcriptome changes of Arabidopsis during pathogen and insect attack. Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI, 18, 9: 923–937
- Dempsey, D. A., Vlot, A. C., Wildermuth, M. C., Klessig, D. F. 2011. Salicylic Acid biosynthesis and metabolism V: The Arabidopsis Book. Vol. 9. 9th ed. American Society of Plant Biologists: 8 str. <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3268552/</u>

- Derksen, H., Rampitsch, C., Daayf, F. 2013. Signaling cross-talk in plant disease resistance. Plant Science: An International Journal of Experimental Plant Biology, 207: 79–87
- Devoto, A., Turner, J. G. 2005. Jasmonate-regulated Arabidopsis stress signalling network. Physiologia Plantarum, 123, 2: 161–172
- Dinesh-Kumar, S. P., Tham, W. H., Baker, B. J. 2000. Structure-function analysis of the tobacco mosaic virus resistance gene N. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 97, 26: 14789–14794
- Dobnik, D., Baebler, S., Kogovšek, P., Pompe-Novak, M., Stebih, D., Panter, G., Janež, N., Morisset, D., Zel, J., Gruden, K. 2013. β-1,3-glucanase class III promotes spread of PVY(NTN) and improves in planta protein production. Plant Biotechnology Reports, 7: 547–555
- Dong Xue-Fei, C. N., Wang, L., Zhao, X.-C., Qu, B., Li, T.-L., Zhang, G.-L. 2012. The SnRK Protein Kinase Family and the Function of SnRK1 Protein Kinase. International Journal of Agriculture and Biology, 14: 575–579
- Dressaire, C., Gitton, C., Loubière, P., Monnet, V., Queinnec, I. in Cocaign-Bousquet, M. 2009. Transcriptome and proteome exploration to model translation efficiency and protein stability in Lactococcus lactis. PLoS computational biology, 5, 12: e1000606. doi:10.1371/journal.pcbi.1000606: 12 str.
- Ellis, R. J. 1979. The most abundant protein in the world. Trends in Biochemical Sciences, 4, 11: 241–244
- Food and Agriculture Organisation 2014. FAOSTAT: Potato (116): http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/search/potato/E (1. 10. 2015)
- Fernández, J. M., Hoffmann, R., Valencia, A. 2007. iHOP web services. Nucleic Acids Research, 35: 21–26
- Fernie, A. R., Stitt, M. 2012. On the discordance of metabolomics with proteomics and transcriptomics: coping with increasing complexity in logic, chemistry, and network interactions scientific correspondence. Plant Physiology, 158, 3: 1139–45
- Feys, B. J., Parker, J. E. 2000. Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. Trends in Genetics, 16, 10: 449–455
- Fridborg, I., Grainger, J., Page, A., Coleman, M., Findlay, K., Angell, S. 2003. TIP, a novel host factor linking callose degradation with the cell-to-cell movement of Potato virus X. Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI, 16, 2: 132–40
- Fukushima, A., Kusano, M., Redestig, H., Arita, M., Saito, K. 2009. Integrated omics approaches in plant systems biology. Current Opinion in Chemical Biology, 13, 5-6: 532–538
- García-Marcos, A., Pacheco, R., Manzano, A., Aguilar, E., in Tenllado, F. 2013. Oxylipin

biosynthesis genes positively regulate programmed cell death during compatible infections with the synergistic pair potato virus X-potato virus Y and Tomato spotted wilt virus. Journal of Virology, 87, 10: 5769–5783

- Ge, H., Walhout, A. J. M., Vidal, M. 2003. Integrating "omic" information: A bridge between genomics and systems biology. Trends in Genetics, 19, 10: 551–560.
- Genoud, T., Métraux, J. 1999. Crosstalk in plant cell signaling: structure and function of the genetic network. Trends in Plant Science, 4, 12: 503–507
- Genoud, T., Trevino, M. B., Cruz, S., Me, J. 2001. Numeric Simulation of Plant Signaling Networks. American Society of Plant Biologists, 126: 1430-1437
- Geri, C., Love, A. J., Cecchini, E., Barrett, S. J., Laird, J., Covey, S. N., Milner, J. J. 2004. Arabidopsis mutants that suppress the phenotype induced by transgene-mediated expression of cauliflower mosaic virus (CaMV) gene VI are less susceptible to CaMV-infection and show reduced ethylene sensitivity. Plant Molecular Biology, 56, 1: 111–124
- Giersch, C., Sivak, M. N., Walker, D. A., Sciences, P. B. in Jul, N. 2007. A Mathematical Skeleton Model of Photosynthetic Oscillations, 245, 1312: 77–83
- Gutiérrez, R. A., Shasha, D. E., Coruzzi, G. M. 2005. Systems biology for the virtual plant. Plant Physiology, 138, 2, 550–554
- Haider, S. in Pal, R. 2013. Integrated Analysis of Transcriptomic and Proteomic Data. Current Genomics, 14, 2: 91–110
- Halford, N. G. in Hey, S. J. 2009. Snf1-related protein kinases (SnRKs) act within an intricate network that links metabolic and stress signalling in plants. The Biochemical journal, 419, 2: 247–59
- Halim, V. A., Eschen-Lippold, L., Altmann, S., Birschwilks, M., Scheel, D., Rosahl, S. 2007. Salicylic acid is important for basal defense of Solanum tuberosum against Phytophthora infestans. Molecular Plant-Microbe Interactions : 20, 11: 1346–1352
- Halim, V. A., Vess, A., Scheel, D., Rosahl, S. 2006. The role of salicylic acid and jasmonic acid in pathogen defence. Plant Biology, 8, 3: 307–313
- Handford, M. G., Carr, J. P. 2007. A defect in carbohydrate metabolism ameliorates symptom severity in virus-infected Arabidopsis thaliana. The Journal of General Virology, 88, 1: 337–341
- Hawari, A. H., Mohamed-Hussein, Z.-A. 2010. Simulation of a Petri net-based model of the terpenoid biosynthesis pathway. BMC Bioinformatics, 11: doi:10.1186/1471-2105-11-83: 11 str.
- Herbers, K., Takahata, Y., Melzer, M., Mock, H. P., Hajirezaei, M., Sonnewald, U. 2000. Regulation of carbohydrate partitioning during the interaction of potato virus Y with
tobacco. Molecular Plant Pathology, 1, 1: 51-59

- Hinrichs-Berger, J., Harfold, M., Berger, S., Buchenauer, H. 1999. Cytological responses of susceptible and extremely resistant potato plants to inoculation with potato virus Y. Physiological and Molecular Plant Pathology, 55, 3: 143–150
- Hipper, C., Brault, V., Ziegler-Graff, V. in Revers, F. 2013. Viral and cellular factors involved in Phloem transport of plant viruses. Frontiers in plant science, 4, 154: doi:10.3389/fpls.2013.00154: 24 str.
- Hirayama, T. in Umezawa, T. 2010. The PP2C-SnRK2 complex: the central regulator of an abscisic acid signaling pathway. Plant signaling & behavior, 5, 2: 160–163
- Hodgson, R. A., Beachy, R. N. in Pakrasi, H. B. 1989. Selective inhibition of photosystem II in spinach by tobacco mosaic virus: an effect of the viral coat protein. FEBS letters, 245, 2: 267–270
- Hoehenwarter, W., Chen, Y., Recuenco-Munoz, L., Wienkoop, S. in Weckwerth, W. 2011. Functional analysis of proteins and protein species using shotgun proteomics and linear mathematics. Amino Acids, 41, 2: 329–341
- Hogeweg, P., Hesper, B. 1978. Interactive instruction on population interactions. Computers in Biology and Medicine, 8, 4: 319–327
- Hrabak, E. M., Chan, C. W. M., Gribskov, M., Harper, J. F., Choi, J. H., Halford, N., Kudla, J., Luan, S., Nimmo, H. G., Sussman, M. R., Thomas, M., Walker-Simmons, K., Zhu, J.-K., in Harmon, A. C. 2003. The Arabidopsis CDPK-SnRK superfamily of protein kinases. Plant Physiology, 132, 2: 666–680
- Ideker, T., Galitski, T., Hood, L. 2001. A n ew a pproach to decoding life : Systems Biology. Annual Review of Genomics and Human Genetics, 2, 1: 343–372
- Jones, J. D. G., Dangl, J. L. 2006. The plant immune system. Nature, 444, 7117: 323-329
- Kanehisa, M., Goto, S., Sato, Y., Furumichi, M., Tanabe, M. 2012. KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets. Nucleic Acids Research, 40: 109–114
- Karasev, A. V, Gray, S. M. 2013. Continuous and emerging challenges of Potato virus Y in potato. Annual Review of Phytopathology, 51: 571–586
- Karimi, M., Inzé, D., Depicker, A. 2002. GATEWAYTM vectors for Agrobacteriummediated plant transformation. Trends in Plant Science, 7, 5: 193–195
- Kazan, K., Manners, J. M. 2013. MYC2: The Master in Action. Molecular Plant, 6, 3: 686–703
- Kestler, H. A., Wawra, C., Kracher, B., Kühl, M. 2008. Network modeling of signal transduction: establishing the global view. BioEssays, 30, 11-12: 1110–1125
- Kitano, H. 2002. Computational systems biology. Nature, 420, 6912: 206-210

- Kloosterman, B., De Koeyer, D., Griffiths, R., Flinn, B., Steuernagel, B., Scholz, U., Sonnewald, S., Sonnewald, U., Bryan, G. J., Prat, S., Bánfalvi, Z., Hammond, J. P., Geigenberger, P., Nielsen, K. L., Visser, R. G. F., Bachem, C. W. B. 2008. Genes driving potato tuber initiation and growth: identification based on transcriptional changes using the POCI array. Functional in Integrative Genomics, 8, 4: 329–340
- Kogovsek, P., Gow, L., Pompe-Novak, M., Gruden, K., Foster, G. D., Boonham, N., Ravnikar, M. 2008. Single-step RT real-time PCR for sensitive detection and discrimination of Potato virus Y isolates. Journal of Virological Methods, 149, 1: 1– 11
- Kogovšek, P., Pompe-Novak, M., Baebler, Š., Rotter, A., Gow, L., Gruden, K., Foster, G. D., Boonham, N., Ravnikar, M. 2010. Aggressive and mild Potato virus Y isolates trigger different specific responses in susceptible potato plants. Plant Pathology, 59, 6: 1121–1132
- Kogovsek, P., Ravnikar, M. 2013. Physiology of the Potato–Potato Virus Y Interaction.V: Progress in botany. Vol. 74. U. Lüttge, W. Beyschlag, D. Francis, in J. Cushman (eds.). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg: 101-133
- Koornneef, A., Pieterse, C. M. J. 2008. Cross talk in defense signaling. Plant Physiology, 146, 3: 839–844
- Koornneef, M. in Meinke, D. 2010. The development of Arabidopsis as a model plant. The Plant journal : for cell and molecular biology, 61, 6: 909–621
- Kovač, M., Müller, A., Milovanovič Jarh, D., Milavec, M., Düchting, P., Ravnikar, M. 2009. Multiple hormone analysis indicates involvement of jasmonate signalling in the early defence of potato to potato virus YNTN. Biologia Plantarum, 53, 1: 195– 199
- Krecic-Stres, H., Vucak, C., Ravnikar, M., in Kovac, M. 2005. Systemic Potato virus YNTN infection and levels of salicylic and gentisic acids in different potato genotypes. Plant Pathology, 54, 4: 441–447
- Kruger, N. J., Ratcliffe, R. G. 2015. Fluxes through plant metabolic networks: measurements, predictions, insights and challenges. Biochemical Journal, 465, 1: 27–38
- Kulik, A., Wawer, I., Krzywińska, E., Bucholc, M., Dobrowolska, G. 2011. SnRK2 protein kinases--key regulators of plant response to abiotic stresses. Omics: A Journal of Integrative Biology, 15, 12: 859–872
- Lamesch, P., Berardini, T. Z., Li, D., Swarbreck, D., Wilks, C., Sasidharan, R., Muller,
 R., Dreher, K., Alexander, D. L., Garcia-Hernandez, M., Karthikeyan, A. S., Lee, C.
 H., Nelson, W. D., Ploetz, L., Singh, S., Wensel, A., Huala, E. 2012. The
 Arabidopsis Information Resource (TAIR): improved gene annotation and new

tools. Nucleic Acids Research, 40: 1202-1210

- Lemoine, R., La Camera, S., Atanassova, R., Dédaldéchamp, F., Allario, T., Pourtau, N., Bonnemain, J.-L., Laloi, M., Coutos-Thévenot, P., Maurousset, L., Faucher, M., Girousse, C., Lemonnier, P., Parrilla, J. in Durand, M. 2013. Source-to-sink transport of sugar and regulation by environmental factors. Frontiers in plant science, 4, 272: doi:10.3389/fpls.2013.00272: 21 str.
- Li, C., Schilmiller, A. L., Liu, G., Lee, G. I., Jayanty, S., Sageman, C., Vrebalov, J., Giovannoni, J. J., Yagi, K., Kobayashi, Y., Howe, G. A. 2005. Role of beta-oxidation in jasmonate biosynthesis and systemic wound signaling in tomato. The Plant Cell, 17, 3: 971–986
- Li, L., Stoeckert, C. J. in Roos, D. S. 2003. OrthoMCL: identification of ortholog groups for eukaryotic genomes. Genome research, 13, 9: 2178–2189
- Li, W., Zhao, Y., Liu, C., Yao, G., Wu, S., Hou, C., Zhang, M., Wang, D. 2012. Callose deposition at plasmodesmata is a critical factor in restricting the cell-to-cell movement of Soybean mosaic virus. Plant Cell Reports, 31, 5: 905–916
- Li, Y., Cui, H., Cui, X. in Wang, A. 2016. The altered photosynthetic machinery during compatible virus infection. Current Opinion in Virology, 17: 19–24
- Lin, L., Luo, Z., Yan, F., Lu, Y., Zheng, H. in Chen, J. 2011. Interaction between potyvirus P3 and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RubisCO) of host plants. Virus Genes, 43, 1: 90–92
- Lin, S. M., Du, P., Huber, W., Kibbe, W. A. 2008. Model-based variance-stabilizing transformation for Illumina microarray data. Nucleic Acids Research, 36, 2: doi:10.1093/nar/gkm1075: 9 str.
- Lopez-Romero, P. 2012. Agi4x44Preprocess: 29 str. http://www.bioconductor.org/packages/2.13/bioc/manuals/Agi4x44PreProcess/man /Agi4x44PreProcess.pdf (junij 2015)
- Lorimer, G. H. 1981. The Carboxylation and Oxygenation of Ribulose 1,5-Bisphosphate: The Primary Events in Photosynthesis and Photorespiration. Annual Review of Plant Physiology, 32, 1: 349–382
- Love, A. J., Geri, C., Laird, J., Carr, C., Yun, B.-W., Loake, G. J., Tada, Y., Sadanandom, A., Milner, J. J. 2012. Cauliflower mosaic virus protein P6 inhibits signaling responses to salicylic acid and regulates innate immunity. PloS One, 7, 10: doi:10.1371/journal.pone.0047535: 12 str.
- Love, A. J., Yun, B. W., Laval, V., Loake, G. J., Milner, J. J. 2005. Cauliflower mosaic virus, a compatible pathogen of Arabidopsis, engages three distinct defensesignaling pathways and activates rapid systemic generation of reactive oxygen species. Plant Physiology, 139, 2: 935–948
- Machado, D., Costa, R. S., Rocha, M., Ferreira, E. C., Tidor, B., Rocha, I. 2011. Modeling

formalisms in Systems Biology. AMB Express, 1, 45: doi:10.1186/2191-0855-1-45: 14 str.

- Maier, T., Schmidt, A., Güell, M., Kühner, S., Gavin, A.-C., Aebersold, R. in Serrano, L. 2011. Quantification of mRNA and protein and integration with protein turnover in a bacterium. Molecular systems biology, 7, 511: 18 str.
- Makino, A., Sakashita, H., Hidema, J., Mae, T., Ojima, K. in Osmond, B. 1992. Distinctive Responses of Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase and Carbonic Anhydrase in Wheat Leaves to Nitrogen Nutrition and their Possible Relationships to CO(2)-Transfer Resistance. Plant physiology, 100, 4: 1737–1743
- Mandadi, K. K., Scholthof, K.-B. G. 2012. Characterization of a viral synergism in the monocot Brachypodium distachyon reveals distinctly altered host molecular processes associated with disease. Plant Physiology, 160, 3: 1432–1452
- Mandadi, K. K., Scholthof, K.-B. G. 2013. Plant immune responses against viruses: how does a virus cause disease? The Plant Cell, 25, 5: 1489–1505
- Mazzocchi, F. 2012. Complexity and the reductionism-holism debate in systems biology. Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine, 4, 5: 413–427
- Mehle, N., Kovač, M., Petrovič, N., Novak, M. P., Baebler, Š., Stres, H. K., Gruden, K., Ravnikar, M. 2004. Spread of potato virus YNTN in potato cultivars (Solanum tuberosum L.) with different levels of sensitivity. Physiological and Molecular Plant Pathology, 64, 6: 293–300
- Milavec, M., Ravnikar, M., Kovač, M. 2001. Peroxidases and photosynthetic pigments in susceptible potato infected with potato virus YNTN. Plant Physiology and Biochemistry, 39, 10: 891–898
- Miljkovic, D. 2015. Incremental Construction of Biological Networks by Relation Extraction from Literature. Current Bioinformatics, 10: 23 str. http://benthamscience.com/journals/currentbioinformatics/volume/10/issue/2/page/177/ (september 2015)
- Miljkovic, D., Stare, T., Mozetic, I., Podpecan, V., Petek, M., Witek, K., Dermastia, M., Lavrac, N., Gruden, K. 2012. Signalling network construction for modelling plant defence response. PLoS ONE, 7, 12: doi:10.1371/journal.pone.0051822: 18 str.
- Moore, J. W., Loake, G. J., Spoel, S. H. 2011. Transcription dynamics in plant immunity. The Plant Cell, 23, 8: 2809–2820
- Mur, L. A. J., Kenton, P., Atzorn, R., Miersch, O., Wasternack, C. 2006. The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death. Plant Physiology, 140, 1: 249–262
- Mur, L. A. J., Prats, E., Pierre, S., Hall, M. A., Hebelstrup, K. H. 2013. Integrating nitric

oxide into salicylic acid and jasmonic acid/ ethylene plant defense pathways. Frontiers in Plant Science, 4, 215: doi:10.3389/fpls.2013.00215: 7 str.

- Mysore, K. S., Ryu, C.-M. 2004. Nonhost resistance: how much do we know? Trends in Plant Science, 9, 2: 97–104
- Nakahara, K. S., Masuta, C. 2014. Interaction between viral RNA silencing suppressors and host factors in plant immunity. Current Opinion in Plant Biology, 20: 88–95
- Naseem, M., Philippi, N., Hussain, A., Wangorsch, G., Ahmed, N., Dandekar, T. 2012. Integrated systems view on networking by hormones in Arabidopsis immunity reveals multiple crosstalk for cytokinin. The Plant Cell, 24, 5: 1793–814
- Nelissen, H., Moloney, M., Inzé, D. 2014. Translational research: from pot to plot. Plant Biotechnology Journal, 12, 3: 277–285
- Nicaise, V. 2014. Crop immunity against viruses: outcomes and future challenges. Frontiers in Plant Science, 5, 660: doi:10.3389/fpls.2014.00660: 17 str.
- Nolte, P., Whitworth, J. L., Thornton, M. K., McIntosh, C. S. 2004. Effect of Seedborne Potato virus Y on Performance of Russet Burbank, Russet Norkotah, and Shepody Potato. Plant Disease, 88, 3: 248–252
- Olmedo, G., Guo, H., Gregory, B. D., Nourizadeh, S. D., Aguilar-henonin, L., Li, H., An, F., Guzman, P., Ecker, J. R. 2006. Exoribonuclease required for regulation of the EIN3-targeting F-box proteins EBF1/2. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 103, 36: 13286-13293
- Oufir, M., Legay, S., Nicot, N., Van Moer, K., Hoffmann, L., Renaut, J., Hausman, J.-F., Evers, D. 2008. Gene expression in potato during cold exposure: Changes in carbohydrate and polyamine metabolisms. Plant Science, 175: 839-852
- Pacheco, R., García-Marcos, A., Manzano, A., de Lacoba, M. G., Camañes, G., García-Agustín, P., Díaz-Ruíz, J. R., Tenllado, F. 2012. Comparative analysis of transcriptomic and hormonal responses to compatible and incompatible plant-virus interactions that lead to cell death. Molecular Plant-Microbe Interactions : MPMI, 25, 5: 709–723
- Pajerowska-Mukhtar, K. M., Emerine, D. K., Mukhtar, M. S. 2013. Tell me more: roles of NPRs in plant immunity. Trends in Plant Science, 18, 7: 402–11
- Pallas, V., García, J. A. 2011. How do plant viruses induce disease? Interactions and interference with host components. The Journal of General Virology, 92, 12: 2691– 2705
- Pandey, S. P., Somssich, I. E. 2009. The role of WRKY transcription factors in plant immunity. Plant Physiology, 150, 4: 1648–1655

- Petek, M., Rotter, A., Kogovšek, P., Baebler, S., Mithöfer, A., Gruden, K. 2014. Potato virus Y infection hinders potato defence response and renders plants more vulnerable to Colorado potato beetle attack. Molecular Ecology, 23, 21: 5378–5391
- Pettersson, G., Ryde-Pettersson, U. 1988. A mathematical model of the Calvin photosynthesis cycle. European Journal of Biochemistry/FEBS, 175, 3: 661–672
- Pieterse, C. M. J., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S., Van Wees, S. C. M. 2009. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. Nature Chemical Biology, 5, 5: 308–316
- Pieterse, C. M. J., Ton, J., Loon, L. C. Van. 2001. Cross-talk between plant defence signalling pathways : boost or burden?, AgBiotechNet, 3: 1–8
- Pieterse, C. M. J., Van der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A., Van Wees, S. C. M. 2012. Hormonal modulation of plant immunity. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 28: 489–521
- Pitzschke, A., Schikora, A., Hirt, H. 2009. MAPK cascade signalling networks in plant defence. Current Opinion in Plant Biology, 12, 4: 421–426
- Pompe-Novak, M., Gruden, K., Baebler, Š., Krečič-Stres, H., Kovač, M., Jongsma, M., Ravnikar, M. 2005. Potato virus Y induced changes in the gene expression of potato (*Solanum tuberosum* L.). Physiological and Molecular Plant Pathology, 67, 3-5: 237–247
- Pompe-Novak, M., Wirschner, M., Ravnikar, M. 2001. Ultrastructure of Chloroplasts in Leaves NTN of Potato Plants infected by Potato Virus Y. Phyton, 41, 2: 215–226
- Poolman, M. G., Olçer, H., Lloyd, J. C., Raines, C. A., Fell, D. A. 2001. Computer modelling and experimental evidence for two steady states in the photosynthetic Calvin cycle. European Journal of Biochemistry / FEBS, 268, 10: 2810–286
- Popescu, S. C., Popescu, G. V, Snyder, M., Dinesh-Kumar, S. P. 2009. Integrated analysis of co-expressed MAP kinase substrates in Arabidopsis thaliana. Plant Signaling in Behavior, 4, 6: 524–527
- Portis, A. R. in Parry, M. A. J. 2007. Discoveries in Rubisco (Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase): A historical perspective. Photosynthesis Research, 94, 1: 121–143
- Proost, S., Van Bel, M., Sterck, L., Billiau, K., Van Parys, T., Van de Peer, Y. in Vandepoele, K. 2009. PLAZA: a comparative genomics resource to study gene and genome evolution in plants. The Plant cell, 21, 12: 3718–3731
- Pumplin, N., Voinnet, O. 2013. RNA silencing suppression by plant pathogens: defence, counter-defence and counter-counter-defence. Nature Reviews. Microbiology, 11,

11:745-760

- Quenouille, J., Vassilakos, N., Moury, B. 2013. Potato virus Y : a major crop pathogen that has provided major insights into the evolution of viral pathogenicity. Molecular Plant Pathology, 14, 5: 439–452
- Ramšak, Ž., Baebler, Š., Rotter, A., Korbar, M., Mozetic, I., Usadel, B., Gruden, K. 2014. GoMapMan: integration, consolidation and visualization of plant gene annotations within the MapMan ontology. Nucleic Acids Research, 42: 1167–1175
- Rios-Estepa, R., Lange, B. M. 2007. Experimental and mathematical approaches to modeling plant metabolic networks. Phytochemistry, 68, 16-18: 2351–2374
- Rotter, A., Usadel, B., Baebler, S., Stitt, M., Gruden, K. 2007. Adaptation of the MapMan ontology to biotic stress responses: application in solanaceous species. Plant Methods, 3, 1, 10: doi:10.1186/1746-4811-3-10: 7 str.
- Sajnani, C., Zurita, J. L., Roncel, M., Ortega, J. M., Barón, M., Ducruet, J.-M. 2007. Changes in photosynthetic metabolism induced by tobamovirus infection in Nicotiana benthamiana studied in vivo by thermoluminescence. New Phytologist, 175, 1: 120–130
- Sasaki-Sekimoto, Y., Jikumaru, Y., Obayashi, T., Saito, H., Masuda, S., Kamiya, Y., Ohta, H., Shirasu, K. 2013. Basic helix-loop-helix transcription factors jasmonateassociated myc2-like1 (JAM1), JAM2, and JAM3 are negative regulators of jasmonate responses in Arabidopsis. Plant physiology,163: 291-304
- Sasaya, T., Nakazono-Nagaoka, E., Saika, H., Aoki, H., Hiraguri, A., Netsu, O., Uehara-Ichiki, T., Onuki, M., Toki, S., Saito, K., Yatou, O. 2014. Transgenic strategies to confer resistance against viruses in rice plants. Frontiers in Microbiology, 4, 409: doi:10.3389/fmicb.2013.00409: 11 str.
- Sayers, E. W., Barrett, T., Benson, D. A., Bolton, E., Bryant, S. H., Canese, K., Chetvernin, V., Church, D. M., DiCuccio, M., Federhen, S., Feolo, M., Fingerman, I. M., Geer, L. Y., Helmberg, W., Kapustin, Y., Landsman, D., Lipman, D. J., Lu, Z., Madden, T. L., Madej, T., Maglott, D. R., Marchler-Bauer, A., Miller, V., Mizrachi, I., Ostell, J., Panchenko, A., Phan, L., Pruitt, K. D., Schuler, G. D., Sequeira, E., Sherry, S. T., Shumway, M., Sirotkin, K., Slotta, D., Souvorov, A., Starchenko, G., Tatusova, T. A., Wagner, L., Wang, Y., Wilbur, W. J., Yaschenko, E., Ye, J. 2011. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. Acids Research, 39, Nucleic Database issue, D38–51. doi:10.1093/nar/gkq1172:14 str.
- Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W., Brown, P. O. 1995. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. Science, 270, 5235: 467–470

- Scholthof, K.-B. G., Adkins, S., Czosnek, H., Palukaitis, P., Jacquot, E., Hohn, T., Hohn,
 B., Saunders, K., Candresse, T., Ahlquist, P., Hemenway, C., Foster, G. D. 2011.
 Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. Molecular Plant Pathology, 12, 9: 938–954
- Schreiber, U. 2004. Pulse-Amplitude-Modulation (PAM) Fluorometry and Saturation
 Pulse Method: An Overview. V: Advances in Photosynthesis and Respiration.
 Papageorgiou G., Govindjee (ed.). Wurzburg. Springer Netherlands 19: 279–319
- Schweighofer, A., Hirt, H. in Meskiene, I. 2004. Plant PP2C phosphatases: emerging functions in stress signaling. Trends in Plant Science, 9, 5: 236–43
- Schweighofer, A., Kazanaviciute, V., Scheikl, E., Teige, M., Doczi, R., Hirt, H., Schwanninger, M., Kant, M., Schuurink, R., Mauch, F., Buchala, A., Cardinale, F. in Meskiene, I. 2007. The PP2C-type phosphatase AP2C1, which negatively regulates MPK4 and MPK6, modulates innate immunity, jasmonic acid, and ethylene levels in Arabidopsis. The Plant cell, 19, 7: 2213–2224
- Schwessinger, B., Ronald, P. C. 2012. Plant Innate Immunity: Perception of Conserved Microbial Signatures. Annual Review of Plant Biology, 63: 451–482
- Seo, J.-K., Kwon, S.-J., Cho, W. K., Choi, H.-S. in Kim, K.-H. 2014. Type 2C protein phosphatase is a key regulator of antiviral extreme resistance limiting virus spread. Scientific Reports, 4, 5905: doi: 10.1038/srep05905: 8 str.
- Serrano, M., Wang, B., Aryal, B., Garcion, C., Abou-Mansour, E., Heck, S., Geisler, M., Mauch, F., Nawrath, C., Metraux, 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
- Seyfferth, C., Tsuda, K. 2014. Salicylic acid signal transduction: the initiation of biosynthesis, perception and transcriptional reprogramming. Frontiers in Plant Science, 5: doi:10.3389/fpls.2014.00697: 10 str.
- Shah, J. 2003. The salicylic acid loop in plant defense. Current Opinion in Plant Biology, 6, 4: 365–371
- Shalitin, D. 2000. Cucumber Mosaic Virus Infection Affects Sugar Transport in Melon Plants. Plant physiology, 123, 2: 597–604
- Shamsul, A. A. H., Alyemeni, M. N. 2013. Salycilic acid: Plant Growth and Development. Springer Science in Business Media: 389 str.
- Shang, J., Xi, D.-H., Xu, F., Wang, S.-D., Cao, S., Xu, M.-Y., Zhao, P.-P., Wang, J.-H., Jia, S.-D., Zhang, Z.-W., Yuan, S., Lin, H.-H. 2011. A broad-spectrum, efficient and nontransgenic approach to control plant viruses by application of salicylic acid and jasmonic acid. Planta, 233, 2: 299–308
- Sheard, L. B., Tan, X., Mao, H., Withers, J., Ben-Nissan, G., Hinds, T. R., Kobayashi,

Y., Hsu, F.-F., Sharon, M., Browse, J., He, S. Y., Rizo, J., Howe, G. A., Zheng, N. 2010. Jasmonate perception by inositol-phosphate-potentiated COI1-JAZ correceptor. Nature, 468, 7322: 400–405

- Singh, A., Pandey, A., Srivastava, A. K., Tran, L.-S. P. in Pandey, G. K. 2015. Plant protein phosphatases 2C: from genomic diversity to functional multiplicity and importance in stress management. Critical Reviews in Biotechnology, 8551: 1–13
- Singh, D. P., Moore, C. A., Gilliland, A., Carr, J. P. 2004. Activation of multiple antiviral defence mechanisms by salicylic acid. Molecular Plant Pathology, 5, 1: 57–63
- Singh, R. P., Valkonen, J. P. T., Gray, S. M., Boonham, N., Jones, R. A. C., Kerlan, C., Schubert, J. 2008. Discussion paper: The naming of Potato virus Y strains infecting potato. Archives of Virology, 153, 1: 1–13
- Smyth, G. K. 2004. Linear models and empirical Bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. V: Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology, Vol. 3. Stumpf M. P. H. (ur.). Berlin, De Gruyter: 1–26
- Smyth, G. K., Michaud, J., Scott, H. S. 2005. Use of within-array replicate spots for assessing differential expression in microarray experiments. Bioinformatics, 21, 9: 2067–2075
- Stare, T., Ramšak, Ž., Blejec, A., Stare, K., Turnšek, N., Weckwerth, W., Wienkoop, S., Vodnik, D., Gruden, K. 2015. Bimodal dynamics of primary metabolism-related responses in tolerant potato-Potato virus Y interaction. BMC Genomics, 16, 1, 716. doi:10.1186/s12864-015-1925-2: 17 str.
- Staswick, P. E. 2008. JAZing up jasmonate signaling. Trends in Plant Science, 13, 2: 66– 71
- Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V. K., Mukherjee, S., Ebert, B. L., Gillette, M. A., Paulovich, A., Pomeroy, S. L., Golub, T. R., Lander, E. S., Mesirov, J. P. 2005.
 Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 102, 43: 15545–15550
- Sugimoto, H., Kondo, S., Tanaka, T., Imamura, C., Muramoto, N., Hattori, E., Ogawa, K., Mitsukawa, N. in Ohto, C. 2014. Overexpression of a novel Arabidopsis PP2C isoform, AtPP2CF1, enhances plant biomass production by increasing inflorescence stem growth. Journal of experimental botany, 65, 18: 5385–5400
- Sun, X., Li, Y., Shi, M., Zhang, N., Wu, G., Li, T., Qing, L. in Zhou, C. 2013. In vitro binding and bimolecular fluorescence complementation assays suggest an interaction between tomato mosaic virus coat protein and tobacco chloroplast ferredoxin I. Archives of virology, 158, 12: 2611–2615
- Synková, H., Semorádová, Š., Schnablová, R., Müller, K., Pospíšilová, J., Ryšlavá, H., Malbeck, J. in Čeřovská, N. 2006. Effects of biotic stress caused by Potato virus Y

on photosynthesis in ipt transgenic and control Nicotiana tabacum L. Plant Science, 171, 5: 607–616

- The Potato Genome Sequencing Consortium. 2011. Genome Sequence and Analysis of the Tuber Crop Potato. Nature, 475, 7355: 189–195
- The Tomato Genome Consortium. 2012. The Tomato Genome Sequence Provides Insights into Fleshy Fruit Evolution. Nature, 485, 7400: 635–641
- The UniProt Consortium. 2014. UniProt: a hub for protein information. Nucleic Acids Research, 43, D1: 204–212
- Thimm, O., Bläsing, O., Gibon, Y., Nagel, A., Meyer, S., Krüger, P., Selbig, J., Müller, L. A., Rhee, S. Y., Stitt, M. 2004. MAPMAN: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology, 37, 6: 914–939
- Tian, S., Mao, X., Zhang, H., Chen, S., Zhai, C., Yang, S., Jing, R. 2013. Cloning and characterization of TaSnRK2.3, a novel SnRK2 gene in common wheat. Journal of Experimental Botany, 64, 7: 2063–2080
- Tu, Y., Jin, Y., Ma, D., Li, H., Zhang, Z., Dong, J., Wang, T. 2015. Interaction between PVY HC-Pro and the NtCF1β-subunit reduces the amount of chloroplast ATP synthase in virus-infected tobacco. Scientific Reports, 5: doi:10.1038/srep15605: 14 str.
- Twycross, J., Band, L. R., Bennett, M. J., King, J. R., Krasnogor, N. 2010. Stochastic and deterministic multiscale models for systems biology: an auxin-transport case study. BMC Systems Biology, 4, 34: doi:10.1186/1752-0509-4-34: 11 str.
- Usadel, B., Nagel, A., Steinhauser, D., Gibon, Y., Bläsing, O. E., Redestig, H., Sreenivasulu, N., Krall, L., Hannah, M. A., Poree, F., Fernie, A. R., Stitt, M. 2006. PageMan: an interactive ontology tool to generate, display, and annotate overview graphs for profiling experiments. BMC Bioinformatics, 7, 1: 535. doi:10.1186/1471-2105-7-535: 11 str.
- Vlot, A. C., Dempsey, D. A., Klessig, D. F. 2009. Salicylic Acid, a multifaceted hormone to combat disease. Annual Review of Phytopathology, 47: 177–206
- Vogel, C. in Marcotte, E. M. 2012. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. Nature reviews. Genetics, 13, 4: 227–232
- Vos, I. A., Moritz, L., Pieterse, C. M. J., Van Wees, S. C. M. 2015. Impact of hormonal crosstalk on plant resistance and fitness under multi-attacker conditions. Frontiers in Plant Science, 6, 639: doi:10.3389/fpls.2015.00639: 13 str.
- Vos, I. A., Pieterse, C. M. J. in van Wees, S. C. M. 2013. Costs and benefits of hormoneregulated plant defences. Plant Pathology, 62: 43–55

- Vuorinen, A. L., Kelloniemi, J. in Valkonen, J. P. T. 2011. Why do viruses need phloem for systemic invasion of plants? Plant science: an international journal of experimental plant biology, 181, 4: 355–363
- Wang, K., Li, H. 2002. Ethylene biosynthesis and signaling networks. The Plant Cell, 14: 131–152
- Wasternack, C., Hause, B. 2013. Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. Annals of Botany, 111: 1021–1058
- Windram, O., Denby, K. J. 2015. Modelling signaling networks underlying plant defence. Current Opinion in Plant Biology, 27: 165–171
- Wu, Y., Zhang, D., Chu, J. Y., Boyle, P., Wang, Y., Brindle, I. D., De Luca, V., Després,
 C. 2012. The Arabidopsis NPR1 Protein Is a Receptor for the Plant Defense Hormone Salicylic Acid. Cell Reports, 1, 6: 639–647
- Xu, X., Pan, S., Cheng, S., Zhang, B., Mu, D., Ni, P., Zhang, G., Yang, S., Li, R., Wang, J., Orjeda, G., Guzman, F., Torres, M., Lozano, R., Ponce, O., Martinez, D., De la Cruz, G., Chakrabarti, S. K., Patil, V. U., Skryabin, K. G., Kuznetsov, B. B., Ravin, N. V, Kolganova, T. V, Beletsky, A. V, Mardanov, A. V, Di Genova, A., Bolser, D. M., Martin, D. M. A., Li, G., Yang, Y., Kuang, H., Hu, Q., Xiong, X., Bishop, G. J., Sagredo, B., Mejía, N., Zagorski, W., Gromadka, R., Gawor, J., Szczesny, P., Huang, S., Zhang, Z., Liang, C., He, J., Li, Y., He, Y., Xu, J., Zhang, Y., Xie, B., Du, Y., Qu, D., Bonierbale, M., Ghislain, M., Herrera, M. del R., Giuliano, G., Pietrella, M., Perrotta, G., Facella, P., O'Brien, K., Feingold, S. E., Barreiro, L. E., Massa, G. A., Diambra, L., Whitty, B. R., Vaillancourt, B., Lin, H., Massa, A. N., Geoffroy, M., Lundback, S., DellaPenna, D., Buell, C. R., Sharma, S. K., Marshall, D. F., Waugh, R., Bryan, G. J., Destefanis, M., Nagy, I., Milbourne, D., Thomson, S. J., Fiers, M., Jacobs, J. M. E., Nielsen, K. L., Sønderkær, M., Iovene, M., Torres, G. A., Jiang, J., Veilleux, R. E., Bachem, C. W. B., de Boer, J., Borm, T., Kloosterman, B., van Eck, H., Datema, E., Hekkert, B. te L., Goverse, A., van Ham, R. C. H. J., in Visser, R. G. F. 2011. Genome sequence and analysis of the tuber crop potato. Nature, 475, 7355: 189-95
- Yan, J., Zhang, C., Gu, M., Bai, Z., Zhang, W., Qi, T., Cheng, Z., Peng, W., Luo, H., Nan, F., Wang, Z., Xie, D. 2009. The Arabidopsis coronatine insensitive1 protein is a jasmonate receptor. The Plant Cell, 21, 8: 2220–2236
- Yang, C., Guo, R., Jie, F., Nettleton, D., Peng, J., Carr, T., Yeakley, J. M., Fan, J.-B., Whitham, S. a. 2007. Spatial analysis of arabidopsis thaliana gene expression in response to Turnip mosaic virus infection. Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI, 20, 4: 358–270

Yonekura-Sakakibara, K., Fukushima, A. in Saito, K. 2012. Transcriptome data modeling

for targeted plant metabolic engineering. Current opinion in biotechnology, 24, 2: 285–290

- Zhang, J., Madden, T. L. 1997. PowerBLAST: a new network BLAST application for interactive or automated sequence analysis and annotation. Genome Research, 7, 6: 649–656
- Zhang, P. 2005. MetaCyc and AraCyc. Metabolic Pathway Databases for Plant Research. Plant physiology, 138, 1: 27–37
- Zhao, J., Liu, Q., Zhang, H., Jia, Q., Hong, Y. in Liu, Y. 2013. The rubisco small subunit is involved in tobamovirus movement and Tm-2²-mediated extreme resistance. Plant physiology, 161, 1: 374–83
- Zheng, S.-J., van Dijk, J. P., Bruinsma, M. in Dicke, M. 2007. Sensitivity and speed of induced defense of cabbage (Brassica oleracea L.): dynamics of BoLOX expression patterns during insect and pathogen attack. Molecular Plant-Microbe Interactions : MPMI, 20, 11: 1332–1345
- Zhu, M., Dai, S., Zhu, N., Booy, A., Simons, B., Yi, S. in Chen, S. 2012. Methyl jasmonate responsive proteins in Brassica napus guard cells revealed by iTRAQ-based quantitative proteomics. Journal of Proteome Research, 11, 7: 3728–3742
- Zvereva, A., Pooggin, M. 2012. Silencing and Innate Immunity in Plant Defense Against Viral and Non-Viral Pathogens. Viruses, 4, 12: 2578–2597

ZAHVALA

Na začetku bi se rada zahvalila mentorici prof. dr. Kristini Gruden, ki me je vodila in usmerjala na tej raziskovalni poti. Tvoja predanost znanosti, obširno znanje, večni raziskovalni optimizem ter številne ideje so me pred vsakim izzivom porinili še korak dlje. Hvala za zaupanje, ki si mi ga izkazala, ko si mi dopuščala raziskovalno svobodo ter za vso motivacijo, potrpežljivostjo in razumevanjem ob mojih spodrsljajih. Takega mentorja, ki ni le "boss" ampak "leader", si vsak lahko le želi!

Zahvala gre tudi članom komisije prof. dr. Borut Bohancu, prof. dr. Jerneju Jakšetu ter prof. dr. Vladimirju Megliču za pregled doktorske naloge, za veliko odzivnost ter sodelovanje, tudi ko so bili človeški patogeni na pohodu.

Popotovanje do razumevanja dinamike rastlinskega imunskega odziva skozi pogled sistemske biologije je pristop, ki je lahko uspešen le ob številnih uspešnih interdisciplinarnih povezavah. Zato bi se rada posebej zahvalila vsem, ki ste bili del tega konglomerata raziskav ter idej.

Pionirski koraki izgradnje modela so bili v začetni fazi močno prepleteni s koraki "informatikov" z oddelka za tehnologije znanj na Inštitutu Jožef Štefan; dr. Dragana Miljkovič, dr. Vid Podpečan, prof. dr. Igor Mozetič ter prof. dr. Nada Lavrač, hvala za temeljite diskusije, drugačen pogled in vse plodne sodelave.

Hvala tudi prof. dr. Dominiku Vodniku ter dr. Jožetu Hladniku z Oddelka za agronomijo, Biotehniške fakultete, za sodelovanje pri meritvah fotosintetske aktivnosti in plodne diskusije rezultatov.

Zahvala gre tudi dr. Stefanie Wienkoop in prof. dr. Wolframu Weckwerthu na Dunaj z oddelka za Molekularno sistemsko biologijo, fakultete za življenjske vede.

Hvala tudi sodelavcem z oddelka. Lidiji hvala, da skrbi za potovanje naših rastlin od tkivih kultur do zemlje. Katji, Neži in Tini hvala za pomoč pri analizah izražanja genov. Živi hvala za obdelave podatkov in za vsa navodila na poti k zagovoru. Andreju hvala za vse statistične analize. Anni, Ani, Klavdiji ter Tjaši hvala, da ste mene (in moje gene) sprejele v klub kloniranja in funkcijske genomike. Markotu hvala za vse diskusije. Vsem sodelavcem z Oddelka za biotehnologijo in sistemsko biologijo na Nacionalnem inštitutu za biologijo hvala, da mi polepšate jutro ob misli, da grem na delo med prijetne, zabavne in prijateljske ljudi. Tekom let se vas je zvrstilo kar nekaj, ki niste le sodelavci ampak dobri prijatelji. Ne najdem besed, ki bi povedale kako hvaležna sem za to. Upam, da sami veste koliko mi pomenite!

Posebna zahvala gre tudi vsem mojim bližnjim, družini in prijateljem za vzpodbudo, pomoč ter za to, da ste vedno na moji strani. Hvala mami, ker si mi omogočila to pot znanja že od malih nog in mi še zmeraj nesebično priskočiš na pomoč. Hvala tebi Jan, da si mi stal ob strani, me vzpodbujal in poslušal ter prevzel moje obveznosti, ko je bil meni dan prekratek. Na koncu hvala tudi mojima puncama, ki me vsak dan znova spomnita, da je cel svet eno veliko raziskovanje.

PRILOGE

Priloga A: Povzetek vseh reakcij v manualno izgrajenem modelu.

Reakcije so grupirane v štiri skupine, reakcije, ki so del signalizacijske poti SA, JA, ET ter povezovalne reakcije. Reakcije v prvem stolpcu so predstavljene v obliki (reaktant1 + reaktant2 reakcija produkt). Biološke komponente so predstavljene na nivoju družin. V drugem stolpcu so reakcije pretvorjene v obliko usmerjenega grafa z naslednjo strukturo (reaktant, produkt, reakcija-z okrajšavo). A –aktivacija, I-inhibicija, B-vezava. Reakcije so predstavljene na nivoju razširjenega omrežja. V zadnji koloni je pripisan izvor podatkov.

Appendix A: The summary of reactions in the manual model.

Reactions are grouped in four groups: SA signaling, JA signaling, ET and crosstalk. In the first column reactions of manual models are represented in the form of (reactant1 + reactant2 reaction product). The biological components are represented on the level of the family nodes. In the second column the interaction between the two biological components is converted in the format of the edge-labelled graph with the following structure: (reactant, product, reaction abbreviation). A-activation, I-Inhibition, B-biding. Relations after decomposition of the family nodes are shown. In the last column the source of information, related to the particular interaction, is specified.

Manualno izgrajen model	Razširjeno model	Izvor podatkov
Signalizacijska pot SA		
metabolite_Orto-coumaric_acid + protein_X1 activates metabolite_SA	metabolite_Orto-coumaric_acid metabolite_SA A; protein_X1 metabolite_SA A	KEGG
protein_AAO4 + metabolite_Trans- cinnamic_acid activates	protein_AAO4 metabolite_BA A; protein_AAO4 metabolite_Orto- coumaric_acid A; metabolite_Trans-cinnamic_acid metabolite_BA	
metabolite_BA + metabolite_Orto- coumaric_acid	A; metabolite_Trans-cinnamic_acid metabolite_Orto-coumaric_acid A	KEGG
protein_UGP_glikosyltransferaze +		
metabolite_SGE activates	protein_UGP_glikosyltransferaze metabolite_SGE A; metabolite_SA metabolite_SGE A	PMID: 18267075
protein_BA2H + metabolite_BA activates metabolite_SA	metabolite_BA metabolite_SA A; protein_BA2H metabolite_SA A	PMID: 12231938
protein_UGP_glikosyltransferaze +		
metabolite_SA activates	metabolite_SA metabolite_SAG A; protein_UGP_glikosyltransferaze	
metabolite_SAG	metabolite_SAG A	PMID: 18267075
protein_EDS5 + gene_ICS activates		
protein_ICS	protein_EDS5 protein_ICS1 A; protein_EDS5 protein_ICS2 A	PMID: 12873532
complex_NPR1_TGA245 +	complex_NPR1_TGA245 protein_PR1 A; complex_NPR1_TGA245	
gene_PR125 activates protein_PR125	protein_PR2 A; complex_NPR1_TGA245 protein_PR5 A	PMID: 12873532
protein_NPR1 + gene_WRKY70		
activates protein_WRKY70	protein_NPR1 protein_WRKY70 A	PMID: 14742872
	protein_NPR1 complex_NPR1_TGA245 P; protein_NIMIN1 complex_NPR1_TGA245 P; protein_NIMIN2	
	complex_NPR1_TGA245 P; protein_NIMIN3	
	complex_NPR1_TGA245 P; protein_TGA_TF2	
	complex_NPR1_TGA245 P; protein_TGA_TF4	
protein_NPR1 + protein_NIMIN +	complex_NPR1_TGA245 P; protein_TGA_TF5	PMID:
protein_TGA_TF245 binds	complex_NPR1_TGA245 P; protein_NPR1 protein_NIMIN1 B;	15749762,
complex NPR1 TGA245	protein NPR1 protein TGA TF2 B; protein NIMIN1	PMID: 12873532

Manualno izgrajen model	Razširjeno model	Izvor podatkov
	protein_TGA_TF2 B; protein_NPR1 protein_TGA_TF4 B;	
	protein_NIMIN1 protein_TGA_TF4 B; protein_NPR1	
	protein_TGA_TF5 B; protein_NIMIN1 protein_TGA_TF5 B;	
	protein_NPR1 protein_NIMIN2 B; protein_NIMIN2	
	protein_TGA_TF2 B; protein_NIMIN2 protein_TGA_TF4 B;	
	protein_NIMIN2 protein_TGA_TF5 B; protein_NPR1	
protein NPR1 + protein NIMIN +	protein NIMIN3 B; protein NIMIN3 protein TGA TF2 B;	PMID:
protein TGA TF245 binds	protein NIMIN3 protein TGA TF4 B; protein NIMIN3	15749762,
omplex NPR1 TGA245	protein TGA TF5 B	PMID: 12873532
protein $X3 +$ metabolite SA chl		
activates metabolite_SA	protein_X3 metabolite_SA A; metabolite_SA_chl metabolite_SA A	PMID: 18267075
	metabolite_Phenylalanine metabolite_Trans-cinnamic_acid A;	
netabolite_Phenylalanine +	protein_PAL1 metabolite_Trans-cinnamic_acid A; protein_PAL2	
orotein_PAL activates	metabolite_Trans-cinnamic_acid A; protein_PAL3 metabolite_Trans-	
netabolite_Trans-cinnamic_acid	cinnamic_acid A; protein_PAL4 metabolite_Trans-cinnamic_acid A	KEGG
	protein_ICS1 metabolite_Isochorismate A;protein_ICS2	
protein_ICS + metabolite_Chorismate	metabolite_Isochorismate A; metabolite_Chorismate	
ctivates metabolite_Isochorismate	metabolite_Isochorismate A	PMID: 12873532
rotein_Prephenate_aminotransferase		
metabolite_Prephenate activates	metabolite_Prephenate metabolite_Phenylpyruvate A;	
netabolite_Phenylpyruvate	protein_Prephenate_aminotransferase metabolite_Phenylpyruvate A	KEGG
netabolite_Isochorismate +		
orotein_IPL activates	metabolite_Isochorismate metabolite_SA_chl A; protein_IPL	
netabolite_SA_chl	metabolite_SA_chl A	PMID: 12873532
	protein NADPH oxidase metabolite ROS A; protein Catalase	
rotein_ROS_productive_enzymes	metabolite_ROS A; protein_Glutathione_peroxidase metabolite_ROS	
ctivates metabolite ROS	A; protein Superoxide dismutase metabolite ROS A	PMID: 8612756
rotein_Inactive_BA2H +		
netabolite_ROS activates	metabolite_ROS protein_BA2H A; protein_Inactive_BA2H	
protein_BA2H	protein_BA2H A	PMID:12060237
	protein_CM1 metabolite_Prephenate A; protein_CM2	
protein_CM + metabolite_Chorismate	metabolite_Prephenate A; protein_CM3 metabolite_Prephenate A;	
ctivates metabolite_Prephenate	metabolite_Chorismate metabolite_Prephenate A	KEGG
rotein_Arogenate_dehydratase +		
netabolite_Phenylpyruvate activates	protein_Arogenate_dehydratase metabolite_Phenylalanine A;	
netabolite_Phenylalanine	metabolite_Phenylpyruvate metabolite_Phenylalanine A	KEGG
		PMID:
rotein_PAD34 + protein_EDS1 +	protein_PAD4 protein_EDS5 A; protein_PAD3 protein_EDS5 A;	12873532,
ene_EDS5 activates protein_EDS5	protein_EDS1 protein_EDS5 A	PMID: 15546349
protein_Inactive_MPK3 +		PMID:
rotein_HRT + metabolite ROS	protein_HRT protein_MPK3 A;metabolite ROS protein MPK3 A;	11875555,
ctivates protein_MPK3	protein_Inactive_MPK3 protein_MPK3 A	PMID: 21046144
rotein_Inactive_MPK6 +		PMID:
orotein_HRT + metabolite ROS	protein_Inactive_MPK6 protein MPK6 A; protein HRT	15020743,
	protein MPK6 A: metabolite ROS protein MPK6 A	PMID: 21046144

Manualno izgrajen model	Razširjeno model	Izvor podatkov	
protein_MPK3 + protein_MPK6 + gene_EDS1 activates protein_EDS1 protein_NPR1 inhibits protein_EDS1	protein_MPK3 protein_EDS1 A; protein_MPK6 protein_EDS1 A protein_NPR1 protein_EDS1 I	PMID: 18705666 PMID: 12873532	
protein_MPK3 + protein_MPK6 + gene_PAD34 activates protein_PAD34	protein_MPK3 protein_PAD4 A; protein_MPK3 protein_PAD3 A; protein_MPK6 protein_PAD4 A; protein_MPK6 protein_PAD3 A	PMID: 18378893	
protein_NPR1 inhibits protein_PAD34 complex_NPR1_oligomer +	protein_NPR1 protein_PAD4 I; protein_NPR1 protein_PAD3 I	PMID: 12873532	
metabolite_SA activates protein_NPR1	metabolite_SA protein_NPR1 A; complex_NPR1_oligomer protein_NPR1 A	PMID: 18635760, PMID: 12837250	
protein HRT Signalizaciiska pot jacmonska kislina	protein Inactive HRT protein HRT A	PMID: 15546349	
protein_X4 + gene_MYC2 activates protein_MYC2	protein_X4 protein_MYC2 A protein_MPK4 protein_LOX5 A; protein_MPK4 protein_LOX4	Added to make the transcription of Myc gene constant (exact activator is to our knowledge unknown)	
protein_MPK4 activates protein_LOX3	A; protein_MPK4 protein_LOX6 A; protein_MPK4 protein_LOX1 A; protein_MPK4 protein_LOX2 A; protein_MPK4 protein_LOX3 A	PMID:20037473	
protein_MYC2 + gene_THI2.1JR1VSP1CLH1 activates protein_THI2.1JR1VSP1CLH1	protein_MYC2 protein_JR1 A; protein_MYC2 protein_VSP1 A; protein_MYC2 protein_CLH1 A; protein_MYC2 protein_THI2.1 A	PMID: 17616737, Devoto A, Turner JG (2005) Jasmonate-regulated Arabidopsis stress signalling network. Physiologia Plantarum 123(2): 161-172	
protein_JAZ inhibits protein THI2.1JR1VSP1CLH1	protein_JAZ5 protein_JR1 I; protein_JAZ5 protein_VSP1 I; protein_JAZ5 protein_CLH1 I; protein_JAZ5 protein_TH12.1 I; protein_JAZ1 protein_JR1 I; protein_JAZ1 protein_VSP1 I; protein_JAZ1 protein_CLH1 I; protein_JAZ1 protein_TH12.1 I; protein_JAZ8 protein_JR1 I; protein_JAZ8 protein_VSP1 I; protein_JAZ8 protein_CLH1 I; protein_JAZ8 protein_TH12.1 I; protein_JAZ8 protein_CLH1 I; protein_JAZ8 protein_TH12.1 I;	Devoto A, Turner JG (2005) Jasmonate-regulated Arabidopsis stress signalling network. Physiologia Plantarum 123(2): 161-172	

Manualno izgrajen model	Razširjeno model	Izvor podatkov
Manualno izgrajen model	Razširjeno modelprotein_JAZ4protein_CLH1I;protein_JAZ4protein_CLH1I;protein_JAZ9protein_JR1I;protein_JAZ9protein_CLH1I;protein_JAZ6protein_CLH1I;protein_JAZ6protein_CLH1I;protein_JAZ6protein_CLH1I;protein_JAZ6protein_CLH1I;protein_JAZ6protein_CLH1I;protein_JAZ6protein_CLH1I;protein_JAZ2protein_CLH1I;protein_JAZ2protein_VSP1I;protein_JAZ2protein_CLH1I;protein_JAZ2protein_VSP1I;protein_JAZ7protein_CLH1I;protein_JAZ7protein_VSP1I;protein_JAZ7protein_CLH1I;protein_JAZ7protein_VSP1I;protein_JAZ7protein_CLH1I;protein_JAZ7protein_VSP1I;protein_JAZ7protein_CLH1I;protein_JAZ7protein_VSP1I;protein_JAZ11protein_CLH1I;protein_JAZ11protein_VSP1I;protein_JAZ10protein_CLH1I;protein_JAZ10protein_VSP1I;protein_JAZ10protein_CLH1I;protein_JAZ10protein_VSP1I;protein_JAZ10protein_CLH1I;protein_JAZ10protein_VSP1I;protein_JAZ10protein_CLH1I;protein_JAZ10protein_VSP1I;protein_JAZ10protein_CLH1I;protein_JAZ10protein_VSP1I;protein_JAZ10protein_	Izvor podatkov Devoto A, Turner JG (2005) Jasmonate- regulated Arabidopsis stress signalling
protein_JAZ inhibits protein_THI2.1JR1VSP1CLH1	protein_JAZ12 protein_CLH1 I; protein_JAZ12 protein_THI2.1 I; protein_JAZ3 protein_JR1 I; protein_JAZ3 protein_VSP1 I; protein_JAZ3 protein_CLH1 I; protein_JAZ3 protein_THI2.1 I	network. Physiologia Plantarum 123(2): 161-172
metabolite_OPDA_chl activates metabolite_OPDA	metabolite_OPDA_chl metabolite_OPDA A	Zhang H, Memelink J (2009) Regulation of Secondary Metabolism by Jasmonate Hormones. Plant-derived Natural Products, pp.181-194
protein_LOX + metabolite_Linolenic_acid activates metabolite_13-HPT	protein_LOX5 metabolite_13-HPT A; protein_LOX4 metabolite_13- HPT A; protein_LOX6 metabolite_13-HPT A; protein_LOX1 metabolite_13-HPT A; protein_LOX2 metabolite_13-HPT A; protein_LOX3 metabolite_13-HPT A; metabolite_Linolenic_acid metabolite_13-HPT A	KEGG, PMID:18583180, AraCyc database
protein_OPR3 + metabolite_OPDA activates metabolite_OPC8	protein_OPR3 metabolite_OPC8 A; metabolite_OPDA metabolite_OPC8 A	KEGG, AraCyc database, Zhang H, Memelink J (2009) Regulation of Secondary Metabolism by Jasmonate Hormones. Plant-derived Natural Products, pp.181-194
protein_AOC + metabolite_12/13_EDT activates metabolite_OPDA_chl	protein_AOC1 metabolite_OPDA_chl A; protein_AOC2 metabolite_OPDA_chl A; protein_AOC3 metabolite_OPDA_chl A; protein_AOC4 metabolite_OPDA_chl A; metabolite_12/13_EDT metabolite_OPDA_chl A	KEGG, AraCyc database, PMID19025383

Manualna izgraian model	Pozěiriono model	Izvor podatkov
	ratain X2 protain 1475 A: protain X2 protain 1471 A:	
	protein_X2 protein_JAZ5 A; protein_X2 protein_JAZ1 A;	
	protein_X2 protein_JAZ8 A, protein_X2 protein_JAZ4 A,	
	protein_X2 protein_JAZ9 A; protein_X2 protein_JAZ6 A;	
	protein_X2 protein_JAZ2 A; protein_X2 protein_JAZ/ A;	
protein_X2 + gene_JAZ activates	protein_X2 protein_JAZ11 A; protein_X2 protein_JAZ10 A;	
protein_JAZ	protein_X2 protein_JAZ12 A; protein_X2 protein_JAZ3 A	PMID:21963667
		PMID: 18261950,
		PMID: 18583180,
		Zhang H, Memelink
		J (2009) Regulation
		of Secondary
		Metabolism by
		Jasmonate
	complex_SCF complex_JA-Ile_COI1_SCF P; protein_COI1	Hormones. Plant-
complex_SCF + metabolite_JA-Ile +	complex_JA-Ile_COI1_SCF P; metabolite_JA-Ile complex_JA-	derived Natural
protein_COI1 binds complex_JA-	Ile_COI1_SCF P; complex_SCF protein_COI1 B; complex_SCF	Products, pp.181-
Ile_COI1_SCF	metabolite_JA-Ile B; protein_COI1 metabolite_JA-Ile B	194
	protein_JAZ5 complex_JA-Ile_COI1_SCF_JAZ P; protein_JAZ1	
	complex_JA-Ile_COI1_SCF_JAZ P; protein_JAZ8 complex_JA-	
	Ile_COI1_SCF_JAZ P; protein_JAZ4 complex_JA-	
	Ile_COI1_SCF_JAZ P; protein_JAZ9 complex_JA-	
	Ile COI1 SCF JAZ P; protein JAZ6 complex JA-	
	Ile COI1 SCF JAZ P; protein JAZ2 complex JA-	
	Ile COI1 SCF JAZ P; protein JAZ7 complex JA-	
	Ile COI1 SCF JAZ P; protein JAZ11 complex JA-	
	Ile COI1 SCF JAZ P: protein JAZ10 complex JA-	
	Ile COI1 SCF JAZ P: protein JAZ12 complex JA-	
	Ile COII SCE JAZ P: protein JAZ3 complex JA-	PMID-18583180
	Ile COII SCF JAZ P complex JA-Ile COII SCF complex JA-	PMID:18261950
	Ile COLL SCF_JAZ P: protein_JAZ5 complex_JA-Ile COLL SCF	PMID: 18583180
	B: protein IA71 complex IA-Ile COI1 SCF B: protein IA78	Zhang H. Memelink
	complex IA Ile COIL SCE B: protein IA74 complex IA	L (2009) Regulation
	Ile COLL SCE B: protein IA70 complex IA Ile COLL SCE B:	of Secondary
	nc_con_scr b, protein_JAZ9 complex_JA-nc_con_scr b,	Matabalism by
	approxim_JAZO complex_JA-ne_CON_Set B, protein_JAZZ	Jasmonata
	La COLL SCE D: protein LA Z11 complex LA Lla COLL SCE D:	Jasmonae Dlant
protoin IAZ + complex IA	ne_con_ser B, protein_JAZI1 complex_JA-ne_con_ser B,	derived Natural
lla COLL SCE binds complex LA	approximity IA the COLL SCE D: metain IA 72 complex IA	Draduata pp 181
the_COLL_SCF_binds_complex_JA-	Complex_JA-ne_COT_SCF_B, protein_JAZS_complex_JA-	Products, pp.181-
IIE_COII_SCF_JAZ	IIE_COIL_SUF B	194
protein_JARI + metabolite_JA	protein_JAR1 metabolite_JA-lie A; metabolite_JA metabolite_JA-	WEGG
activates metabolite_JA-lie		KEGG
protein_AOS + metabolite_13-HPT	protein_AUS metabolite_12/13_EDT A; metabolite_13-HPT	VECC
activates metabolite_12/13_EDT	metadolite_12/13_ED1 A	KEGG
		KEGG, PMID:
protein_JMT + metabolite_JA	protein_JMT metabolite_Me-JA A; metabolite_JA metabolite_Me-	19025383, PMID:
activates metabolite_Me-JA	JA A	18583180
metabolite_OPC8 + protein_X5	metabolite_OPC8 metabolite_OPC-8:0-CoA A; protein_X5	VEGG
activates metabolite_OPC-8:0-CoA	metabolite_OPC-8:0-CoA A	KEGG

Manualno izgrajen model	Razširjeno model	Izvor podatkov
		Zhang H, Memelink
		J (2009) Regulation
	protein_MYC2 protein_JAZ5 A; protein_MYC2	of Secondary
	protein_JAZ1 A; protein_MYC2 protein_JAZ8 A;	Metabolism by
	protein_MYC2 protein_JAZ4 A; protein_MYC2	Jasmonate
	protein_JAZ9 A; protein_MYC2 protein_JAZ6 A;	Hormones. Plant-
	protein_MYC2 protein_JAZ2 A; protein_MYC2	derived Natural
	protein_JAZ7 A; protein_MYC2 protein_JAZ11 A;	Products, pp.181-
	protein_MYC2 protein_JAZ10 A; protein_MYC2	194, PMID:
protein_MYC2 + gene_JAZ activates protein_JAZ	protein_JAZ12 A; protein_MYC2 protein_JAZ3 A	21194534
	protein_OPCL1 metabolite_OPC6 A;	
	protein_ACX1 metabolite_OPC6 A;	KEGG, AraCyc
	protein_ACX3 metabolite_OPC6 A;	database, Zhang H,
	protein_ACX6 metabolite_OPC6 A;	Memelink J (2009)
	protein_ACX5 metabolite_OPC6 A;	Regulation of
	protein_ACX4 metabolite_OPC6 A;	Secondary
	protein_ACX2 metabolite_OPC6 A; protein_AIM1	Metabolism by
	metabolite_OPC6 A; protein_KAT2	Jasmonate
	metabolite_OPC6 A; protein_KAT5	Hormones. Plant-
	metabolite_OPC6 A; protein_KAT1	derived Natural
protein_OPCL1ACXAIM1KAT + metabolite_OPC-	metabolite_OPC6 A; metabolite_OPC-8:0-CoA	Products, pp.181-
8:0-CoA activates metabolite_OPC6	metabolite_OPC6 A	194
	protein_ACX1 metabolite_OPC4 A;	
	protein_ACX3 metabolite_OPC4 A;	
	protein_ACX6 metabolite_OPC4 A;	
	protein_ACX5 metabolite_OPC4 A;	
	protein_ACX4 metabolite_OPC4 A;	
	protein_ACX2 metabolite_OPC4 A; protein_AIM1	
	metabolite_OPC4 A; protein_KAT2	
	metabolite_OPC4 A; protein_KAT5	
	metabolite_OPC4 A; protein_KAT1	
protein_ACXAIM1KAT + metabolite_OPC6	metabolite_OPC4 A; metabolite_OPC6	
activates metabolite OPC4	metabolite OPC4 A	KEGG
_	metabolite_OPC4 metabolite_JA A;	
	protein_ACX1 metabolite_JA A; protein_ACX3	
	metabolite_JA A; protein_ACX6 metabolite_JA A;	
	protein ACX5 metabolite JA A; protein ACX4	
	metabolite JA A; protein ACX2 metabolite JA A;	
	protein AIM1 metabolite JA A; protein KAT2	
metabolite OPC4 + protein ACXAIM1KAT	metabolite JA A; protein KAT5 metabolite JA A;	
activates metabolite_JA	protein_KAT1 metabolite_JA A	KEGG
Signalizacijska pot etilena		
protein ACS + metabolite SAM activates	protein ACS1 metabolite ACC A; protein ACS2	KEGG
metabolite ACC	metabolite ACC A; protein ACS3	
_	metabolite ACC A; protein ACS4	
	metabolite ACC A: protein ACS5	
	metabolite ACC A; protein ACS6	
	metabolite ACC A: protein ACS7	

Manualno izgrajen model	Razširjeno model	Izvor podatkov
protein_ACS + metabolite_SAM activates	metabolite_ACC A; protein_ACS9 metabolite_ACC	
metabolite_ACC	A; protein_ACS10 metabolite_ACC A;	
	protein_ACS11 metabolite_ACC A;	
	metabolite_SAM metabolite_ACC A	KEGG
protein ACO + metabolite ACC activates	protein ACO1 metabolite Ethylene A;	KEGG
metabolite Ethylene	protein ACO2 metabolite Ethylene A;	
	protein ACO4 metabolite Ethylene A;	
	protein ACO metabolite Ethylene A: protein ACO-	
	like metabolite Ethylene A: metabolite ACC	
	metabolite Ethylene A	
metabolite Copper + protein RAN1 activates	metabolite Copper metabolite Copper cyto A:	PMID: 12045274
metabolite Copper cyto	protein RAN1 metabolite Copper cyto A	
incusonic_coppor_cyto	protein_rentri incusonte_copper_cyto re	
metabolite_Copper_cyto +	metabolite_Copper_cyto protein ETR1 A;	PMID: 12045274
protein_Inactive_et_receptor activates	metabolite_Copper_cyto protein_ERS1 A;	PMID: 16920797
protein_Et_receptor	metabolite_Copper_cyto protein ETR2 A;	
	metabolite Copper cyto protein ERS2 A;	
	metabolite Copper cyto protein EIN4 A;	
	protein Inactive et receptor protein ETR1 A;	
	protein Inactive et receptor protein ERS1 A:	
	protein Inactive et receptor protein ETR2 A;	
	protein Inactive et receptor protein ERS2 A:	
	protein Inactive et receptor protein EIN4 A	
protein Inactive EIN2 activates protein EIN2	protein Inactive EIN2 protein EIN2 A	PMID: 16920797
complex Et recentor CTR1 inhibits protein EIN2	complex Et recentor CTR1 protein EIN2 I	PMID: 20591837
		PMID: 18692429
		PMID: 21690206
		PMID: 19769567
protein EIN2 activates protein EIN3EII.1EII.2	protein EIN2 protein EIN3 A: protein EIN2	PMID: 12045274
	protein EII 1 A: protein EIN2 protein EII 2 A	PMID: 1103122
	protein_ElET A, protein_Elit2 protein_ElE2 A	PMID:16020707
compley ASK1 CULLIN1 RBXE2 EBE12	compley ASK1 CULLIN1 RBXE2 EBE12	PMID: 18692429
inhibits protein EIN3EII 1EII 2	protein EIN3	1 WILD: 100/242)
minous procent_Env3EntTETE2	approx ASV1 CULLINI PRVE2 EDE12	
	protein EII 1	
	complex ASK1 CULLIN1 PRYE2 FRE12	
	protein EII 2 I	
nrotain EIN2EII 1EII 2 ± come EDE1EDE2	protein_EIL2 I protein_EIN3_protein_EDE1_A, motein_EIN2	DMID-16020707
protein_EINSELLTEIL2	protein EDE2 A: protein EU 1 protein EDE1 A:	1 10110.10920/9/
activates protein_EDF1EDF2	protein_EDF2 A, protein_EL1 protein_EBF1 A;	
	protein_EIL1 protein_EBF2 A; protein_EIL2	
protoin EDIS inhibits protein EDE1EDE2	protein_EBF1 A; protein_EIL2 protein_EBF2 A	DMID: 19/02/20
protein_EIN5 innibits protein_EBF1EBF2	protein_EIN5 protein_EBF1 I; protein_EIN5	PIVILD: 18092429
	protein_EBF21	PIVILD: 16920/97
	EDEL and DDELO A CONDI	PMID: 1/085683
protein_EKFEDF + gene_PDF1.2 activates	protein_EKF1 protein_PDF1.2 A; protein_EDF1	којо Е(2003)
protein_PDF1.2	protein_PDF1.2 A; protein_EDF2 protein_PDF1.2	
	A; protein_EDF3 protein_PDF1.2 A; protein_EDF4	
	protein PDF1 2 A	

Manualno izgrajen model	Razširjeno model	Izvor podatkov
protein_SAM + metabolite_L-methionine activates	protein_SAM1 metabolite_SAM A; protein_MAT3	AraCyc database
metabolite_SAM	metabolite_SAM A; protein_MAT4	
	metabolite_SAM A; protein_SAM2	
	metabolite_SAM A; metabolite_L-methionine	
	metabolite_SAM A	
metabolite_OPC8 + protein_X5 activates	metabolite_OPC8 metabolite_OPC-8:0-CoA A;	
metabolite_OPC-8:0-CoA	protein_X5 metabolite_OPC-8:0-CoA A	KEGG
protein_EIN3EIL1EIL2 + gene_ERFEDF activates	protein_EIN3 protein_ERF1 A; protein_EIN3	PMID: 18273012
protein_ERFEDF	protein_EDF1 A; protein_EIN3 protein_EDF2 A;	PMID:11031228
	protein_EIN3 protein_EDF3 A; protein_EIN3	
	protein_EDF4 A; protein_EIL1 protein_ERF1 A;	
	protein_EIL1 protein_EDF1 A; protein_EIL1	
	protein_EDF2 A; protein_EIL1 protein_EDF3 A;	
	protein_EIL1 protein_EDF4 A; protein_EIL2	
	protein_ERF1 A; protein_EIL2 protein_EDF1 A;	
	protein_EIL2 protein_EDF2 A; protein_EIL2	
	protein_EDF3 A; protein_EIL2 protein_EDF4 A	
protein_EIN3EIL1EIL2 + gene_GST1b-CHIPR4	protein_EIN3 protein_GST1 A; protein_EIN3	PMID: 8090746
activates protein_GST1b-CHIPR4	protein_b-CHIA; protein_EIN3 protein_PR4 A;	
	protein_EIL1 protein_GST1 A; protein_EIL1	
	protein_b-CHIA; protein_EIL1 protein_PR4 A;	
	protein_EIL2 protein_GST1 A; protein_EIL2	
	protein_b-CHIA; protein_EIL2 protein_PR4 A	
protein_CTR1 + protein_Et_receptor binds	protein_CTR1 complex_Et_receptor_CTR1 P;	PMID: 1204527
complex_Et_receptor_CTR1	protein_ETR1 complex_Et_receptor_CTR1 P;	PMID:16920797
	protein_ERS1 complex_Et_receptor_CTR1 P;	
	protein_ETR2 complex_Et_receptor_CTR1 P;	
	protein_ERS2 complex_Et_receptor_CTR1 P;	
	protein_EIN4 complex_Et_receptor_CTR1 P;	
	protein_CTR1 protein_ETR1 B; protein_CTR1	
	protein_ERS1 B; protein_CTR1 protein_ETR2 B;	
	protein_CTR1 protein_ERS2 B; protein_CTR1	
	protein_EIN4 B	
metabolite_Ethylene inhibits	metabolite_Ethylene complex_Et_receptor_CTR1 I	PMID: 1204527
complex_Et_receptor_CTR1		
complex_ASK1_CULLIN1_RBXE2 +	complex_ASK1_CULLIN1_RBXE2	PMID: 16920797
protein_EBF1EBF2 binds	complex_ASK1_CULLIN1_RBXE2_EBF12 P;	
complex_ASK1_CULLIN1_RBXE2_EBF12		
	complex_ASK1_CULLIN1_RBXE2_EBF12 P;	
	protein_EBF2	
	complex_ASK1_CULLIN1_RBXE2_EBF12 P;	
	complex_ASK1_CULLIN1_RBXE2_protein_EBF1	
	B; complex_ASK1_CULLIN1_RBXE2	
	protein_EBF2 B	

Priloga B: Preglednica komponent modela

V prvem stolpcu so prikazana imena družin komponent (nivo 2), v drugem pripadajoča individualna kratka imena komponent razširjenega modela (nivo 3), v tretjem pa pripadajoči genski identifikatorji (iz podatkovne baze TAIR).

Appendix B: Table of the components included in the model

In first row family names are shown (level 2), in the second row corresponing individual short names in expanded model (level 3) in third row gene (TAIR data base) identifiers are shown

Imo družino	Individualno kratko	Genski
(nivo 2)	ime komponente	identifikator
(nivo 2)	(nivo 3)	TAIR
SA	SA	/
HRT	HRT	AT5G43470
NPR1	NPR1	AT1G64280
NIMIN	NIMIN1	AT1G02450
NIMIN	NIMIN2	AT3G25882
NIMIN	NIMIN3	AT1G09415
PAD34	PAD4	AT3G52430
PAD34	PAD3	AT3G26830
EDS1	EDS1	AT3G48090
EDS5	EDS5	AT4G39030
PR125	PR1	AT2G14610
PR125	PR2	AT3G57260
PR125	PR5	AT1G75040
ICS	ICS1	At1g74710
ICS	ICS2	AT1G18870
WRKY70	WRKY70	At3g56400
MPK4	MPK4	At4g01370
Chorismate	Chorismate	/
Isochorismate	Isochorismate	/
BA	BA	/
BA2H	BA2H	/
ROS_productive_enzymes	NADPH_oxidase	/
ROS_productive_enzymes	Catalase	/
ROS_productive_enzymes	Glutathione peroxidase	/
ROS_productive_enzymes	Superoxide_dismutase	/
SAG	SAG	/
SGE	SGE	/
Trans-cinnamic_acid	Trans-cinnamic_acid	/
Phenylalanine	Phenylalanine	/
Phenylpyruvate	Phenylpyruvate	/
ROS	ROS	/
PAL	PAL1	AT2G37040
PAL	PAL2	AT3G53260
PAL	PAL3	AT5G04230
PAL	PAL4	AT3G10340
IPL	IPL	/
СМ	CM1	AT3G29200
СМ	CM2	At5g10870
СМ	CM3	At1g69370

Ime družine (nivo 2)	Individualno kratko ime komponente	Genski identifikator
((nivo 3)	TAIR
Prephenate_aminotransferase	Prephenate_aminotransferase	At2G22250
Prephenate	Prephenate	/
Arogenate_dehydratase	Arogenate_dehydratase	At5g22630
Orto-coumaric_acid	Orto-coumaric_acid	/
UGP_glikosyltransferaze	UGP_glikosyltransferaze	AT1G01420
Ethylene	Ethylene	/
Copper	Copper	/
SAM	SAM	/
ACC	ACC	/
ACS	ACS1	AT3G61510
ACS	ACS2	AT1G01480
ACS	ACS3	AT5G28360
ACS	ACS4	AT2G22810
ACS	ACS5	AT5G65800
ACS	ACS6	AT4G11280
ACS	ACS7	AT4G26200
ACS	ACS8	AT4G37770
ACS	ACS9	AT3G49700
ACS	ACS10	AT1G62960
ACS	ACS11	AT4G08040
ACO	ACO1	AT2G19590
ACO	ACO2	AT1G62380
ACO	ACO4	AT1G05010
ACO	ACO	AT1G12010
ACO	ACO-like	AT1G77330
RAN1	RAN1	AT5G44790
ET_receptor	ETR1	AT1G66340
ET_receptor	ERS1	AT2G40940
ET_receptor	ETR2	AT3G23150
ET_receptor	ERS2	AT1G04310
ET_receptor	EIN4	AT3G04580
CTR1	CTR1	AT5G03730
EIN2	EIN2	AT5G03280
EIN3EIL1EIL2	EIN3	AT3G20770
EIN3EIL1EIL2	EIL1	AT2G27050
EIN3EIL1EIL2	EIL2	AT5G21120
ERFEDF	ERF1	AT3G23240
ERFEDF	EDF1	AT1G25560
ERFEDF	EDF2	AT1G68840
ERFEDF	EDF3	AT3G25730
ERFEDF	EDF4	AT1G13260
EBF1EBF2	EBF1	AT2G25490
EBF1EBF2	EBF2	AT5G25350
EIN5	EIN5	AT1G54490
JA	JA	/
Linolenic acid	Linolenic acid	/

nadaljevanje priloge B: Preglednica komponent modela.

Ime družine	Individualno kratko	Genski
(nivo 2)	ime komponente	identifikator
((nivo 3)	TAIR
LOX	LOX1	AT1G55020
LOX	LOX2	AT3G45140
LOX	LOX3	AT1G17420
LOX	LOX4	AT1G72520
LOX	LOX5	AT3G22400
LOX	LOX6	AT1G67560
AOS	AOS	AT5G42650
AOC	AOC1	AT3G25760
AOC	AOC2	AT3G25770
AOC	AOC3	AT3G25780
AOC	AOC4	AT1G13280
13-HPT	13-HPT	/
12/13_EDT	12/13_EDT	/
OPDA	OPDA	/
JMT	JMT	AT1G19640
JA-Ile	JA-Ile	/
COI1	COII	AT2G39940
JAR1	JAR1	AT2G46370
JAZ	JAZ1	AT1G19180
JAZ	JAZ2	AT1G74950
JAZ	JAZ3	At3g17860
JAZ	JAZ4	AT1G48500
JAZ	JAZ5	AT1G17380
JAZ	JAZ6	AT1G72450
JAZ	JAZ7	AT2G34600
JAZ	JAZ8	AT1G30135
JAZ	JAZ9	AT1G70700
JAZ	JAZ10	AT5G13220
JAZ	JAZ11	AT3G43440
JAZ	JAZ12	AT5G20900
MYC2	MYC2	AT1G32640
GST1b-CHIPR4	GST1	AT1G02930
GST1b-CHIPR4	PR4	AT3G04720
GST1b-CHIPR4	b-CHI	AT3G12500
PDF1.2	PDF1.2	AT5G44420
MPK6	MPK6	At2g43790
MPK3	MPK3	AT3G45640
THI2.1JR1VSP1CLH1	THI2.1	AT1G72260
THI2.1JR1VSP1CLH1	JR1	AT3G16470
THI2.1JR1VSP1CLH1	VSP1	AT5G24780
THI2.1JR1VSP1CLH1	CLH1	AT1G19670
TGA TF245	TGA TF2	At5g06950
TGA TF245	TGA TF4	At5g10030
TGA $TE245$	TGA TES	At5g06960

nadaljevanje priloge B: Preglednica komponent modela.

Imo duužino	Individualno kratko	Genski
ime aruzine	ime komponente	identifikator
(nivo 2)	(nivo 3)	TAIR
OPCL1ACXAIM1KAT	OPCL1	AT1G20510
OPCL1ACXAIM1KAT	ACX1	AT4G16760
OPCL1ACXAIM1KAT	ACX2	AT5G65110
OPCL1ACXAIM1KAT	ACX3	AT1G06290
OPCL1ACXAIM1KAT	ACX4	AT3G51840
OPCL1ACXAIM1KAT	ACX5	AT2G35690
OPCL1ACXAIM1KAT	ACX6	AT1G06310
OPCL1ACXAIM1KAT	AIM1	AT4G29010
OPCL1ACXAIM1KAT	KAT1	AT1G04710
OPCL1ACXAIM1KAT	KAT2	AT2G33150
OPCL1ACXAIM1KAT	KAT5	AT5G48880
ACXAIM1KAT	ACX1	AT4G16760
ACXAIM1KAT	ACX2	AT5G65110
ACXAIM1KAT	ACX3	AT1G06290
ACXAIM1KAT	ACX4	AT3G51840
ACXAIM1KAT	ACX5	AT2G35690
ACXAIM1KAT	ACX6	AT1G06310
ACXAIM1KAT	AIM1	AT4G29010
ACXAIM1KAT	KAT1	AT1G04710
ACXAIM1KAT	KAT2	AT2G33150
ACXAIM1KAT	KAT5	AT5G48880
OPR3	OPR3	AT2G06050
OPC8	OPC8	/
Me-JA	Me-JA	/
OPC6	OPC6	/
OPC4	OPC4	/
OPC-8:0-CoA	OPC-8:0-CoA	/
SAM	SAM1	AT1G02500
SAM	SAM2	AT4G01850
SAM	MAT3	AT2G36880
SAM	MAT4	AT3G17390
SCF	SCF	
AAO4	AAO4	AT1g04580

nadaljevanje priloge B: Preglednica komponent modela.

Priloga C: Slovar komponent modela s sinonimi uporabljen za tekstovno rudarjenje

V vsaki vrstici je opisana ena komponenta in njeni sinonimi, ločeni z vejico. Prvo ime v vrstici predstavlja ime biološke komponente kot je predstavljena v modelu.

Appendix C: vocabulary of the biological components used by Bio3graph tool

In every row is one component with its synonyms separated by comma. The first name in the row represents the biological component name that is also visualized in the graph nodes.

SA, salicylic acid, Salicylate, o-Hydroxybenzoic acid

HRT,HRT protein,Hypersensitive response to TCV, HYPERSENSITIVE RESPONSE TO TCV, MWF20.19, MWF20_19, RCY1, RECOGNITION OF PERONOSPORA PARASITICA 8, RESISTANT TO CMV(Y) 1, RPP8,DISEASE RESISTANCE PROTEIN RPP8, AT5G43470

NPR1, NPR1 gene, NPR1 protein, ARABIDOPSIS NONEXPRESSER OF PR GENES 1, ATNPR1, F15H21.6, F15H21_6, NIM1, NON-INDUCIBLE IMMUNITY 1, NONEXPRESSER OF PR GENES 1, SAI1, SALICYLIC ACID INSENSITIVE 1, AT1G64280 NIMIN1, NIMIN1 gene, NIMIN1 protein, T6A9.23, NIM1-INTERACTING 1, NIMIN-1, At1g02450

NIMIN2, NIM1-INTERACTING 2, NIMIN-2, AT3G25882

NIMIN3, NIM1-INTERACTING 3, NIMIN-3, AT1G09415

PAD4, PAD4 gene, PAD4 protein, ARABIDOPSIS PHYTOALEXIN DEFICIENT 4, ATPAD4, F22O6.190, PHYTOALEXIN DEFICIENT 4, At3g52430

PAD3, CYP71B15, MDJ14.12, PAD3, PHYTOALEXIN DEFICIENT 3, AT3G26830

EDS1, EDS1 gene, EDS1 protein, ATEDS1, T17F15.40, ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY 1, At3g48090

EDS5, EDS5 gene, SID1 gene, EDS5 protein, SID1 protein, SALICYLIC ACID INDUCTION DEFICIENT 1, F19H22.130, F19H22_130, ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY 5, SID1, At4g39030

PR1, PR1 gene, PR1 protein, ATPR1, PR 1, T6B13_15, PATHOGENESIS-RELATED PROTEIN 1, PATHOGENESIS-RELATED GENE 1, T6B13.15, At2g14610, PR-1, PR-1a

PR2, PR2 gene, PATHOGENESIS-RELATED PROTEIN 2, BGL2, BG2, BETA-1, 3-GLUCANASE 2, 3-GLUCANASE, PR-2, PR 2, F2809.110, At3g57260

PR5, PR5 protein,PR-5, PATHOGENESIS-RELATED PROTEIN 5, PATHOGENESIS-RELATED GENE 5,PR 5,At1g75040 ICS1, ICS1 gene,SID2 gene,EDS16 gene, ICS1 protein,SID2 protein,EDS16 protein, ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY TO ERYSIPHE ORONTII 16, AT1G74710.1, SALICYLIC ACID INDUCTION DEFICIENT 2, ISOCHORISMATE SYNTHASE, ISOCHORISMATE SYNTHASE 1, SID2, EDS16, F25A4.31,ICS 1,ATICS1,ICS-1,ARABIDOPSIS ISOCHORISMATE SYNTHASE 1, ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY TO ERYSIPHE ORONTII 16, At1g74710

ICS2, ICS2 gene, ICS2 protein, F6A14_3, ISOCHORISMATE SYNTHASE 2, ATICS2, F6A14.3, ICS 2, ICS-2, At1g18870

WRKY70, WRKY70 gene, WRKY70 protein, WRKY DNA-binding protein 70, ARABIDOPSIS THALIANA WRKY DNA-BINDING PROTEIN 70, ATWRKY70, At3g56400

MPK4, MPK4 gene, MPK4 protein, ATMPK4, ARABIDOPSIS THALIANA MAP KINASE 4, MAP KINASE 4, F2N1.1, F2N1_1, At4g01370

Chorismate

Isochorismate, Iso-chorismic acid, Isochorismic acid

BA,Benzoic acid, benzene carboxylic acid, benzoate, Benzeneformic acid, phenylformic acid

BA2H, benzoic acid 2-hydroxylase

NADPH_oxidase

Catalase, CAT

Glutathione_peroxidase,GSH peroxidase

Superoxide_dismutase, SOD

SAG, salicylic acid glucoside, Salicylic acid beta-glucoside, salicylate glucoside, 2-O-b-D glucoside

SGE, Salicylic acid glucose ester, salicyloyl glucose ester

Trans-cinnamic_acid, Cinnamic acid, trans-Cinnamate, trans-Cinnamic acid, (E)-Cinnamate

Phenylalanine, L-phenylalanine, 3-Phenylalanine, Phe

Phenylpyruvate, Phenylpyruvate, Phenylpyruvic acid, alpha-Ketohydrocinnamic acid, keto-Phenylpyruvate, 3-Phenyl-2-oxopropanoate

ROS, reactive oxigen species, oxigen radicals, oxidative burst, h2o2, hydogen peroxide, H 2 O 2, O3, O2,O2-*

PAL1, PAL1 gene, PAL1 protein, CI0004, T1J8.22, PHENYLALANINE AMMONIA LYASE 1, PHE AMMONIA LYASE 1, T1J8_22, PAL 1, PAL-1, ATPAL1, At2g37040

PAL2, PAL2 gene, PAL2 protein, phenylalanine ammonia-lyase 2, T4D2.190, PAL 2, PAL-2, ATPAL2, At3g53260

PAL3, PAL3 gene, PAL3 protein, F21E1.150, ATPAL3, PHENYL ALANINE AMMONIA-LYASE 3, F21E1_150, PAL 3, PAL-3, At5g04230

PAL4, PAL4 gene, PAL4 protein, Phenylalanine ammonia-lyase 4, PAL 4, PAL-4, F14P13.6, At3g10340

IPL, IPL protein, isochorismate pyruvate lyase

CM1, ARABIDOPSIS THALIANA CHORISMATE MUTASE 1, ATCM1, CHORISMATE MUTASE 1, MXO21.4, AT3G29200

nadaljevanje priloge C: Slovar komponent modela s sinonimi.

CM2, ATCM2, chorismate mutase 2, At5g10870 CM3,ATCM3, chorismate mutase 3, At1g69370 Prephenate_aminotransferase,At2G22250 Prephenate, Prephenic acid Arogenate_dehydratase, ADT5, arogenate dehydratase 5, prephenate dehydratase, At5g22630 Orto-coumaric_acid, trans-2-Hydroxycinnamate, trans-2-Hydroxycinnamic acid, 2-Hydroxycinnamate, 2-Coumaric acid, o-Coumaric acid. 2-Coumarate UGP_glikosyltransferaze, UGT72B3, UDP-GLUCOSYL TRANSFERASE 72B3, UDP-glycosyltransferase, quercetin 3-Oglucosyltransferase, AT1G01420 Ethylene, Ethene, ET Copper, Cu, Cu2+ SAM, Sadenosyl methionine, S-Adenosyl methionine, S-adenosyl-L-methionine ACC, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic-acid ACS1, ACS1 protein, ARABIDOPSIS THALIANA 1-AMINOCYCLOPROPANE-1-CARBOXYLATE SYNTHASE 1, 1-AMINOCYCLOPROPANE-1-CARBOXYLATE SYNTHASE 1, AT-ACS1, F2A19.110, ACC SYNTHASE 1, At3g61510 ACS2, ACS2 protein, 1-Amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase 2, 1-AMINOCYCLOPROPANE-1-CARBOXYLATE SYNTHASE, F22L4.4, AT-ACC2, EC 4.4.1.14, F22L4 4, S-ADENOSYL-L-METHIONINE METHYLTHIOADENOSINE-LYASE, At1g01480 ACS3, ACS3 protein, F21B23.5, F21B23.5, I-F21B23.5, I-AMINOCYCLOPROPANE-I-CARBOXYLATE SYNTHASE LIKE PSEUDOGENE, At5g28360 ACS4 protein, ATACS4, 1-AMINOCYCLOPROPANE-1-CARBOXYLATE SYNTHASE, T30L20.7, ACS4. AMINOCYCLOPROPANE-1-CARBOXYLATE SYNTHASE 4, 1-AMINOCYCLOPROPANE-1-CARBOXYLIC ACID SYNTHASE POLYPEPTIDE, ACC4, At2g22810 ACS5, ACS5 protein, ETO2, CYTOKININ-INSENSITIVE 5, MPA24_15, ACC SYNTHASE 5, MPA24.15, ATACS5, CIN5, 1-AMINO-1-CYCLOPROPANECARBOXYLATE SYNTHASE, ETHYLENE OVERPRODUCER 2, At5g65800 ACS6, ACS6 protein, F8L21.70, F8L21 70, 1-AMINOCYCLOPROPANE-1-CARBOXYLIC ACID (ACC) SYNTHASE 6, ATACS6, At4g11280 ACS7, ACS7 protein, 1-AMINO-CYCLOPROPANE-1-CARBOXYLATE SYNTHASE 7, T25K17.10, T25K17 10, ATACS7, At4g26200 ACS8, ACS8 protein,1-AMINO-CYCLOPROPANE-1-CARBOXYLATE SYNTHASE 8, T28I19.50, T28I19 50, At4g37770 ACS9, ACS9 protein, ETO3, ETHYLENE OVERPRODUCING 3, 1-AMINOCYCLOPROPANE-1-CARBOXYLATE SYNTHASE 9, T16K5.50, At3g49700 ACS10, ACS10 protein, F16P17_11, F16P17.11, ACC SYNTHASE 10, At1g62960 ACS11, ACS11 protein, 1-AMINOCYCLOPROPANE-1-CARBOXYLATE SYNTHASE 11, T17A2 2, T17A2.2, At4g08040 ACO1, ACO1 protein, F3P11 19, F3P11.19, ACC OXIDASE 1, ATACO1, At2g19590 ACO2, ACO2 protein, ACC OXIDASE 2, F24O1.40, F24O1 40, ATACO2, ACC OXIDASE, At1g62380 ACO4, ACO4 protein, ETHYLENE-FORMING ENZYME, T7A14.12, ethylene forming enzyme, EFE, 1-AMINOCYCLOPROPANE-1-CARBOXYLATE OXIDASE, 1-AMINOCYCLOPROPANE-1-CARBOXYLIC ACID OXIDASE, EAT1, T7A14_12, At1g05010 ACO, F12F1.12, F12F1.12 protein, F12F1 12, AT1G12010 ACO-like, F2P24.4 protein, F2P24 4, AT1G77330 RAN1, RAN1 protein, RESPONSIVE-TO-ANTAGONIST 1, K23L20_14, HMA7, K23L20.14, At5g44790 ETR1, ETR1 protein, EIN1, T27F4.9, ETHYLENE INSENSITIVE 1, HISTIDINE KINASE ETR1, ETHYLENE RESPONSE 1, T27F4_9, ETR, At1g66340 ERS1, ERS, ETHYLENE RESPONSE SENSOR, ETHYLENE RESPONSE SENSOR 1, T20B5.14, T20B5 14, AT2G40940 ETR2, ETHYLENE RESPONSE 2, K14B15.9, AT3G23150 ERS2, ETHYLENE RESPONSE SENSOR 2, F19P19.25, F19P19_25, AT1G04310 EIN4, ETHYLENE INSENSITIVE 4, F7018.5, F7018 5, AT3G04580 CTR1, CTR1 protein,SUGAR-INSENSITIVE 1, SERINE/THREONINE-PROTEIN KINASE CTR1, SIS1, F17C15 150, F17C15.150,AT5G03730.1, CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE 1, At5g03730 EIN2, EIN2 protein, PIR2, F12E4_10, ERA3, ORESARA 2, ATEIN2, CYTOKININ RESISTANT 1, F12E4.10, ETHYLENE INSENSITIVE 2, ORE3, CKR1, ENHANCED RESPONSE TO ABA3, ORESARA 3, ORE2, At5g03280 EIN3, EIN3 protein, ETHYLENE-INSENSITIVE3, MOE17.4, At3g20770 EIL1, ATEIL1, ETHYLENE-INSENSITIVE3-LIKE 1, T20P8.10, T20P8 10, AT2G27050 EIL2, ETHYLENE-INSENSITIVE3-LIKE 2, T10F18.150, T10F18_150, AT5G21120

ERF1, ERF1 gene, ERF1 protein, ETHYLENE RESPONSE FACTOR 1, ATERF1, K14B15.4, At3g23240

EDF1, EDF1 gene, EDF1 protein, TEM1, F2J7.3, F2J7_3, TEMPRANILLO 1, TEM1, ETHYLENE RESPONSE DNA BINDING FACTOR 1, AT1G25560

EDF2,EDF2 gene,EDF2 protein,RAV2, TEM2, ATRAV2, RAP2.8, T6L1.3, T6L1_3, TEMPRANILLO 2, RELATED TO AP2 8,

nadaljevanje priloge C: Slovar komponent modela s sinonimi.

ETHYLENE RESPONSE DNA BINDING FACTOR 2, REGULATOR OF THE ATPASE OF THE VACUOLAR MEMBRANE, AT1G68840 EDF3, EDF3 gene, EDF3 protein, K13N2.14, ETHYLENE RESPONSE DNA BINDING FACTOR 3, AT3G25730 EDF4, EDF4 gene, EDF4 protein, RAV1, T6J4.2, T6J4_2, RELATED TO ABI3/VP1 1, ETHYLENE RESPONSE DNA BINDING FACTOR 4, AT1G13260 EBF1, EBF1 gene, EBF1 protein, F13B15.15, FBL6, F13B15 15, EIN3-BINDING F BOX PROTEIN 1, At2g25490 EBF2, EBF2 gene, EBF2 protein, EIN3-BINDING F BOX PROTEIN 2, F18G18.90, F18G18 90, EBF1/2, At5g25350 EIN5, EIN5 protein, EXORIBONUCLEASE 4, ACC INSENSITIVE 1, F20D21.30, ETHYLENE INSENSITIVE 5, ATXRN4, AIN1, F20D21 30, XRN4, At1g54490 JA, Jasmonic acid, (-)-Jasmonic acid, Jasmonate, 2-(3-oxo-2-((Z)-pent-2-enyl)cyclopentane)acetic acid Linolenic acid LOX1, LOX1 protein,Lipoxygenase 1, LIPOXYGENASE, ATLOX1,LOX 1, LOX-1, ARABIDOPSIS LIPOXYGENASE 1, At1g55020 LOX2, LOX2 protein, ARABIODOPSIS THALIANA LIPOXYGENASE 2, ATLOX2, LIPOXYGENASE 2, LOX 2, LOX-2, T14D3.80, At3g45140 LOX3, LOX3 protein, F28G4.10, LOX 3, LOX-3, LIPOXYGENASE 3, At1g17420 LOX4, ARABIDOPSIS THALIANA LIPOXYGENASE 4, ATLOX4, LIPOXYGENASE 4, LOX4, T10D10.1, T10D10_1, AT1G72520 LOX5, ARABIDOPSIS THALIANA LIPOXYGENASE 5, ATLOX5, MCB17.13, AT3G22400 LOX6, ARABIDOPSIS THALIANA LIPOXYGENASE 6, ATLOX6, F12B7.11, F12B7_11, LIPOXYGENASE 6, AT1G67560 AOS, AOS protein, CYP74A, DELAYED DEHISCENCE 2, DDE2, ALLENE OXIDE SYNTHASE, CYTOCHROME P450 74A, At5g42650 AOC1, AOC1 protein, EARLY-RESPONSIVE TO DEHYDRATION 12, ALLENE OXIDE CYCLASE 1, ERD12, AOC 1, AOC-1, At3g25760 AOC2, AOC2 protein, ALLENE OXIDE CYCLASE 2, AOC 2, AOC-2, K13N2.11, At3g25770 AOC3, AOC3 protein, ALLENE OXIDE CYCLASE 3, K13N2.12, AOC 3, AOC-3, At3g25780 AOC4, AOC4 protein, ALLENE OXIDE CYCLASE 4, T6J4_4, T6J4.4, AOC 4, AOC-4, At1g13280 13-HPT, 13-HPOT, 13(S)-hydroperoxy linolenic acid 12/13 EDT, allene oxide OPDA, 12-OPDA, phytodienoic acid, 12-oxophytodienoic acid JMT, JMT protein, F14P1_3, JASMONIC ACID CARBOXYL METHYLTRANSFERASE, F14P1.3, At1g19640 JA-Ile, JA-isoleucine, Jasmonate-isoleucine, N-[(1R,2R)-3-oxo-2-(2-(Z)-pentenyl)cyclopentane-1-acetyl]-(2S,3S))-isoleucine COI1, COI1 protein, T28M21_10, T28M21.10, CORONATINE INSENSITIVE 1, At2g39940 JAR1, JAR1 protein, JASMONATE RESISTANT 1, FIN219, F11C10.6, FAR-RED INSENSITIVE 219, At2g46370 JAZ1, JAZ1 gene, JAZ1 protein, T29M8_5, T29M8.5, TIFY10A, JASMONATE-ZIM-DOMAIN PROTEIN 1, At1g19180 JAZ2, F25A4.8, F25A4_8, JASMONATE-ZIM-DOMAIN PROTEIN 2, TIFY10B, AT1G74950 JAZ3, JAZ3 protein, JASMONATE-ZIM-DOMAIN PROTEIN 3, JAI3, JASMONATE-INSENSITIVE 3, TIFY6B, At3g17860 JAZ4, JASMONATE-ZIM-DOMAIN PROTEIN 4, T1N15_11, T1N15_11, TIFY DOMAIN PROTEIN 6A, T1FY6A, AT1G48500 JAZ5, F28G4.16, JASMONATE-ZIM-DOMAIN PROTEIN 5, TIFY11A, AT1G17380 JAZ6, JASMONATE-ZIM-DOMAIN PROTEIN 6, T10D10.8, T10D10_8, TIFY DOMAIN PROTEIN 11B, TIFY11B, AT1G72450 JAZ7, JASMONATE-ZIM-DOMAIN PROTEIN 7, T31E10.6, T31E10 6, TIFY5B, AT2G34600 JAZ8, JASMONATE-ZIM-DOMAIN PROTEIN 8, TIFY5A, AT1G30135 JAZ9, F5A18.12, F5A18 12, JASMONATE-ZIM-DOMAIN PROTEIN 9, TIFY7, AT1G70700 JAZ10, JAS1, JASMONATE-ASSOCIATED 1, JASMONATE-ZIM-DOMAIN PROTEIN 10, T31B5.40, T31B5 40, TIFY DOMAIN PROTEIN 9, TIFY9, AT5G13220 JAZ11, JASMONATE-ZIM-DOMAIN PROTEIN 11, T18D12.10, TIFY3A, AT3G43440 JAZ12, F22D1.70, F22D1_70, JASMONATE-ZIM-DOMAIN PROTEIN 12, TIFY3B, AT5G20900 MYC2, MYC2 gene, MYC2 protein, F6N18_4, JIN1, ZBF1, JASMONATE INSENSITIVE 1, F6N18.4, ATMYC2, JAI1, RD22BP1, MYC2 TF, At1g32640 GST1, ARABIDOPSIS GLUTATHIONE S-TRANSFERASE 1, ARABIDOPSIS THALIANA GLUATIONE S-TRANSFERASE F3, ATGST1, ATGSTF3, ATGSTF6, EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 11, ERD11, F22D16.7, F22D16_7, GLUTATHIONE S-TRANSFERASE, GLUTATHIONE S-TRANSFERASE 1, GLUTATHIONE S-TRANSFERASE 6, GSTF6,AT1G02930 PR4, HEL, HEL protein, PR-4, HEVEIN-LIKE, F7018_21, F7018.21, PATHOGENESIS-RELATED 4, PR 4, At3g04720 b-CHI, b-CHI protein, basic chitinase, PATHOGENESIS-RELATED 3, PR3, PR-3, CHI-B, T2E22.18, ARABIDOPSIS THALIANA BASIC CHITINASE, PR 3, ATHCHIB, At3g12500

PDF1.2, PDF1.2 protein, LCR77, PDF1.2a, PLANT DEFENSIN 1.2, MFC16.8, MFC16_8, PLANT DEFENSIN 1.2A, Low-molecular-weight cysteine-rich 77, At5g44420

nadaljevanje priloge C: Slovar komponent modela s sinonimi.

MPK6, MPK6 protein, F18019.10, MAP KINASE 6, ATMPK6, ARABIDOPSIS THALIANA MAP KINASE 6, MAPK6, At2g43790 MPK3, MPK3 protein, ATMPK3, T6D9.4, ATMAPK3, MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE 3, AT3G45640 THI2.1, THI2.1 protein, THIONIN 2.1, THI2.1.1, At1g72260 JR1, JASMONATE RESPONSIVE 1, T2O4.6, AT3G16470 VSP1, ATVSP1, T4C12.50, VEGETATIVE STORAGE PROTEIN 1, AT5G24780 CLH1, ATCLH1, ARABIDOPSIS THALIANA CORONATINE-INDUCED PROTEIN 1, ATHCOR1, CORI1, CORONATINE-INDUCED PROTEIN 1, F6F9.28, F6F9 28, AT1G19670 TGA_TF2, TGA TF2 protein, AHBP-1B, MOJ9.12, MOJ9_12, At5g06950, TGA2 TGA TF4, TGA TF4 protein,OBF4, OCS BINDING ELEMENT 4, T31P16.20, T31P16 20, OCS ELEMENT BINDING FACTOR 4, OCTOPINE SYNTHASE ELEMENT-BINDING PROTEIN, TGACG MOTIF-BINDING FACTOR 4, At5g10030, TGA4 TGA TF5, TGA TF5 protein, OCS-ELEMENT BINDING FACTOR 5, TGA5, MOJ9.13, MOJ9_13, TGACG MOTIF-BINDING FACTOR 5, OBF5, At5g06960 OPCL1, F5M15.17, F5M15 17, OPC-8:0 COA LIGASE1, AT1G20510 ACX1, ATACX1, DL4405C, FCAALL.119, ACYL-COA OXIDASE 1, ACYL-COA OXIDASE, acyl-CoA synthetase, AT4G16760 ACX2, ACYL-COA OXIDASE 2, ATACX2, AT5G65110 ACX3, ACYL-COA OXIDASE 3, ATACX3, T2D23.1, AT1G06290 ACX4, ACYL-COA OXIDASE 4, ATEM1.9, ATG6, ATSCX, AT3G51840 ACX5, ACYL-COA OXIDASE 5, T20F21.12, T20F21 12, AT2G35690 ACX6, ACYL-COA OXIDASE 6, T2D23.2, T2D23 2, AT1G06310 AIM1, F19B15.40, F19B15 40, ABNORMAL INFLORESCENCE MERISTEM, AT4G29010 KAT2, PED1, PKT3, PEROXISOME DEFECTIVE 1, 3-KETOACYL-COA THIOLASE 2, PEROXISOMAL 3-KETOACYL-COA THIOLASE 3, AT2G33150 KAT1, 3-KETO-ACYL-COA THIOLASE 1, KAT1, PEROXISOMAL 3-KETOACYL-COA THIOLASE 4, PKT4, T1G11.4, T1G11_4, AT1G04710 KAT5, 3-KETO-ACYL-COENZYME A THIOLASE 5, K24G6.22, K24G6 22, PEROXISOMAL 3-KETO-ACYL-COA THIOLASE 2, PEROXISOMAL-3-KETO-ACYL-COA THIOLASE 1, PKT1, PKT2, AT5G48880 OPR3, DDE1, ATOPR3, F5K7.19, F5K7.19, DELAYED DEHISCENCE 1, OXOPHYTODIENOATE-REDUCTASE 3, AT2G06050 OPC8, 3-oxo-2-(cis-2'-pentenyl)-cyclopentane-1-octanoate, 3-oxo-2-(cis-2'-pentenyl)-cyclopentane-1-octanoic acid, oxopentenylcyclopentane-octanoic acid, 8-[(1R,2R)-3-oxo-2-{(Z)-pent-2-enyl}cyclopentyl]octanoate Me-JA, MeJa, methyl jasmonate, MJ OPC6, 3-oxo-2-(2-(Z)-pentenyl)cyclopentane-1-hexanoic acid, 3-oxo-2-(2-(Z)-pentenyl)cyclopentane-1-hexanoat OPC4, 3-oxo-2-(2'-[Z]-pentenyl)cyclopentane-1-butanoat, 3-oxo-2-(2'-[Z]-pentenyl)cyclopentane-1-butanoic acid, 3-oxo-2-(2-(Z)pentenyl)cyclopentane-1-butyric acid

 $OPC-8:0-CoA, oxopentenyl-cyclopentane-octanoyl-CoA, 8-[(1R,2R)-3-oxo-2-{(Z)-pent-2-enyl}cyclopentyl]octanoyl-CoA, OPC-8:0-CoA, 3-oxo-2-(cis-2'-pentenyl)-cyclopentane-1-octanoyl-CoA (IR,2R)-3-oxo-2-{(Z)-pent-2-enyl}cyclopentyl]octanoyl-CoA, OPC-8:0-CoA, 3-oxo-2-(cis-2'-pentenyl)-cyclopentane-1-octanoyl-CoA (IR,2R)-3-oxo-2-{(Z)-pent-2-enyl}cyclopentyl]octanoyl-CoA, OPC-8:0-CoA, 3-oxo-2-(cis-2'-pentenyl)-cyclopentane-1-octanoyl-CoA (IR,2R)-3-oxo-2-{(Z)-pent-2-enyl}cyclopentyl]octanoyl-CoA, OPC-8:0-CoA, 3-oxo-2-{(cis-2'-pentenyl)-cyclopentane-1-octanoyl-CoA} (IR,2R)-3-oxo-2-{(Cis-2'-pentenyl)-cyclopentane-1-octanoyl-CoA} (IR,2R)-3-oxo-2-{(Cis-2'-pentenyl)-cyclopentane-1-octano-1-oxo-2-(IR,2R)-3-oxo-2-{(Cis-2'-pentenyl)-2-oxo-2-(IR,2R)-3-oxo-2-(IR,2R)-3-oxo-2-(IR,2R)-3-oxo-2-(IR,2R)-3-oxo-2-(IR,2R)-3-oxo-2-(IR,2R)-3-oxo-2-(IR,2R)-3-oxo-2-(IR,2R)-3-oxo-2-(IR,2R)-3-oxo-2-(IR,2R)-3-oxo-2$

SAM1, ATSAM1, MAT1, METK1, S-ADENOSYLMETHIONINE SYNTHETASE 1, S-ADENOSYLMETHIONINE SYNTHETASE-1, SAM-1, SAM1, T14P4.17, T14P4_17, AT1G02500

SAM2,ATSAM2, MAT2, S-ADENOSYLMETHIONINE SYNTHETASE 2, SAM-2, SAM2, T7B11.11, T7B11_11, AT4G01850 MAT3, METHIONINE ADENOSYLTRANSFERASE 3, T1J8.6, T1J8_6, AT2G36880

MAT4, METHIONINE ADENOSYLTRANSFERASE 4, METHIONINE OVER-ACCUMULATOR 3, MGD8.26, MTO3, S-ADENOSYLMETHIONINE SYNTHETASE 3, SAMS3, AT3G17390

SCF, Skp1-Cullin-F-box

AAO4, arabidopsis aldehide oxidase 4,AT1g04580

L-methionine

Priloga D. Primer sinonimov reakcij uporabljenih za Bio3Graf- prikazano za sinonime aktivacije v tvorniškem glagolskem načinu

Appendix D: Example of reaction sinonims used for Bio3Graf - shown for sinonims of activation in active form

activate, activates capable of activating able to activate elevate, elevates increase, increases influence accumulation, influences accumulation, influence the accumulation, influences the accumulation induct inducts enhance, enhances increase, increases accumulate accumulates induce, induces catalyze, catalyzes generate, generates is a positive regulator, is positive regulator encode, encodes code for, codes for derepress activity, derepresses activity, derepress the activity, derepresses the activity positively signal, positively signals, signal positively, signals positively positively regulate, positively regulates, regulate positively, regulates positively stimulate, stimulates trigger, triggers facilitate, facilitates elevate, elevates initiate activation, initiates activation, initiate the activation, initiates the activation produce, produces lead to the formation, leads to the formation, lead to formation, leads to formation, leading to the formation, leading to formation lead to the creation, leads to the creation, lead to creation, leads to creation, leading to the creation, leading to creation lead to accumulation, lead to the accumulation, leads to an accumulation, leads to accumulation, leads to an accumulation lead to increase, leads to increase, lead to an increase, leads to an increase, lead to the increase, leads to the increase result in activation, results in activation, result in the activation, results in the activation, resulting in the activation result in accumulation, results in accumulation, result in the accumulation, results in the accumulation, results in accumulation, resulting in the accumulation involved in activation, involved in the activation involved in accumulation, involved in the accumulation involved in induction, involved in the induction involved in production, involved in the production involved in elevation, involved in the elevation involved in synthesis, involved in the synthesis is a precursor, is precursor, is the precursor transduce, transduces synthesize, synthesizes phosphorylate, phosphorylates oxidize, oxidizes, oxidise, oxidises upregulate, upregulates convert, converts, converted to, converted into stabilize, stabilizes, stabilise, stabilises is an enzyme involved in the biosynthetic pathway of turn on the transcription factor, turns on the transcription factor undergo conversion, undergoes conversion is one of the coactivators of is involved in the amplification loop of is considered to be positive regulator, are considered to be positive regulators has been identified as source of, has been identified as a source of has been implicated as generator, has been implicated as a generator doubled the concentration of result in synergistic activation, results in synergistic activation, resulted in synergistic activation

Priloga E: Seznam genov dodanih v model preko proteinskih interakcij (Consortium, 2011)

V preglednici so našteti genski, ki kodirajo za proteinske interaktorje proteinov iz modela signalizacijskih poti JA, SA in ET. V levem stolpcu je označen genski identifikator iz navadnega repnjakovca, levo pa ime proteina, za kateraga gen kodira.

Appendix E: List of genes added into the model through protein interactors (Consortium, 2011) In the table genes tha code for protein interactors interacting with proteins from the SA, JA and EtT signaling model. Left column denotes TAIR gene identifier and on the right coresponding protein names are listed.

Identifikator TAIR	Ime gena
AT1G78310	VQ motif-containing protein
AT1G19180	JAZ1
AT1G04330	unknown protein
AT1G28480	ROXY19
AT2G47880	ROXY9
AT2G25490	EBF1
AT1G30500	NF-YA7
AT1G14687	HB32
AT1G64280	NPR1
AT1G70700	JAZ9
AT3G54826	AT3G54826_Zim17-type zinc finger protein
AT1G15750	TOPLESS
AT3G45640	MPK3
AT1G69690	TCP15
AT2G37040	PAL1
AT3G25882	NIMIN2
AT1G22920	CSN5A
AT5G06780	EML2
AT2G18730	DGK3
AT1G01260	BHLH13
AT1G09415	NIMIN3
AT1G02920	GSTF7
AT2G22810	ACS4
AT3G17860	JAZ3
AT1G18660	AT1G18660 zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein
AT5G06960	TGA TF5
AT3G01990	ACR6
AT3G44720	ADT4
AT4G32190	Myosin heavy chain-related protein
AT5G06950	TGA TF2
AT3G53260	PAL2
AT1G15670	Galactose oxidase/kelch repeat superfamily protein
AT1G67170	unknown protein
AT1G30120	PDH-E1 BETA
AT1G02450	NIMIN1
AT2G41370	BOP2
AT1G25490	RCN1
AT5G22630	Arogenate dehvdratase
AT1G02690	IMPA6
AT2G30540	ROXY7
AT3G10340	PAL4
AT1G02930	GST1
AT1G51660	MKK4
AT2G45190	YABI
AT2G33150	KAT2
AT1G14920	RGA2
AT1G13030	AT1G13030 sphere organelles protein-related
AT2G06050	OPR3
AT3G48090	FDS1
AT1G12860	ICF2
AT3G02150	PTF1
AT1G06290	
AT4G16760	ACX1
AT1G17380	1475
AT2G27110	FRS3
AT1G52605	alnha/heta-Hydrolaces superfamily protein
AT1G15120	Endosomal targeting BRO1-like domain containing protein
AT4G33040	
A14033040	NUA 121

Idontifikator TAIR	Ima
	E2NI110
AT2C06420	
AT3G00430	PPRZ
ATIG51580	F5D2123
A15G09680	A 15G09680_Cytochrome b5 domain-containing protein
A13G16980	NRPB9A
AT1G09270	IMPA-4
AT3G06720	IMPA-1
AT1G17420	LOX3
AT1G80650	RTL1
AT1G71230	CSN5
AT2G23420	NAPRT2
AT2G05230	DNA heat shock N-terminal domain-containing protein
AT1G01480	ACS2
AT1G04310	ERS2
AT1G10230	ASK18
AT1G10940	SnRK24
AT1G22070	TGA3
AT1C26920	CUL 2
AT1C20050	
ATIG30135	JAZ8
A11G32230	RCD1
AT1G32640	MYC2 TF
AT1G48500	JAZ4
AT1G62380	ACO2
AT1G66240	ATX1
AT1G66340	ETR1
AT1G72450	JAZ6
AT1G73500	MKK9
AT1G74950	JAZ2
AT1G75040	PR5
AT1G75950	SKD1
AT1G79300	CDE2
AT1078500	DDI 1
AT2001930	DKL1
A12G2/050	ELLI
A12G30020	AP2C1
A12G30250	WRKY25
AT2G39940	COII
AT2G40940	ERS1
AT2G41090	CABP22
AT2G43790	MPK6
AT2G45280	RAD51
AT2G47430	CKI1
AT3G02000	ROXY1
AT3G18690	MKS1
AT3G18910	FTP2
AT3G18980	FTP1
AT3G20770	EINI2
AT3020770 AT2C22150	EIN5 ETD2
AT3025130	
A13G45140	LUX2
A13G46090	
AT3G50410	OBPI
AT3G51770	ETO1
AT3G55270	MKP1
AT3G55370	OBP3
AT3G56240	ССН
AT3G61510	ACS1
AT4G01370	MPK4
AT4G02570	CUL1
AT4G02680	FOL1
AT4G11280	AC\$6
AT4G10660	NIDD /
A 14019000	INF K4 A C 97
A 14020200	
A1403///0	ACS8
AT5G10030	TGA TF4
AT5G13220	JAZ10
AT5G20850	RAD51
AT5G25350	EBF2

nadaljevanje priloge E: Seznam genov dodanih v model preko proteinskih interakcij

Identifikator TAIR	Ime
AT5G35750	AHK2
AT5G58550	EQL2
AT1G03/30	A HD5
AT1G29200	EID1
ATIC28200	
A14G18960	AG
AT1G62960	ACS10
AT1G10210	MPK1
AT1G56340	CRT1
AT5G44790	RAN1
AT1G71860	PTP1
AT3G49580	LSU1
AT3G28715	VHAD2
AT3G26900	SKI 1
AT4G26750	EVTIUE
AT4020730	
A14G10143	IMPA-2
A15G13280	AKI
A15G14260	Rubisco methyltransferase family protein
AT5G10210	C2 calcium-dependent membrane targeting
AT5G60340	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein
AT5G14760	AO
AT5G45110	NPR3
AT5G59210	myosin heavy chain-related
AT5G10270	CDKC:1
AT5G14070	ROXY2
AT3G15180	ARM repeat superfamily protein
AT5G15600	SD11 A
AT2C11820	TCD 1/onn60 observation family protain
AT5011650	
A15G58550	MBB188
A12G35500	SKL2
A15G24660	LSU2
AT3G27960	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein
AT2G01570	RGA1
AT3G59940	SKIP20
AT4G21160	AGD12
AT3G29160	AKIN11
AT3G63210	MARD1
AT4G01920	Cysteine/Histidine-rich C1 domain family protein
AT5G65940	CHY1
AT5G51910	TCP family transcription factor
AT5G60120	TOE2
AT4G28910	NINIA
AT5G28420	DDCCD
AT5C42100	ASK2
AT3042190	ASK2
A14G17030	EXLBI
A14G1/220	MAP/0-5
AT4G14465	AHL20
AT4G15700	Thioredoxin superfamily protein
AT5G16560	KAN1
AT1G67800	copinerelated
AT3G14080	putative snRNP, small nuclear ribonucleo protein
AT4G08040	ACS11
AT5G11980	conservedoligomericGolgicomplexcomponentrelated
AT5G49210	K21P38
AT4G26080	ABI1
AT3G12250	TGA6
AT5G20000	
A T2C 42440	JALIZ TA 711
A 13043440	JAZ11 TTL 2
A12G42580	11L3
AT1G77920	TGA7
AT4G14110	COP9
AT5G42970	COP8
AT5G65210	TGA1
AT2G26070	RTE1
AT3G04580	EIN4
AT3G21510	AHP1
AT3G29350	AHP2

nadaljevanje priloge E: Seznam genov dodanih v model preko proteinskih interakcij

Identifikator TAIR	Ime
AT5G03280	EIN2
AT5G03730	CTR1
AT5G39340	AHP3
AT5G42980	TRX3
AT3G57260	PR2
AT3G04720	PR4
AT3G60010	ASK13
AT4G34210	ASK11
AT4G34470	ASK12
AT5G08590	ASK2
AT5G14250	COP13
AT5G20570	HRT1
AT5G38410	RBCS3B
AT5G63110	HDA6
AT4G30480	TPR1
AT3G21220	MKK5
AT4G29810	MKK2
AT5G56580	MKK6
AT5G61600	ERF104
AT5G63310	NDPK2
AT4G18040	EIF4E
AT5G18110	NCBP
AT5G35620	LSP1
AT3G56400	WRKY70
AT3G52430	PAD4
AT5G65800	ACS5
AT4G26070	MEK1
AT5G15840	CO
AT5G42650	AOS
AT2G46370	JAR1
AT5G24780	VSP1
AT5G54430	PHOS32
AT2G36270	ABI5
AT5G41790	CIP1
AT5G37190	CIP4
AT4G08500	MEKK1
AT5G14930	SAG101

nadaljevanje priloge E: Seznam genov dodanih v model preko proteinskih interakcij

Priloga F: Geni iz model s krompirjevimi identifikatorji ter pripadajočimi vrednostmi izražanja

V preglednici so prikazani geni, vključeni v model imunskega odziva ter geni, ki kodirajo za njihove proteinske interaktorje. V prvem stolpcu so geni združeni glede na njihovo funkcijo v modelu, v drugem je predstavljeno kratko ime ena v tretjem stolpcu pa je označen pripadajoči POCI identifikator. Prikazane so vrednosti izražanja genov v rastlinah sorte 'Désirée' po okužbi z virusom PVY. Vrednost predstavljajo logaritem kvocienta med vrednostjo izražanja v virusno proti slepo okuženim rastlinam (log₂FC). Prikazane so samo vrednosti statistično značilno različnih vrednosti izražanju (p<0.05). Prazna polja označujejo, da se izražanje gena v tej časovni točki ni značilno spremenilo. Prikazano je izražanje genov v različnih časovnih točkah po okužbi: 1., 3., 4., 5. in 7. dpi v spodnjih inokuliranih listih rastlin NahG-Désirée i rastlin 'Désirée' ter 1., 3., 4., 5., 7., 8., 9. in 11. dpi v zgornjih sistemskih listih rastlin 'Désirée'. Vrednosti izražanja genov so predstavljene z barvno lestvico: rdeče-indukcija izražanja, zeleno-znižano izražanje gena po okužbi.

Appendix F: Genes included in the model with their potato identificators and coresponding gene expression values

The table represents genes from the plant defence signaling model and genes coding for their protein interactors. In the first column genes are clustered according to their function in the model, in the second column their short names are represented and in the third column their coresponding POCI identificator are shown. Gene expression values in potato 'Désirée' plants after PVY infection are shown as log_2FC values bedween infected and control plants. Only values for statistically significant changes in gene expression are represented (p<0.05). Empty field denotes, that expression of the gene was not significantly altered after virus infection. Expression values in different time points after virus infection are shown: 1, 3, 4, 5 and 7 dpi in bottom inoculated leaves of plants NahG-Désirée and 'Désirée' plants and 1, 3, 4, 5, 7, 8, 9. and 11. dpi in uper systemic leaves of potato plants 'Désirée'. Expression values are color-coded: red-upregulation of a gene, green-downregulation of a gene.

	NahG-Désirée spodnji 'Désirée' spodnji								ji	'Désirée' sistemski										
Model	Kratko ime	POCI identifikator	1	3	4	5	7	1	3	4	5	7	1	3	4	5	7	8	9	11
Cross:GST	GST1	MICRO.191.C2																		
Cross:GST	GST1	MICRO.8970.C1																		
Cross:GST	GST1	bf_mxlfxxxx_0036g04.t3m.scf											-2.5							-0.9
Cross:SCF	RBX1	MICRO.15939.C1	0.6		0.3		0.3													
Cross:SCF	RBX1	MICRO.17469.C1					0.6													
Cross:SCF	RBX1	MICRO.6036.C2	-0.7				-0.3	-0.3	3	-0.2	-0.3		-0.3							
Cross:SCF	RBX1	MICRO.9794.C1	0.6				0.3	0.4												
Cross:WRKY	WRKY25	MICRO.14278.C2	1.4								0.5					0.6				
Cross:WRKY	WRKY70	MICRO.2876.C2					2.3										-1.8	-1.5		-1.9
Cross:WRKY	WRKY70	MICRO.4091.C1															-1.7	-1.7		
ET-response	PR3	MICRO.10439.C1				2.3	2.4		1.6											
ET-response	PR3	MICRO.10439.C4				1.5	2.8													
ET-response	PR3	MICRO.10544.C1					1.9								_					
ET-response	PR3	MICRO.1082.C4											-0.9	-0.9		-0.9				
ET-response	PR3	MICRO.11279.C1				1.3	2.6													
ET-response	PR3	MICRO.11279.C2				1.4	3.0													
ET-response	PR3	MICRO.4230.C1				0.9	1.9													
ET-response	PR3	MICRO.556.C1			-2.1						-1.8							_		
ET-response	PR3	MICRO.556.C10	2.7				3.2										-1.8			
ET-response	PR3	MICRO.556.C2	1.4				2.0							1.5			-1.1	1.0		1.2
ET-response	PR3	MICRO.556.C3	1.2	-1.2			2.5													
ET-response	PR3	MICRO.556.C7			1.2		2.1													
ET-response	PR3	POCAZ84TP		0.3			0.2						-0.3							
ET-response	PR3	bf_ivrootxx_0028f03.t3m.scf					2.3													
ET-response	PR3	bf_stolxxxx_0054c06.t3m.scf					1.7			0.7										
ET-response	PR4	MICRO.10545.C1										-0.2								
ET-response	PR4	MICRO.11296.C1					2.2							1.9			-2.6	5	1.8	3.2
ET-response	PR4	MICRO.11296.C3			0.7									0.6				0.7	0.6	0.5

			NahG-Désirée spodnji			'Désirée' spodnji					'Désirée' sistemski								
Model	Kratko ime	POCI identifikator	1	3	4	5	7	1	3	4	5	7	1	3	4	5	7 8	3 9	11
ET-response	PR4	PPCBC82TH					-0.3				0.4								
ET-signalling	CTR1	MICRO.1296.C1							-	-0.3									
ET-signalling	CTR1	MICRO.1296.C2																	
ET-signalling	CTR1	MICRO.1296.C3				-0.4		0.4										-0.	3 -0.4
ET-signalling	CTR1	MICRO.1544.C3	-0.3			0.2											0.2		
ET-signalling	CTR1	MICRO.8430.C1	0.6					0.7				0.4	0.6	0.9		0.6			-0.6
ET-signalling	CTR1	SSBN002H03u.scf					-0.3								-0.2				
ET-signalling	CTR1	bf_stolxxxx_0062d03.t3m.scf										1.2							
ET-signalling	CTR1	bf_suspxxxx_0061e01.t3m.scf			-0.4	-0.4						-0.6	-0.4	-0.4	-0.3	-0.3	-0.4	-0.	3
ET-signalling	CTR1	cSTB3I17TH	-0.3	0.4															
ET-signalling	EBF1	MICRO.1924.C1		-0.6	-0.7			0.7			0.6	1.3	0.9	0.7		1.0	1.5	0.9	
ET-signalling	EBF1	MICRO.1924.C2										0.5				0.5	1.0		
ET-signalling	EBF1	MICRO.3821.C1	1.1	-0.9	-0.9	-1.0			0.9	-1.0			0.9	1.4		1.0			-0.8
ET-signalling	EBF1	MICRO.6414.C1			-0.6	-0.5	-0.6												
ET-signalling	EBF1	MICRO.7039.C1	1.4		-0.8	-0.8							0.6						
ET-signalling	EIL1	MICRO.13539.C1	0.4														-0.3		
ET-signalling	EIL1	MICRO.2158.C1	0.6						0.4					1.2		0.7			-0.5
ET-signalling	EIL1	MICRO.2158.C3	1.3	-0.7				0.9	1.0					1.2	-0.6	1.1			
ET-signalling	EIL1	MICRO.2158.C4	0.8		0.6			0.6				0.8	0.6			0.7	0.4		
ET-signalling	EIL1	MICRO.2158.C6	1.2			-0.7			-	-0.6							-0.7		
ET-signalling	EIL1	MICRO.7737.C1	2.0													1.3			
ET-signalling	EIN2	MICRO.1385.C1	0.5		0.4			0.5	0.7			0.6		0.6		0.5			
ET-signalling	EIN2	MICRO.16010.C1	0.4						-	-0.2			-0.3		-0.3				
ET-signalling	EIN2	MICRO.7061.C1				0.5			0.6		0.6	0.5	0.7	0.5		0.5	0.5		0.5
ET-signalling	EIN5	060C06AF.esd										-0.4					-0.4		
ET-signalling	EIN5	MICRO.11110.C1	0.5																
ET-signalling	EIN5	MICRO.2400.C1	0.4		0.3														
ET-signalling	EIN5	cSTA30D8TH		0.4															
ET-signalling	EDF1/TEM1	MICRO.5263.C1	2.1								1.2			3.2	1.2	2.3			
ET-signalling	EDF1/TEM1	MICRO.8504.C1							-	-1.0				1.7					
ET-signalling	EDF1/TEM1	bf_mxlfxxxx_0052f08.t3m.scf	2.4								1.8			4.6	1.8	3.2			
ET-signalling	EDF3	MICRO.2835.C2	-0.5																
ET-signalling	EDF4/RAV1	MICRO.3354.C1	1.0						_							0.5			
ET-signalling	ERF104	MICRO.773.C2				-1.0			-	-1.3				2.0		1.3			
ET-signalling	ERF104	MICRO.773.C3							-	-1.7				1.3					
ET-signalling	ERF104	MICRO.773.C8		-0.7					-	-1.1				1.1					
ET-signalling	EIN4	MICRO.15054.C1	-0.4	-0.6			-0.6				-0.4	-0.5		0.7	0.4				-0.6
ET-signalling	EIN4	MICRO.16820.C1	-0.7		0.4							0.5					0.5		
ET-signalling	EIN4	MICRO.298.C1	1.0		-1.2	-0.9				-0.7						0.6			
ET-signalling	EIN4	MICRO.5389.C1	-0.3				-0.5		0.3					0.5	0.3	0.4	0.3		
ET-signalling	EIN4	cSTA24G2TH			0.3	0.3		-0.2				0.2				0.3			
ET-signalling	ERS1	MICRO.10534.C1	0.7		0.4														
ET-signalling	ERS1	MICRO.15543.C1	0.9				0.4												_
ET-signalling	ERS1	MICRO.6797.C1			-1.3	-0.6										1.1		0.8	3
ET-signalling	ERS1	cSTB3A24TH	0.5																
ET-signalling	HMA7	MICRO.12202.C1	0.6			-0.4		0.4	0.8		0.5	0.6	0.7	1.3		0.9			
ET-signalling	HMA7	MICRO.14706.C1	1.0		-0.7	-0.6								0.6					
ET-signalling	HMA7	MICRO.14806.C1						0.5						-0.5					
ET-signalling	HMA7	MICRO.4850.C1	-0.5		-0.8											-0.6			
ET-signalling	RTE1	MICRO.6782.C1	0.5						_										
ET-signalling	RTE1	MICRO.8614.C1	1						0.8	-0.7			0.5	1.0				_	
ET-synthesis	ACO	BPLI16E1TH	1		2.6	1.2	1.9					1.6				1.8		1.7	
ET-synthesis	ACO	MICRO.2939.C2			1.5			1.8		1.0	1.1	2.1	0.9		0.7	1.0		1.5	5 1.0
ET-synthesis	ACO	MICRO.2939.C3	1.6		1.1			1.2		0.8		1.2			1.2				

nadaljevanje priloge F: Vrednosti izražanja krompirjevih genov iz modela
			Nah	nG-Désir	ée spo	odnii	'Dési	rée' sr	odnii		'Désir	ée' sistems	ski	
Model	Kratko ime	POCI identifikator	1	3 4	5	7	1 3	4	5 7	1 3	4	5 7	8 9	11
ET-synthesis	ACO	MICRO.3410.C1	0.6					-0.5	-0.5			-0.7		
ET-synthesis	ACO	MICRO.3410.C3	0.7	-0.9 -0.9	9			-0.7	-0.7			-0.8		
ET-synthesis	ACO	MICRO.5523.C1		-0.3	3 -0.5			0.3			0.4			_
ET-synthesis	ACO	MICRO.5523.C2		1.9)			-1.1	1.1		1	.4	1.7	
ET-synthesis	ACO	MICRO.5523.C4		-0.4	4 -0.5	0.4		0.4	0.4	0.4	0.4			
ET-synthesis	ACO	MICRO.5523.C5		-0.3	3 -0.2									
ET-synthesis	ACO	MICRO.9560.C1		0.3	_				-0.3	-0.3				
ET-synthesis	ACO	bf_arrayxxx_0008a01.t7m.scf	0.7	1.1			1.4	1.1	1.6		0.9	_	0.7	0.7
ET-synthesis	ACO	cPRO22O1TH				0.8						0	.8	
ET-synthesis	ACO	cSTS11L9TH		0.2				_				_		
ET-synthesis	ACO2	MICRO.2957.C2						1.6			1.5 -	1.8		
ET-synthesis	ACO4	POACS09TV		-0.9			1.2 1.0		1.9 2.0	2.1	-1.0).8	1.8	1.2
ET-synthesis	ACS1	MICRO.10407.C1											-0.5	5 -0.5
ET-synthesis	ACS1	MICRO.11534.C1	-0.2		-0.2									
ET-synthesis	ACS1	MICRO.14004.C1												
ET-synthesis	ACS1	MICRO.9261.C1		0.5 0.6	5								_	
ET-synthesis	ACS1	cPRO6I20TH		0.5	5	0.5			0.4	0.5			0.4	0.5
ET-synthesis	ACS10	MICRO.14004.C2	0.7			_			_					
ET-synthesis	ACS10	MICRO.2206.C1	-0.4			-0.4	-0.5	-0.3	-0.4					
ET-synthesis	ACS10	SSBN003O02u.scf		-0.4	4	-0.4	0.3				-0.4			
ET-synthesis	ACS6	STMJH65TV			-0.4		-0.5	5		-0.4 -0.4	Ļ			
ET-synthesis	SAM3	MICRO.197.C2	1.8									-1.7		
ET-synthesis	SAM3	MICRO.197.C3	0.7			0.6						-0.5		
ET-synthesis	SAM3	MICRO.197.C5												
ET-synthesis	SAM3	MICRO.197.C8	1.6									-1.3		
ET-synthesis	SAM3	MICRO.4281.C1				_						-1.1		
ET-synthesis	SAM3	MICRO.43.C2	-0.6	0.7	0.6	0.9				-0.8	3 -(0.7		0.6
ET-synthesis	SAM3	MICRO.43.C3	-0.8	0.9	0.7	1.2	-0.6	5		-0.8 -1.1	-(0.8		
ET-synthesis	SAM3	POABI58TV										-1.3		
ET-synthesis	SAM1	MICRO.197.C1	1.1									-1.0		
JA-response	CLH1	MICRO.14695.C1								-1.6				
JA-response	CLH1	MICRO.5075.C1		1.0)			1.4			1.3	1.0		
JA-response	CLH1	MICRO.6304.C1		-1.9 -2.4	4									
JA-response	VSP1	MICRO.20.C2							-0.6					0.3
JA-response	VSP1	MICRO.2608.C2	-3.5	-3.0	0						_			
JA-response	VSP1	MICRO.2608.C3	-1.5	-1.4	4							1.4		
JA-response	VSP1	MICRO.9519.C1	-1.2							-0.9)			
JA-response	VSP1	STMCS33TV												
JA-signalling	COI1	MICRO.10738.C1	0.8	-0.4	4				-0.6 -0.5			-0.7		
JA-signalling	COI1	MICRO.10739.C1		_	-0.3				-0.4		-(0.4 -0.5		-0.3
JA-signalling	COI1	MICRO.1332.C1		-0.2	7	-1.0								
JA-signalling	COI1	MICRO.15100.C1	-0.8			-1.1					1.0			
JA-signalling	COI1	MICRO.2496.C1							-0.5					
JA-signalling	COI1	MICRO.2689.C2	1.2						-0.9			-0.7		
JA-signalling	COI1	MICRO.2689.C3	0.9						-0.4					
JA-signalling	COI1	MICRO.7665.C1	0.2					_	-0.3		-(0.3		
JA-signalling	COI1	bf_swstxxxx_0018c09.t3m.scf					-0.4	-0.7	-0.5 -0.5	-0.4 -0.4	-0.5 -0	0.5 -0.5 -0	0.2	
JA-signalling	JAZ1	MICRO.12081.C1		-1.1	_		-1.5	5						
JA-signalling	JAZ3	MICRO.1145.C1		-0.3	5 -0.5			-0.4	-0.6	-0.5	5			
JA-signalling	NINJA	MICRO.10882.C1	-0.3							0.5				
JA-signalling	MYC2	MICRO.12886.C1	-0.4			-0.6		-0.8	0.4					
JA-signalling	MYC2	MICRO.13201.C1	1				-0.4	ŀ		0.6				
JA-signalling	MYC2	MICRO.15471.C1	1	-1.1	1									
JA-signalling	MYC2	MICRO.4176.C1												

			Nal	hG-Dés	irée spo	dnji		'Désir	ée' st	oodnji			'Dés	irée' s	sister	nski		
Model	Kratko ime	POCI identifikator	1	3	4 5	7	1	3	4	5 7	1	3	4	5	7	8	9	11
JA-signalling	MYC2	MICRO.5095.C1		-]	1.7	-0.9												
JA-signalling	MYC2	MICRO.5830.C1			-0.7					-0.6								
JA-signalling	MYC2	MICRO.7701.C1		-0.8	-0.8									0.5				
JA-signalling	MYC2	MICRO.7701.C2	0.4	-0.6														
JA-synthesis	ACX1	MICRO.13354.C2	1.2			1.0												
JA-synthesis	ACX1	MICRO.2644.C1	0.6				0.6	0.5		0.7 0.6	0.6						0.5	0.5
JA-synthesis	ACX1	MICRO.2644.C2	0.5				0.3	0.3		0.6 0.3						-0.4	0.3	
JA-synthesis	ACX1	MICRO.3466.C1	1.6															
JA-synthesis	ACX2	MICRO.13144.C1		_														
JA-synthesis	ACX2	bf_ivrootxx_0044c02.t3m.scf	2.0															
JA-synthesis	ACX3	MICRO.7247.C1	0.6															
JA-synthesis	ACX3	bf_arrayxxx_0105b11.t7m.scf																
JA-synthesis	ACX4	MICRO.11594.C1																
JA-synthesis	ACX4	MICRO.15355.C1	2.0															
JA-synthesis	ACX4	MICRO.15355.C2	1.4															
JA-synthesis	ACX4	MICRO.9171.C2																
JA-synthesis	ACX4	bf_ivrootxx_0060c10.t3m.scf																
JA-synthesis	AIM1	BF_LBCHXXXX_0037A12_T3	0.8															
JA-synthesis	AIM1	MICRO.1249.C1	1.5															
JA-synthesis	AIM1	MICRO.15511.C1	1.7			0.7												
JA-synthesis	AIM1	MICRO.2170.C4		1	.2 0.7	1.2					-0.6							
JA-synthesis	AIM1	MICRO.3257.C1		_			-0.7	7 -0.5		-0.6								-0.6
JA-synthesis	AIM1	MICRO.4182.C2	1.5			0.8												
JA-synthesis	AIM1	PotatoF1396.scf																
JA-synthesis	AOC1	MICRO.2858.C2									-1.1			-1.0				
JA-synthesis	AOS	MICRO.3444.C1							1.9				1.3					
JA-synthesis	AOS	MICRO.5467.C1																
JA-synthesis	AOS	MICRO.6673.C1																
JA-synthesis	AOS	MICRO.7664.C1				0.5										0.5		
JA-synthesis	AOS	bf_swstxxxx_016a01.t3m.scf	-0.4	L .		0.4										0.4		
JA-synthesis	OPCL1	MICRO.10309.C2		_														
JA-synthesis	OPCL1	MICRO.10309.C4	-0.7	7	0.7							-0.6						
JA-synthesis	OPCL1	MICRO.10347.C1		-2	2.0			-1.3		-2.3 -1.8		-1.1		-2.1	-1.2			
JA-synthesis	OPCL1	MICRO.10394.C2		_		0.8	-0.8	3			-0.9							
JA-synthesis	OPCL1	MICRO.10546.C1		1	.8	2.1				1.3	1.9							
JA-synthesis	OPCL1	MICRO.1094.C1		_				-0.3						0.2				
JA-synthesis	OPCL1	MICRO.1094.C2	0.7			0.5			0.5									
JA-synthesis	OPCL1	MICRO.1094.C3								0.5								
JA-synthesis	OPCL1	MICRO.182.C4					0.9	0.8		1.2	0.7							
JA-synthesis	OPCL1	MICRO.182.C5					1.2	1.2		1.6	1.1							
JA-synthesis	OPCL1	MICRO.2834.C1				1.2				-1.3	-1.3		-1.0	-1.3				
JA-synthesis	OPCL1	MICRO.4358.C3		-1.3							1.0							
JA-synthesis	OPCL1	MICRO.988.C1	-1.0)							-0.6			-0.6	0.6			
JA-synthesis	JAR1	BPLI5H17TH		_		-0.7					0.6			0.7				
JA-synthesis	JAR1	MICRO.10523.C1	0.8		-0.9							1.0						
JA-synthesis	JAR1	MICRO.14827.C1	0.8		_				-0.8				-0.9					
JA-synthesis	JAR1	MICRO.4627.C1		-1	1.7					-1.0 -1.0				-1.0				
JA-synthesis	JAR1	MICRO.6200.C2				-0.5			-0.5					0.5				
JA-synthesis	JAR1	MICRO.6200.C4					0.6			1.0	0.6		-0.7	0.6				
JA-synthesis	JAR1	MICRO.8840.C1	1.3							_								
JA-synthesis	JAR1	POABW47TP	1.7		-0.7					-0.6			-1.1		-0.6			
JA-synthesis	JMT	MICRO.11489.C1		-().3			-0.3					0.3		0.4			
JA-synthesis	JMT	MICRO.17916.C1	0.6	L _						-0.6								
JA-synthesis	JMT	MICRO.2361.C1		-().3 -0.5				0.4			0.3		0.3	0.3			

Model Kratko inc. POCI Identificator 1 3 4 5 7 1 3 <				NahG	-Désiré	e spo	dnji	'E) ésirée	spod	nji			'Dés	irée'	sistemsk	i	
Anymbasi JAT MCR0 448 C1 JA JANA JA JANA <th>Model</th> <th>Kratko ime</th> <th>POCI identifikator</th> <th>1</th> <th>34</th> <th>5</th> <th>7</th> <th>1</th> <th>3 4</th> <th>4 5</th> <th>7</th> <th>1</th> <th>3</th> <th>4</th> <th>5</th> <th>78</th> <th>9</th> <th>11</th>	Model	Kratko ime	POCI identifikator	1	34	5	7	1	3 4	4 5	7	1	3	4	5	78	9	11
ja.synthesis JAT M(RC0.487.C1) 9 1.3 1.3 1.4 <td>JA-synthesis</td> <td>JMT</td> <td>MICRO.3438.C1</td> <td></td>	JA-synthesis	JMT	MICRO.3438.C1															
jA-symbolies NT MICRO 4827 C1 N <t< td=""><td>JA-synthesis</td><td>JMT</td><td>MICRO.4827.C1</td><td>-1</td><td>.9 -1.8</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></t<>	JA-synthesis	JMT	MICRO.4827.C1	-1	.9 -1.8													
jacymbesis KAT1 MICRO.238.C1 NICRO.237.C1 NICRO.237.C	JA-synthesis	JMT	MICRO.4827.C2		-2.2		-1.7											
A-synthesis KAT1 MICRO.3257C1 I	JA-synthesis	KAT1	MICRO.288.C1			0.8	1.9											
jacymbesis KAT1 MICRO 413.C1 04	JA-synthesis	KAT1	MICRO.3267.C1															
A.synthesis KAT1 MICRO.413.C2 0.4 0.5 0.5 0.4 0.5 </td <td>JA-synthesis</td> <td>KAT1</td> <td>MICRO.413.C1</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td>0.5</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td>-0.7</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td>	JA-synthesis	KAT1	MICRO.413.C1				0.5					-0.7						
A-symbolis KATS MICRO 1280 C1 Image: stand s	JA-synthesis	KAT1	MICRO.413.C2	0.4			0.6	0.5	0.	.4								-0.3
Asynthesi CATS MICRO 288.C3 0 0.6 0.5 0.5 0.5 0.6 0.6 0.4 0.4 As-synthesi LOXI 030105AF esd 0.6 0.7 0.8 0.6 0.0 0.8 0.6 0.0 0.8 0.6 0.0 0.0 <td>JA-synthesis</td> <td>KAT5</td> <td>MICRO.12801.C1</td> <td></td>	JA-synthesis	KAT5	MICRO.12801.C1															
A-synthesis LOXI 03H05AF ead 0.3 0.3 0.0 0.3 0.6 0.5 0.6 </td <td>JA-synthesis</td> <td>KAT5</td> <td>MICRO.288.C3</td> <td></td> <td></td> <td>0.6</td> <td>1.6</td> <td>0.5</td> <td>0.</td> <td>.5</td> <td>0.5</td> <td>0.5</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td>0.4</td> <td>0.4</td>	JA-synthesis	KAT5	MICRO.288.C3			0.6	1.6	0.5	0.	.5	0.5	0.5					0.4	0.4
A-synthesis LOXI MICRO.1178.C1 20 21 25 36 IIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIII	JA-synthesis	LOX1	030H05AF.esd	-0.3		-0.3						0.3						
A-synthesis LOXI MICRO.1173.8.C1 21 25 3.6 Image: Control of the	JA-synthesis	LOX1	133C09AF.esd	0.6		-0.5			0.7	0.8	3		0.6		1.0			
Ayunkesi LOXI MICRO.13176.C1 I	JA-synthesis	LOX1	MICRO.11738.C1	2.9	2.1	2.5	3.6											
A.synthesis LOXI MICRO.14567.C1 0.4 0.4 0.4 0.4 0.4 0.4 JA-synthesis LOXI MICRO.3090.C1 0.4 0.4 0.5 <td< td=""><td>JA-synthesis</td><td>LOX1</td><td>MICRO.13176.C1</td><td>1.1</td><td>1.0</td><td>0.8</td><td>2.0</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></td<>	JA-synthesis	LOX1	MICRO.13176.C1	1.1	1.0	0.8	2.0											
A-synthesis LOX1 MICRO.3090.C1 0.4 0.3 0.3 0.5 JA-synthesis LOX1 MICRO.3090.C2 0.3 0.3 0.3 0.5 JA-synthesis LOX1 MICRO.3663.C1 0.3 0.3 0.3 0.3 0.3 0.5 JA-synthesis LOX1 MICRO.6663.C1 0.4 0.5 0.5 0.2 JA-synthesis LOX1 MICRO.6663.C1 0.4 0.5 0.5 0.2 JA-synthesis LOX1 MICRO.6663.C1 0.4 0.5 0.2 0.2 JA-synthesis LOX1 MICRO.6748.C1 0.4 0.2 0.4 0.2 0.5 0.5 JA-synthesis LOX1 STBM001N15u.sef 0.4 0.2 0.4 0.5 0.5 0.5 JA-synthesis LOX1 STBM001N15u.sef 1.4 0.8 0.8 1.3 1.3 0.7 0.7 JA-synthesis LOX2 MICRO.6363.C8 0.4 0.8 1.3 1.3 1.4 0.7 0.4 0.6 0.7 0.7 0.7 0.7 <td>JA-synthesis</td> <td>LOX1</td> <td>MICRO.14567.C1</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td>0.4</td> <td>0.4</td> <td></td> <td>0.4</td> <td></td> <td></td> <td></td>	JA-synthesis	LOX1	MICRO.14567.C1									0.4	0.4		0.4			
A-synthesis LOXI MICRO 3090 C2 I <tdi< td=""><td>JA-synthesis</td><td>LOX1</td><td>MICRO.3090.C1</td><td>0.4</td><td></td><td></td><td>0.3</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tdi<>	JA-synthesis	LOX1	MICRO.3090.C1	0.4			0.3											
A-synthesis LOX1 MICR0.6663.C1 0.3 0.3 0.3 0.3 0.3 0.2 0.2 A-synthesis LOX1 MICR0.6663.C1 0.4 0.4 0.3 0.3 0.3 0.3 0.3 0.3 0.3 0.2 0.2 0.2 0.2 0.2 0.2 0.2 0.2 0.2 0.1 0.2 0	JA-synthesis	LOX1	MICRO.3090.C2									-0.5						
A-synthesis LOXI MICRO.6663.C1 IIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIII	JA-synthesis	LOX1	MICRO.4514.C1							-2.2	2							
A-synthesis LOX1 MICRO.6663.C6 -0.4 -0.4 -0.5 -0.2 - -0.9 -0.4 -0.5 -0.9 -0.4 -0.5 -0.2 - -0.9 -0.4 -0.5 -0.2 - -0.9 -0.4 -0.5 -0.9 -0.4 -0.5 -0.9 -0.4 -0.5 -0.9 -0.4 -0.5 -0.9 -0.4 -0.5 -0.9 -0.4 -0.5 -0.9 -0.9 -0.4 -0.5 -0.9 -0.7 -0.8 -0.3 -0.7 -0.8 -0.3 -0.7 <td>JA-synthesis</td> <td>LOX1</td> <td>MICRO 6663 C1</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td>0.3 0.</td> <td>.3 0.3</td> <td>5</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td>-0.2</td>	JA-synthesis	LOX1	MICRO 6663 C1						0.3 0.	.3 0.3	5							-0.2
A-synthesis LOXI MICRO.6663.C9 0.4 0	JA-synthesis	LOX1	MICRO.6663.C6															
A-synthesis LOX1 MICRO.6748.C1 I	JA-synthesis	LOX1	MICRO.6663.C9	-0.4	-0.4	-0.5												
A-synthesis LOX1 MICRO.9093 C1 I	JA-synthesis	LOX1	MICRO.6748.C1							-1.	1 -1.2							
JA-synthesis LOXI POCC186TV 0.2<	JA-synthesis	LOX1	MICRO 9093 C1		1.3													
A-synthesis IOXI SSBN001N15u.sef IOZ IOZ JA-synthesis IOXI STDB004012u.sef IOZ IOZ IOZ JA-synthesis IOXI STDM01N15u.sef IOZ IOZ IOZ JA-synthesis IOXI STMM123TH IOZ IOZ IOZ IOZ JA-synthesis IOXI MICRO.6663.C8 IOZ IOZ IOZ IOZ IOZ JA-synthesis IOX3 bf Ibbaxxx_0055e04.13m.sef IOZ I	IA-synthesis	LOXI	POCCI86TV															-0.9
A-synthesis LOX1 STDB0004012u sef IIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIII	IA-synthesis	LOXI	SSBN001N15u scf		-0.2									-0.2				
A-synthesis LOX1 STMMU23TH I <td>IA-synthesis</td> <td>LOXI</td> <td>STDB004O12u sef</td> <td></td>	IA-synthesis	LOXI	STDB004O12u sef															
A-synthesis LOXI bf.synthesix Diametric 11 12 0.8 1.3 2.1 0.7 JA-synthesis LOX2 MICRO.4514.C2 1.1 0.8 1.3 2.1 0.7 JA-synthesis LOX3 bf_lochxxxx_0055064.G3m.sef -1.2 -1.2 -1.2 -1.0 -1.2 -1.0 -1.2 -1.0 -1.0 -1.2 -1.0 -1.2 -1.1 -0.7 0.5 -1.2 -1.0 -1.0 -1.2 -1.0 -1.0 -1.2 -1.0 -1.0 -1.2 -1.0 -1.0 -1.2 -1.0 -1.0 -1.2 -1.0 -1.0 -1.2 -1.0 -1.0 -1.2 -1.0 <t< td=""><td>IA-synthesis</td><td>LOXI</td><td>STMMH23TH</td><td></td><td></td><td></td><td>1.0</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></t<>	IA-synthesis	LOXI	STMMH23TH				1.0											
A-synthesis LOX2 MICRO.4514.C2 1.1 0.8 1.3 2.1 0.7 0.5 JA-synthesis LOX3 bf_lbchxxx_0055604.G8 -0.7 0.5 -1.2 -1.2 -1.2 -1.2 -1.2 -1.2 -1.1 -1.2 -1	IA-synthesis	LOXI	bf swstxxxx 0059h06 t3m sef	1.4			1.2											
IA-synthesis LOX2 MICRO.0663.CS IA-synthesis LOX3 bf lbchxxxx_0055c04.t3m.scf IA-synthesis IA-synthesis IA-synthesis IA-synthesis IA-synthesis OPR3 MICRO.10473.C1 IA-synthesis IA-synthesis OPR3 MICRO.10473.C2 IA-synthesis OPR3 MICRO.10473.C2 IA-synthesis OPR3 MICRO.3494.C2 IA-synthesis OPR3 MICRO.4800.C2 IA-synthesis IA-synthesis OPR3 MICRO.4800.C2 IA-synthesis IA-synthesis IA-synthesis IA-synthesis IA-synthesis IA-synthesis IA-synthesis IA-synthesis	JA-synthesis	LOX2	MICRO 4514 C2	-1.1					0.8 1.	.3		2.1						0.7
IA-synthesis LOX3 bf Lobkxxx_0055e04.t3m.scf IA-synthesis LOX4 POACX78TP III III IIII IIII IIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIII	IA-synthesis	LOX2	MICRO 6663 C8		-0.7		0.5											
IA-synthesis LOXA POACX78TP III III IIII IIII IIIII IIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIII	IA-synthesis	LOX3	hf lbchxxxx 0055e04 t3m scf						-1	.2								
A-synthesis OPR3 MICR0.10473.C1 2.1 0.8 -1.3 -1.3 -1.0 -1.2 -1.1 JA-synthesis OPR3 MICR0.10473.C2 -10 -2.3 0.9 -1.2 -1.2 -1.1<	JA-synthesis	LOX4	POACX78TP		1.3													-0.7
A-synthesis OPR3 MICRO.10473.C2 -10 -2.3 -0.9 -1.2 -1.1 JA-synthesis OPR3 MICRO.10473.C2 -10 -2.3 -0.9 -1.2 -1.1 JA-synthesis OPR3 MICRO.4800.C2 -0.4 -0.6 -0.4 0.6 JA-synthesis OPR3 MICRO.4800.C3 0.7 -0.4 -0.6 -0.4 0.5 JA-synthesis OPR3 MICRO.4800.C5 1.1 -0.4 -0.6 -0.4 0.5 JA-synthesis OPR3 MICRO.4800.C5 1.1 -0.4 -0.6 -0.7 -0.4 0.5 JA-synthesis OPR3 MICRO.12818.C1 -0.7 -0.6 -0.7	IA-synthesis	OPR3	MICRO 10473 C1		-2.1	-0.8				-1.3	3 -1.3				-1.0	-1.2		
Ar-synthesis OPR3 MICRO.3494.C2 IIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIII	IA-synthesis	OPR3	MICRO 10473 C2	-1.0	-2.3		-0.9			-1.3	2 -1.2				-1.1			
IA-synthesis OPR3 MICRO.4800.C2 0.9 15 JA-synthesis OPR3 MICRO.4800.C3 0.7 0.4 -0.6 0.5 JA-synthesis OPR3 MICRO.4800.C5 1.1 0.4 -0.6 0.5 JA-synthesis OPR3 MICRO.4800.C5 1.1 1.0 0.2 0.2 JA-synthesis OPR3 MICRO.4800.C5 1.1 0.9 0.8 0.7 JA-synthesis OPR3 MICRO.4800.C5 1.1 0.7 0.0 0.9 0.8 0.7 JA-synthesis OPR3 MICRO.12818.C1 -0.7 1.0 0.9 0.8 0.7 MAP kinaze MEK MICRO.2214.C1 -0.7 -0.7 -0.7 -0.7 -0.7 -0.7 -0.7 -0.7 -0.7 -0.7 -0.4 -0.4 -0.4 -0.7	IA-synthesis	OPR3	MICRO 3494 C2														0.5	
IA-synthesis OPR3 MICRO.4800.C3 0.7 -0.4 -0.6 -0.4 0.5 JA-synthesis OPR3 MICRO.4800.C4 2.7 2.1 -0.4 0.6 -0.4 0.5 JA-synthesis OPR3 MICRO.4800.C5 1.1 -0.7 1.0 0.9 0.8 0.7 JA-synthesis OPR3 MICRO.8474.C1 -0.7 1.0 0.9 0.8 0.7 JA-synthesis OPR3 MICRO.12818.C1 -0.7 1.0 0.9 0.8 0.7 MAP kinaze MEK MICRO.12818.C1 -0.7 0.0 0.3 0.3 0.4 0.7 MAP kinaze MEK MICRO.2214.C1 -0.4 0.4 0.3 0.3 0.4 0.3 0.3 0.4 0.4 0.3 0.4 0.3 0.4 0.3 0.4 0.4 0.5 0.4 0.4 0.5 0.4 0.4 0.5 0.4 0.5 0.4 0.5 0.4 0.5 0.4 0.5 0.4 0.5 0.5 0.4 0.5 0.4 0.5 0.5 <td>IA-synthesis</td> <td>OPR3</td> <td>MICRO 4800 C2</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td>0.9</td> <td></td> <td></td> <td>1.5</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td>	IA-synthesis	OPR3	MICRO 4800 C2						0.9			1.5						
Arsynthesis OPR3 MICRO.4000.C3 2.7 2.1 JA-synthesis OPR3 MICRO.4800.C4 2.7 2.1 JA-synthesis OPR3 MICRO.4800.C5 1.1 0.2 JA-synthesis OPR3 MICRO.373.C1 0.2 0.2 MAP kinaze MEK MICRO.12818.C1 -0.7 1.0 0.9 0.8 0.7 MAP kinaze MEK MICRO.214487.C2 0.6 0.5 -0.6 -0.7 <	IA-synthesis	OPR3	MICRO 4800 C3	0.7					-0.4		-0.6					-0.4		0.5
Ar Synthesis OPR3 MICRO.1000.12 (1) III III III III IIII IIII IIII IIIII IIIII IIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIII	IA-synthesis	OPR3	MICRO 4800 C4	2.7			2.1											
Ar Synthesis OPR3 MICRO.8074.C1 Image: Constraint of the const	IA-synthesis	OPR3	MICRO 4800 C5	1.1						1.0)							
IA-synthesis OPR3 MICRO.9373.C1 -0.7 1.0 0.9 0.8 0.7 MAP kinaze MEK MICRO.12818.C1 -0.7 1.0 0.9 0.8 0.7 MAP kinaze MEK MICRO.214487.C2 0.6 0.5 -0.6 -0.7 -0.7 -0.7 MAP kinaze MEK MICRO.2214.C1 0.5 -0.6 -0.7 <td>IA-synthesis</td> <td>OPR3</td> <td>MICRO 8474 C1</td> <td></td> <td>0.2</td> <td></td> <td></td> <td></td>	IA-synthesis	OPR3	MICRO 8474 C1												0.2			
MAP kinaze MEK MICRO.12818.C1 -0.7 1.0 0.9 0.8 0.7 MAP kinaze MEK MICRO.12818.C1 0.6 0.5 -0.6 -0.7 -0.7 MAP kinaze MEK MICRO.2214.C1 0.3 0.3 0.3 0.4 -0.7 MAP kinaze MEK MICRO.6723.C1 0.5 -0.4 -0.4 0.3 0.3 0.4 MAP kinaze MEK MICRO.5816.C1 -0.4 0.4 -0.5 -0.4 -0.5 -0.5 -0.5 -0.5 -0.5 -0.5 -0.5 -0.5 -0.5 -0.5 -0.5 -0.5 -0	IA-synthesis	OPR3	MICRO 9373 C1															
MAP kinaze MEK MICRO.14487.C2 0.6 0.5 -0.6 0.7 MAP kinaze MEK MICRO.2214.C1 0.5 0.3 0.3 0.4 MAP kinaze MEK MICRO.6723.C1 0.5 0.4 0.4 0.4 0.4 0.4 0.4 0.4 0.4 0.4 0.4 0.5 0.4 0.3 0.3 0.4 MAP kinaze MEK MICRO.5816.C1 -0.4 0.4 0.4 0.4 -0.4 -0.4 0.3 0.3 0.4 MAP kinaze MEKK MICRO.8860.C1 -0.4 0.5 -0.8 -0.5 0.5 0.4 0.6 0.5 0.4 0.6 0.5 0.4 0.6 0.5 0.4 0.6 0.5 0.4 0.6 0.5 0.4 0.6 0.5 0.4 0.6 0.5 0.4 0.6 0.5 0.4 0.6 0.5 0.4 0.6 0.5 0.4 0.6 0.5 0.4 0.6 0.5 0.4 0.6 0.5 0.4 0.6 0.5 0.4 0.5 0.	MAP kinaze	MEK	MICRO 12818 C1			-0.7					1.0		0.9		0.8		0.7	,
MAP kinaze MEK MICRO.2214.C1 0.5 0.3 0.3 0.4 MAP kinaze MEK MICRO.6723.C1 0.5 0.4 0.4 0.4 0.4 0.4 0.4 0.4 0.4 0.4 0.5 0.4 0.3 0.4 0.3 0.4 MAP kinaze MEKK MICRO.6341.C1 -0.4 0.5 -0.4 0.6 0.5 0.4 0.5 -0.4 0.3 -0.4 -0.4 0.3 -0.4 -0.4 0.3 -0.4 -0.4 0.5 -0.4 0.5 -0.4 -0.4 -0.4 -0.4 -0.4 -0.4 -0.4 -0.4 -0.4 -0.4 -0.4 -0.4 -0.4 -0.4 -0.4 -0.4 -0.4 -0.4 -0.4 -0.5 -0.4 -0.5 -0.4 -0.5 -0.5 -0.4 -0.5 -0.5 -0.4 -0.5 -0.5 -0.4 -0.5 -0.5 -0.4 -0.5 -0.5 -0.4 -0.5 -0.5 -0.4 -0.5 -0.5 -0.4 -0.5 -0.5 -0.4 -0.5 -0.5 -0.5	MAP kinaze	MEK	MICRO 14487 C2	0.6			0.5		-0.6				-0.7					
MAP kinaze MEK MICRO.6723.C1 0.5 -0.4 -0.4 0.3 -0.4 MAP kinaze MEKK MICRO.6816.C1 -0.4 0.4 -0.4 0.3 -0.4 MAP kinaze MEKK MICRO.6341.C1 0.5 -0.8 -0.8 -0.4 0.3 -0.4 MAP kinaze MEKK MICRO.8860.C1 -0.5 -0.8 -0.4 0.6 0.5 0.4 -0.5 MAP kinaze MEKK MICRO.9292.C2 0.5 -0.4 0.4 0.6 0.5 0.4 0.6 0.5 0.4 0.6 0.5 0.4 0.5 0.4 0.5 0.4 0.5 0.4 0.5 0.4 0.5 0.4 0.5 0.4 0.5 0.4 0.6 0.5 0.4 0.5 0.4 0.6 0.5 0.4 0.6 0.5 0.4 0.6 0.5 0.4 0.6 0.5 0.4 0.6 0.5 0.4 0.6 0.5 0.4 0.6 0.5 0.4 0.5 0.4 0.5 0.4 0.5 0.5 0.4	MAP kinaze	MEK	MICRO 2214 C1						0.	3 0.3	5			0.3	0.4			
MAP kinaze MEKK MICRO.525.C1 -0.4 0.4 -0.4 -0.4 0.3 -0.4 MAP kinaze MEKK MICRO.6341.C1 0.5 -0.8 -0.8 -0.4 0.3 -0.4 MAP kinaze MEKK MICRO.8860.C1 -0.8 -0.8 -0.4 0.6 0.5 0.4 -0.5 MAP kinaze MEKK MICRO.9292.C2 0.5 -0.4 0.4 0.6 0.5 0.4 0.6 MAP kinaze MEKK MICRO.9292.C2 0.5 -0.4 0.3 0.4 0.6 0.5 0.4 0.6 0.5 0.4 0.6 0.5 0.4 0.6 0.5 0.4 0.6 0.5 0.4 0.6 0.5 0.4 0.6 0.5 0.4 0.6 0.5 0.4 0.6 0.5 0.4 0.6 0.5 0.4 0.6 0.5 0.4 0.6 0.5 0.4 0.6 0.5 0.4 0.6 0.5 0.4 0.6 0.5 0.4 0.6 0.5 0.4 0.5 0.2 0.5 0.4	MAP kinaze	MEK	MICRO 6723 C1		0.5													
MAP kinaze MEKK MICRO.6341.C1 0.5 -0.8 -0.5 MAP kinaze MEKK MICRO.8860.C1 -0.5 0.6 0.5 0.4 MAP kinaze MEKK MICRO.9292.C2 0.5 0.4 0.6 0.5 0.4 0.6 MAP kinaze MEKK MICRO.9292.C2 0.5 0.4 0.6 0.3 0.3 MAP kinaze MEKK POAE084TP 0.4 -0.3 0.3 0.3 MAP kinaze MEKK MICRO.4264.C1 0.3 0.3 0.3 MAP kinaze MKP MICRO.1622.C1 1.3 0.6 0.2 -0.2 MAP kinaze MKP MICRO.1622.C1 1.3 0.6 0.2 -0.2	MAP kinaze	MEKK	MICRO 5816 C1	-0.4	0.4			-0.4				-0.4				0.3	-0.4	1
MAP kinaze MEKK MICRO.8860.C1 -0.8 -0.8 -0.5 MAP kinaze MEKK MICRO.9292.C1 0.5 0.4 0.6 0.5 0.4 0.6 MAP kinaze MEKK MICRO.9292.C2 0.5 0.4 0.6 0.3 0.3 MAP kinaze MEKK POAE084TP 0.4 -0.3 0.3 0.3 0.3 MAP kinaze MEKK MICRO.4264.C1 0.3 -0.2 -0.2 -0.2 MAP kinaze MKP MICRO.1622.C1 1.3 0.6 0.4 -0.2	MAP kinaze	MEKK	MICRO 6341 C1		0.5													
MAP kinaze MEKK MICRO.9292.C1 0.5 0.6 0.5 0.4 MAP kinaze MEKK MICRO.9292.C2 0.5 0.4 0.6 0.5 MAP kinaze MEKK POAE084TP 0.4 -0.3 0.3 MAP kinaze MEKK bf_ivrootxx_0018c07.t3m.scf 0.3 0.3 MAP kinaze MEKK MICRO.4264.C1 0.3 -0.2 -0.2 MAP kinaze MKP MICRO.1622.C1 1.3 0.6 0.4 -0.2	MAP kinaze	MEKK	MICRO 8860 C1						-0.8									-0.5
MAP kinaze MEKK MICRO.9292.C2 0.5 0.4 0.6 MAP kinaze MEKK POAE084TP 0.4 -0.3 0.3 MAP kinaze MEKK bf_ivrootxx_0018c07.t3m.scf 0.3 0.3 MAP kinaze MEKK MICRO.4264.C1 0.3 -0.2 -0.2 MAP kinaze MKP MICRO.1622.C1 1.3 0.6 -0.2 -0.2	MAP kinaze	MEKK	MICRO 9292 C1							0.6	0.5		0.5		0.4			
MAP kinaze MEKK POAE084TP 0.4 -0.3 0.3 MAP kinaze MEKK bf_ivrootx_0018c07.t3m.scf 0.3 0.3 0.3 MAP kinaze MEKK MICRO.4264.C1 0.3 -0.2 -0.2 -0.2 MAP kinaze MKP MICRO.1622.C1 1.3 0.6 -0.2 -0.2	MAP kinaze	MEKK	MICRO 9292 C2	0.5						0.0			0.4		0.6			
MAP kinaze MEKK bf_ivrootxx_0018c07.t3m.scf 0.3 0.3 MAP kinaze MEKK MICRO.4264.C1 0.3 -0.2 -0.2 -0.2 MAP kinaze MKP MICRO.1622.C1 1.3 0.6 -0.2 -0.2	MAP kinaze	MEKK	POAF084TP	0.4		-0.3							0.3					
MAP kinaze MEKK MICRO.4264.C1 0.3 -0.2 -0.2 MAP kinaze MKP MICRO.1622.C1 1.3 0.6 -0.2 -0.2	MAP kinaze	MEKK	hf ivrootxx 0018c07 t3m cof	0.3									0.3					
MAP kinaze MKP MICRO.1622.C1 1.3 0.6 MAP kinaze MK1 MICRO.2875.C1 1.4 -0.8	MAP kinaze	MEKK	MICRO 4264 C1	0.3					-0.2 -0	.2			-0.2					
MAP kinaze MPK1 MICRO 2875 C1 1.4 -0.8	MAP kinaze	MKP	MICRO 1622 C1		1.3	0.6			5									
	MAP kinaze	MPK 1	MICRO 2875 C1	1.4		-0.8												

			Nah	nG-De	ésiré	e spo	dnji	1	Désir	ée' sr	odnji				'Dés	irée' s	sister	nski		
Model	Kratko ime	POCI identifikator	1	3	4	5	7	1	3	4	5	7	1	3	4	5	7	8	9	11
MAP kinaze	MKP1	MICRO.2875.C2	1.3			-0.7											-0.7			
MAP kinaze	MPK1	MICRO.3797.C2	1.2			-0.6	0.7								-0.5	-0.5	-0.8			0.5
MAP kinaze	MPK1	MICRO.3797.C3																		
MAP kinaze	MKP1	MICRO.4979.C1			0.3										0.2					
MAP kinaze	MPK1	MICRO.4979.C2		0.9	1.4					0.9					1.3		1.0			
MAP kinaze	MPK1	MICRO.5536.C1					0.9													
MAP kinaze	MKP1	MICRO.633.C4	1.8		1.9		1.8			0.6				0.6		0.8			1.0	
MAP kinaze	MKP1	MICRO.6672.C1				0.2	-0.3													
MAP kinaze	MPK1	MICRO.6672.C2	0.4	-0.3		-0.3	0.3		-0.4			-0.4					-0.5			
MAP kinaze	MPK1	MICRO.7088.C2		0.2	-0.2	-0.2			0.2	0.2			0.4			0.2				
MAP kinaze	MPK3	MICRO.11816.C1							0.5											
MAP kinaze	MPK3	MICRO.2352.C1																		
MAP kinaze	MPK4	MICRO.3223.C2								-0.6		-0.6		0.5	-0.5					
PPi	ETO	MICRO.5152.C1				-0.3		0.8	0.3	0.3			0.5	0.5						
PPi	ETO	MICRO.6603.C1	0.8					0.6									-0.8			
PPi	ETO	MICRO.6687.C1															-0.5			
PPi	ETO	cPRO6O17TH	1.3			-0.4								0.4						
PPi	HRT	MICRO.2998.C1	-0.5		-0.4					0.5				0.6	0.4					
PPi	HRT	bf acdaxxxx 0061f05.t3m.scf												0.3						
PPi	ABI1	MICRO.10679.C2								-0.5		-0.5	-0.6		-0.9		-0.5			-1.0
PPi	ABI1	MICRO.16173.C1									1.0					1.2				-0.8
PPi	ABI1	MICRO.3489.C1																		-1.4
PPi	ABI1	MICRO.905.C1	-0.7												-0.6		-0.7			-1.1
PPi	ABI1	bf acdaxxxx 0058e12.t3m.scf								-1.5							-2.2			-3.0
PPi	ABI5	 MICRO.11882.C1			-0.6	-0.9						-0.6			-0.9			-0.7		-1.1
PPi	ABI5	MICRO.14477.C1											0.6							
PPi	ABI5	MICRO 14478 C1	-0.2										-0.3						-0.2	-0.3
PPi	AG	MICRO.1027.C1																		
PPi	AG	MICRO.1027.C2													0.5					
PPi	AG	MICRO.15935.C1																		
PPi	AG	MICRO.9368.C1			-0.4	-0.6				0.4										
PPi	AGD12	MICRO 5854 C1	0.6					0.6	0.4		0.6									
PPi	AHK2	MICRO 15394 C1				-0.3														
PPi	AHK2	MICRO.15958.C1		0.4			-0.3	-0.3	-0.3	-0.3	-0.4		-0.4	-0.3						
PPi	AHK2	MICRO.8157.C1			0.4		-0.3	0.6	0.4		0.7	0.6	0.6		-0.4			-0.4	0.5	0.6
PPi	AHK2	MICRO.8367.C1							1.1					1.3						
PPi	AHK2	MICRO.9450.C1		-0.5	0.6			0.8	1.1		1.4	0.9			-1.0				0.8	
PPi	AHK2	bf arrayxxx 0037g12.t7m.scf				-1.2													-1.1	
PPi	AHP1	MICRO.10581.C1																		
PPi	AHP1	MICRO.10581.C2	0.3				0.2										-0.3			
PPi	AHP1	MICRO.12517.C1																		-1.5
PPi	AHP1	MICRO.2149.C1	1.3			-0.9		1.0								0.9				
PPi	AP2C1	MICRO.16420.C1			1.4											0.7				
PPi	AP2C1	MICRO.16420.C2			1.3											0.8				
PPi	ASK11	MICRO.1579.C1	0.6																	
PPi	ASK11	MICRO.1879.C1	0.7						0.6							0.7				
PPi	ASK11	MICRO.1879.C2	0.4																	
PPi	ASK11	MICRO.3400.C1	1.2			-0.6											-0.9			
PPi	ASK11	MICRO.3400.C3						0.7	0.5				0.7	0.6		0.9				
PPi	ASK11	bf mxflxxxx 0017e05 t3m sef	1			-0.3														
PPi	ASK11	bf swstxxxx 0063g06 t3m sef	0.6																	
PPi	ASK2	MICRO.10233.C1									-0.5			-0.5						
PPi	ASK2	MICRO.1512.C1	1					0.4	0.3		0.4	0.2			-0.4	0.3	-0.2			
PPi	ASK2	MICRO.15339.C1	1		0.5			-0.4	-0.7											-0.3

			NahG	-Désiré	e spodnji	'Ľ) ésirée'	spodnji			'Dési	rée' sis	temski		
Model	Kratko ime	POCI identifikator	1	3 4	5 7	1	3 4	5 7	1	3	4	5 7	8	9	11
PPi	ASK2	MICRO.15719.C1	1.0					-0.6 -0.5				-0.	.9		
PPi	ASK2	POAEF39TP							0.3			0.3			
PPi	ASK2	bf_mxlfxxxx_0044b12.t3m.scf	0.8		-0.4	0.8	0.5 0.	8 0.5		0.7		0.6			
PPi	ASK2	SSBT004C15x.scf	-0.7			1.7	1.5 0.	6 1.9 1.4	1.0			1.1		1.2	1.0
PPi	JAM2	MICRO.14852.C1	-0.6		-0.5		-0	.4							
PPi	BOP2	POCA468TV													
PPi	BOP2	STDB003F02u.scf		0.4	0.6						0.6	0.4			0.5
PPi	BRL1	MICRO.15044.C1	0.8 -0	.4	0.5										
PPi	BRL1	MICRO.17014.C1						0.6							
PPi	BRL1	MICRO.2574.C2	0.6	0.7	0.8										
PPi	BRL1	MICRO.3498.C1	-0	.5			-0	.4			-0.5		-0.3		-0.4
PPi	BRL1	MICRO.7303.C1			-0.5		-0	.5	-0.5			-0.6 0.	7		
PPi	BRL1	bf_mxlfxxxx_0058b07.t3m.scf				-0.3									-0.4
PPi	CCH	MICRO.5732.C1	1.4						1.1						
PPi	ССН	MICRO.5732.C3	2.1												
PPi	CHY1	BPLI12G7TH			0.4	-0.3									
PPi	CHY1	MICRO.216.C1	0.8		0.3			-0.3	-0.3						
PPi	CHY1	MICRO.422.C1			0.4				-0.3						
PPi	CHY1	MICRO.422.C3	0.5		0.8										
PPi	CHY1	MICRO.5219.C2				0.5	0.3		0.5	0.3		0.3 0.	2		
PPi	CHY1	MICRO.5781.C1													
PPi	CHY1	STMHL83TV	-0.7		0.5				0.5						
PPi	CHY1	bf_mxflxxxx_0012f09.t3m.scf	0.5												
PPi	CO	MICRO.13353.C2			-0.2	0.2	0.	3 0.4 0.4	0.5	0.3	-0.2			0.2	0.2
PPi	CO	MICRO.13353.C3		-1.2											
PPi	CO	MICRO.14568.C1		-0.9		1.5			0.8		0.9	0.8	_		1.1
PPi	CO	MICRO.7217.C1		-0.8	-0.6	-0.8	-0.4 -1	.3 -0.8 -0.9	-0.8	-1.1	-0.8	-1.0 -1	3	-0.6	
PPi	CO	STMHT65TV	-1.5 -1	.4 -3.2	-1.5 -1.2	-1.4 -	-1.1 -1	.9 -1.0 -1.9		-1.2	-1.0	-1.6 -2.	0	-1.8	
PPi	COP13	MICRO.4906.C1	0.9									-0.	4		
PPi	COP8	MICRO.9576.C1	1.3		0.7	0.5						-0.	4		
PPi	COP8	bf_mxlfxxxx_0073g04.t3m.scf	1.3		0.6					-0.5					
PPi	COP9	MICRO.6141.C2				0.3	0.	4 0.3 0.3			0.2	0.3			
PPi	CRT1	MICRO.3542.C1				-1.2									
PPi	CRT1	MICRO.3542.C2	_					-0.7							
PPi	CRT1	MICRO.410.C5	0	.7	1.0 1.5		-0.8								
PPi	CRT1	MICRO.668.C2			1.1 1.2		_	_						0.7	
PPi	CRT1	bf_arrayxxx_0046b03.t7m.scf					0.	5							
PPi	CRT1	bf_lbchxxxx_0057g07.t3m.scf		-0.4	-0.4		0.	4							
PPi	CRT1	cSTS11H5TH			-0.3										
PPi	CSN5	MICRO.2238.C1	0.3		-0.6							-0.	3		
PPi	CSN5	bf_ivrootxx_0055d09.t3m.scf	0.8	_		0.5						-1.	1 -0.5		
PPi	CUL1	MICRO.17717.C1	-0	.5								_	_		
PPi	CUL1	MICRO.2007.C5	-0.5 0	.3			-0.3					0.	3		
PPi	CUL1	MICRO.2007.C6	0.5					-0.4				-0.	6		
PPi	CUL1	MICRO.5100.C1	-0.4	0.4		0.5	0.4 0.	4 0.7 0.4	0.4	0.3		0.3			0.3
PPi	CUL1	MICRO.5100.C2										-0.	2		
PPi	CUL1	MICRO.5100.C4	0.4		-0.3	0.3			0.3			-0.	3		
PPi	CUL1	MICRO.6981.C1				0.4				0.6		0.6			-0.4
PPi	CUL1	MICRO.6981.C2	0.8			0.5						-0.	5		
PPi	CUL1	MICRO.7047.C1						0.5		0.5					
PPi	CUL1	MICRO.8207.C1				-0.5	-0	.3 -0.5					_		
PPi	CUL1	STMEU32TV			-0.3							0.	5		
PPi	CUL1	bf_arrayxxx_0066e01.t3m.scf					0.3 0.	2 0.3	0.3			0.3			
PPi	CUL3	MICRO.15377.C1	0.3		-0.2							-0.	2		

			Nah	G-D	ésirée	e spo	dnji		Désir	ée' sj	podnj	i			'Dés	irée' s	isten	ıski		
Model	Kratko ime	POCI identifikator	1	3	4	5	7	1	3	4	5	7	1	3	4	5	7	8	9	11
PPi	CUL3	MICRO.7936.C1	0.5									-0.3			-0.3					
PPi	DGK3	BPLI9G22TH	1.9				0.9													
PPi	DGK3	MICRO.12191.C1						0.6	0.5		0.9		0.5					C).5	
PPi	DGK3	MICRO.12191.C2	0.9									-0.6								
PPi	DGK3	MICRO.280.C1			-0.7						-0.5					-0.6				
PPi	DGK3	MICRO.6600.C1	0.9		0.5		0.8													
PPi	DGK3	POADZ22TP																		
PPi	EIF4E	MICRO.1382.C1					0.5		-0.4					-0.8						
PPi	EIF4E	MICRO.8054.C1																		
PPi	EIF4E	MICRO.9711.C1				0.4	0.5	-0.5				-0.4								
PPi	EIF4E	cSTE22J17TH	-0.3		-0.2	-0.2		0.5	0.6	0.6	0.7	0.4	0.6	0.4	0.3	0.2				
PPi	EIF4E	cSTS15O14TH			0.5	0.5		0.6	0.5		0.9	0.8	0.6				-0.7 -	0.9		
PPi	EML2	MICRO.14404.C2	0.5																	
PPi	EML2	MICRO.1449.C5		-0.3											-0.3					
PPi	EML2	MICRO.7719.C1									0.4	0.4			-0.4					
PPi	EML2	MICRO.8011.C1							-0.7		-0.5	-0.8						-(0.5	
PPi	HDA6	MICRO.10613.C1							0.4		0.4		0.5					C).5	0.4
PPi	HDA6	MICRO.14215.C1						0.3			0.3							C).4	
PPi	HDA6	MICRO.14215.C2																		
PPi	HDA6	MICRO.2434.C1		0.4					-0.4					-0.6	0.3					
PPi	HDA6	MICRO.2528.C1																		
PPi	HDA6	POCB894TP	0.5										0.4							
PPi	HDA6	POCB894TV					0.4													
PPi	ICE2	MICRO 17097 C1								0.8					0.8		0.7			
PPi	ICE2	MICRO 4647 C1											-1.6			-0.9				
PPi	LSm1	MICRO 1626 C1							-0.3	-0.3	-0.3	-0.6	-0.3				-0.3			-0.3
PPi	NCBP	MICRO 13990 C1	1.6											0.9		1.5				
PPi	NDPK2	MICRO 2773 C1																		0.6
PDi	NDPK 2	MICRO 3183 C1																		
PPi	NDPK2	MICRO 527 C1				0.5														
PDi	NDPK 2	MICRO 5832 C1																		
PDi	NE-VA7	MICRO 10695 C1																		-0.9
DD;	NE VA7	MICRO 17207 C1						-0.3		-0.4								-(0.3	-0.6
DD;	NE VA7	MICRO 5954 C1	-0.6	-0.9	-2.0	-1.1	-0.9	-0.8	-0.7	-1.6	-14	-1.5	-0.5		-10	-0.8	-10-	04-0	0.9	-0.6
DDi	OBP1	MICRO 4118 C1											-0.4							
DD;	OBP3	MICRO 7617 C1	0.5		0.4			-0.3	-0.3	-0.5		-0.4	-0.6	-0.4	-0.5					
DD;	DLOS22	MICRO 14827 C1	0.6																	
	PHOS22	MICRO 14837.C1	1.0																	
DD;	PHOS32	MICRO 14937.02	0.3								-03					03				
	PHOS22	MICRO 1991 C1	1.0				0.6				-0.5		-0.4			0.5				
	PHOS32	MICRO 2526 C1	0.6				0.4				0.5		0.1	-0.3			-0.4			
	PHOS32	MICRO 5522 C2	0.0				0.4							-0.5			-0.4	12		
rri	PHOS32	MICKU.3555.C2					0.4		-0.2					-0.2		-0.4		1.2		
PP1	PHO832	PUABX891V			1.2	1.1	0.4		-0.2			1.1		-0.2		-0.4		0.5	0.6	
PP1	PIFI	MICRO.13098.C1			-1.2	-1.1		0.7				-1.1					0.5	0.5 -	0.0	
PP1	PIPI	MICRO.467.C1						0.7				0.5					0.5			
rri pp:	r1P1	MICK0.407.C2						0.0				-0.5					-0.8			
PP1	PIPI	MICRO.467.C4	1.0			0.6		0.7				0.5					-0.7			
PP1	PIPI	MICRO.9628.C1	1.0			-0.6	0.0		0.4		0.7	-0.5	0.6	0.6			0.4			
PP1	PTPI	MICRO.9628.C2	-1.0			0.4	-0.6	0.4	0.4		0.7	0.0	0.6	0.6			0.4	0.2		
PPi	PTP1	MICRO.9628.C3	0.5			-0.4	0.7	0.4					0.3					0.5		
PPi	RAD51	SSBN003D16u.scf	1				0.7	-0.7					-0./							
PPi	RAD51	MICRO.6107.C6	1			0.2					0.2									
PPi	RAD51	SDBN004F20u.scf	1			-0.2		~ ~	~~		-0.2		2.4							
PPi	RBCS3B	BPLI15I14TH	1					2.2	2.3	2.1			3.4							

			Nał	ıG-I	Désiré	e spo	dnji	,	Désir	ée' sp	oodnj	i			'Dés	irée'	sister	nski		
Model	Kratko ime	POCI identifikator	1	3	4	5	7	1	3	4	5	7	1	3	4	5	7	8	9	11
PPi	RBCS3B	BPLI8M18TH																		
PPi	RBCS3B	MICRO.4165.C11																		
PPi	RBCS3B	MICRO.4165.C12				-0.4														
PPi	RBCS3B	MICRO.4165.C17							0.4		0.3		0.3		-0.3					
PPi	RBCS3B	MICRO.4165.C2	-1.2		-2.1		-1.5	-1.2			-1.3								-1.3	
PPi	RBCS3B	MICRO.4165.C5			0.3	0.3		0.4	0.5	0.5										
PPi	RBCS3B	MICRO.4165.C6																		
PPi	RBCS3B	PPCBW28TH																		
PPi	RBCS3B	PPCCK68TH	-2.7					2.2	2.6	1.7	2.0	2.7	3.2					-2.0		1.8
PPi	RCD1	MICRO.2140.C3			0.4			0.5	0.4	0.5	0.8	0.5	0.7			0.8	0.5			
PPi	RCD1	MICRO.4261.C1														0.5				
PPi	RCD1	MICRO.712.C19						0.6		0.4	0.6		0.5			0.6				
PPi	RCN1	MICRO.244.C1			0.5	0.3			-0.3						0.3					
PPi	RCN1	MICRO.244.C2	0.2				-0.2	-0.2				-0.2		-0.2	-0.2			-0.2		-0.2
PPi	RCN1	MICRO.244.C3										-0.2			0.3					
PPi	RCN1	MICRO.376.C1	1.2			-0.7	0.6						-0.5				-0.6			
PPi	RCN1	cSTS20M9TH																		0.3
PPi	RGA1	MICRO.14034.C1					-0.7													
PPi	RGA1	MICRO.14058.C1	-0.3											-0.2					-0.2	
PPi	RGA1	MICRO.14977.C1												-1.0						
PPi	RGA1	MICRO.2020.C3		-1.1	1						0.9									
PPi	RGA1	MICRO.6205.C3				_			-0.8	-0.9	-0.7			-1.9			-0.7			
PPi	RGA1	MICRO.8127.C1	0.9		0.8									0.9						
PPi	RGA1	MICRO.9346.C1		-1.4	4	-0.8				-1.3		-0.8			-1.1					
PPi	ROXY21	MICRO.16722.C1							_								1.9			
PPi	ROXY7	MICRO.7551.C1			-2.6			-2.6	ì								2.2	-1.6		
PPi	SAG101	MICRO.10282.C1	0.7				0.4	0.4							-0.5				0.5	
PPi	SKIP20	MICRO.10041.C1			0.5															0.6
PPi	SKIP20	MICRO.10041.C2	0.8		0.7												0.5		0.5	0.8
PPi	SKIP20	MICRO.14647.C1	1.3		1.9		1.0													
PPi	SKIP20	MICRO.4054.C11	1.8											1.5		1.3				
PPi	SKIP20	POAC733TP	-0.2						-0.4				-0.2		0.3					
PPi	SKL1	MICRO.5512.C1	-0.4								-0.4									
PPi	SKL2	MICRO.1371.C1						-1.1			-1.2									
PPi	SKL2	MICRO.6777.C1	0.6		-0.7	-0.6								-1.0		-0.9	-0.9			
PPi	TCP15	MICRO.11952.C1		0.8	;				0.9					1.3						
PPi	TCP15	MICRO.14942.C1								1.0							0.8			
PPi	TCP15	MICRO.208.C3					-0.7													
PPi	TCP15	MICRO.2470.C1						-0.6	-0.5	-0.8			-0.7	-0.6	-0.9					
PPi	TCP15	MICRO.2683.C1			-0.7				-0.7		-0.7	-0.9							-0.6	
PPi	TCP15	MICRO.2683.C3																		
PPi	TCP19	MICRO.5583.C1	0.8	-0.8	3 -0.9	-1.6		1.3												
PPi	TOPLESS	ACDA00943G07.T3m.scf	-0.2				-0.3	0.5	0.3		0.7	0.4	0.2						0.3	0.2
PPi	TOPLESS	MICRO.11616.C1								-0.5	-0.6				-0.5	-0.4			ſ	
PPi	TOPLESS	MICRO.1317.C1								-0.5			-0.5		-0.8					-0.7
PPi	TOPLESS	MICRO.3635.C1												-0.3	0.3					
PPi	TOPLESS	MICRO.388.C1						0.5			0.4					0.4				
PPi	TOPLESS	MICRO.7633.C1												0.5	0.9					
PPi	TOPLESS	MICRO.792.C2	-0.5				-0.4													
PPi	TOPLESS	MICRO.792.C4	1.1			~	0				-1.1				0.9		0.0			
PPi	TOPLESS	MICRO.9109.C1	0.8			-0.6	0.5										-0.6			
PPi	TOPLESS	MICRO.9109.C2	0.8	0	c	-0.5														
PPi	TOPLESS	POCBR10TP	0.3	-0.6	5										0.0	0.5			1	0
PPi	TOPLESS	cSTE12L1TH	-0.9												0.8	-0.5				0.5

			Nał	nG-De	ésirée s	podı	nji	']	Désir	ée' sp	oodnji			'Dés	irée'	sisten	nski		
Model	Kratko ime	POCI identifikator	1	3	4	5	7	1	3	4	5 7	1	3	4	5	7	8	9	11
PPi	TPR1	MICRO.7200.C1	0.5																
PPi	TPR1	MICRO.7200.C2	-0.4			-(0.4				-0.	5					-	0.4	-0.4
PPi	TPR1	MICRO.7200.C3		-0.6				0.4		0.4	0.4 0.3		-0.4	-0.6	-0.4	-0.6		0.3	
PPi	TPR1	POCD501TP			0	.3					-0.	2		-0.5	-0.3			_	
PPi	TTL2	MICRO.14611.C1		0.7	0	.7			-1.2	0.6	0.5	-0.7		0.7		1.0			
PPi	VHAD2	bf tubsxxxx 0043g08 t3m.scf	1.0		-0	.6 0).6									-0.6			
PPi	VHAD2	MICRO.217.C1	1.3			C).7				-0.	3				-1.2			
PPi	COILIN	MICRO.15032.C1																	
PPi	COILIN	MICRO.7838.C1	-0.6			-(0.5				0.7								
PPi	COILIN	MICRO.14890.C1			-0	.3			-0.7	-0.3									
PPi	Copine	MICRO.11497.C1		-0.4	-0.5 -0	.4 -(0.4		0.5			0.5	1.0			0.4			
PPi	Copine	MICRO.16098.C1	1.2	-0.5	-0	.5				-0.5	-0.	5		-0.4		-0.4			-0.5
PPi	Copine	MICRO.1945.C2	1.0																
PPi	Copine	MICRO.4032.C1	0.5	-0.4	-0.7 -0	.5			0.4		-0.4		0.8						
PPi	Copine	MICRO.9650.C2												-0.9					
PPi	Copine	MICRO.9650.C3									-0.	1							
PPi	ARM	MICRO.13293.C2	0.5																
PPi	ARM	MICRO.7259.C1	0.9																
PPi	KLCR2	MICRO.14786.C1	1.3			C).6												
PPi	KLCR2	MICRO.17031.C1			0.9 0	.6		0.4		0.5	0.7							0.5	0.5
PPi	KLCR2	MICRO.810.C1																	
PPi	KLCR2	MICRO.810.C2	0.7		0.4														
PPi	KLCR2	MICRO.8582.C1							-0.5	0.6	0.5			0.5					0.4
PPi	Myosin	MICRO.1523.C1	-1.4		-0.9	-	1.1	-0.8							-0.8		-	0.8	
PPi	Myosin	POACL48TP		-0.7	-1.6 -0	.7		-0.7			-0.7 -0.	Ð			-0.9		-	0.8	
PPi	COG	MICRO.3036.C1									0.9								
PPi	COG	MICRO.4105.C2	-0.5	0.5					-0.5					0.4					
PPi	COG	POABQ61TP	0.7			C).4												
PPi	EXT-LIKE	MICRO.3437.C1	1.3																
PPi	EXT-LIKE	MICRO.3437.C2													0.6				
PPi	F18O22_50	MICRO.4999.C1	0.8							0.8			0.6	1.1		0.8			
PPi	F18O22_50	MICRO.8013.C1	1.3											0.7					
PPi	F26K24.12	MICRO.1542.C1											-0.8						
PPi	F26K24.12	MICRO.1595.C1																	
PPi	F26K24.12	MICRO.174.C1			1	.0												0.8	0.9
PPi	F26K24.12	MICRO.174.C3	-0.4	0.3															
PPi	F26K24.12	MICRO.1814.C1			1	.0													
PPi	F26K24.12	MICRO.2473.C1																	
PPi	F26K24.12	MICRO.3407.C1			0	.9					-1.0		-0.9						
PPi	F26K24.12	MICRO.932.C1				C).5						-0.7						
PPi	F3F9.15	MICRO.9174.C1	0.6																
PPi	F5D2123	MICRO.11819.C1									0.4								
PPi	F5D2123	MICRO.14182.C1																	
PPi	F5D2123	MICRO.8584.C3			-0.3 -0	.5													
PPi	F5G3.15	MICRO.12187.C1								0.3						-0.3			
PPi	F5G3.15	MICRO.3651.C1				_							0.3				-	0.3	
PPi	F5G3.15	MICRO.3840.C1			-0.3 -0	.5				0.4				0.3					
PPi	F5G3.15	POACT14TP		0.2	0	.2		0.3	0.2	0.4	0.4	0.3	0.3	0.3					
PPi	FIP1	MICRO.10494.C1	0.4											-0.6					
PPi	FIP1	MICRO.4670.C1		0.3		0).2	-0.3	-0.5	-0.4	-0.6					0.4			
PPi	FIP1	MICRO.8355.C2	L					-0.3	-0.4			-0.3							
PPi	FIP1	MICRO.9286.C1	1.5		1.6	1	1.3								1.3				
PPi	FIP1	STMEV91TH	0.3		_	0).3				-0.	3				-0.4			
PPi	GRF2	MICRO.1500.C3	1			C).9			-0.8		-1.0							1.1

			Nah	G-D	ésiré	e spo	dnji	']	Désir	ée' sp	odn	ji			'Dés	irée'	sister	nski		
Model	Kratko ime	POCI identifikator	1	3	4	5	7	1	3	4	5	7	1	3	4	5	7	8	9	11
PPi	GRF2	MICRO.2617.C1			1.0	0.5	0.7			1.0	0.8	0.6	0.5				0.6		1.0	1.0
PPi	GRF2	MICRO.2617.C2			0.7		0.9			0.9					0.7					0.5
PPi	GRF2	MICRO.2617.C3												-0.7		-0.8				0.7
PPi	GRF2	MICRO.3128.C1								-0.8					-1.0					
PPi	GRF2	MICRO.372.C1					0.5	-0.7	-0.5	-0.5		-0.6		-0.5						
PPi	GRF2	MICRO 372 C2					-0.3		-0.5	-0.4		-0.4		-0.4						
PPi	GRF2	MICRO 4074 C1	0.6				0.5	0.7	0.6		0.6					0.5	-0.7		0.6	
PPi	GRF2	MICRO 4074 C3																		
PPi	GRF2	MICRO 439 C1	0.8											0.5						
PPi	GRF2	MICRO 879 C1				0.4		-0.7					-0.4		0.4					
PPi	GRE2	cSTS11B21TH	0.6					0.3	0.4	0.4	0.6									0.2
PP;	K 21 P38	MICRO 10474 C1				0.4		-0.4						-0.8						
SA response	DD 1	hf lbchyyyy 0042a01 t3m sef	0.8			0.1	23	0						0.0				0.8		
SA-response	DD 1	MICRO 16057 C1	0.0				2.0	16	-16									0.0		-1.8
SA-response	PKI DD1	MICRO.10937.C1				44	59	1.0	1.0											1.0
SA-response	PKI DD1	MICRO.3420.C4	37				3.0							3.2			3.1			37
SA-response	PKI	MICRO.8918.C2	5.7				2.0							5.2			1.2			5.7
SA-response	PKI	MICKO.8918.C3	2.0				2.5									20	-1.2			
SA-response	PRI	MICRO.9705.C1	-2.0										0.7		0.0	-2.9	0.5			
SA-response	PRI	bf_mxlfxxxx_00/4a10.t3m.scf					17						-0.7		0.9		0.5			1.5
SA-response	PR2	MICRO.12659.C1				0.0	1.7						0.0							-1.5
SA-response	PR2	MICRO.18187.C1				-0.8	2.0						0.9							
SA-response	PR2	MICRO.2286.C15				1.8	3.9													
SA-response	PR2	MICRO.2286.C17					3.0													
SA-response	PR2	MICRO.2286.C42				2.1	3.7													
SA-response	PR2	MICRO.2526.C3	0.3				0.4													
SA-response	PR2	MICRO.6187.C2				3.6	3.9												2.3	
SA-response	PR5	MICRO.12664.C1		-2.6		4.0	5.0													
SA-response	PR5	MICRO.13949.C1				0.8	1.3													
SA-response	PR5	MICRO.1528.C2			0.4								-1.0	-0.4		-0.5				
SA-response	PR5	MICRO.1588.C1			2.0		2.4										-1.9			
SA-response	PR5	MICRO.1588.C2																		
SA-response	PR5	MICRO.1588.C6	3.8		2.0		2.1		-1.8											
SA-response	PR5	MICRO.1588.C7																		
SA-response	PR5	MICRO.1588.C8	2.9		3.1		2.9											2.2		
SA-response	PR5	MICRO.18132.C1						-0.8		-0.8			-0.8							-1.6
SA-response	PR5	bf_ivrootxx_0003e11.t3m.scf		-1.1			1.3	1.1												
SA-response	PR5	bf_mxlfxxxx_0056b11.t3m.scf																		
SA-signalling	EDS1	MICRO.1389.C1				1.3	2.2													
SA-signalling	EDS5	MICRO.12357.C1	1.8																	
SA-signalling	EDS5	MICRO.2447.C1	1.8			-1.1														
SA-signalling	NPR1	MICRO.11910.C1																		
SA-signalling	NPR1	MICRO.11910.C3																		
SA-signalling	NPR1	MICRO.17159.C1						-0.7	-0.7			-0.7								
SA-signalling	NPR1	MICRO.8375.C1	0.7														-0.9			
SA-signalling	NPR3	MICRO.2577.C1	0.5														-0.5			
SA-signalling	NPR3	MICRO.8375.C2															-0.8			
SA-signalling	PAD4	MICRO.2391.C3				2.3	3.3										1.5			
SA-signalling	PAD4	MICRO.3630.C1			1.1	1.0	1.4													
SA-signalling	TGA1	MICRO.14906.C1						1		-0.8					-0.9	0.8				
SA-signalling	TGA1	MICRO 14906 C3		-0.6			-0.9		0.9					1.0	-0.8		-0.7			-0.6
SA-sionalling	TGA1	MICRO 7564 C1									0.9	0.7	0.7							
SA-signalling	TGA1	MICRO 9918 C1	0.6			-0.6			-0.8	-0.5				-0.7						
SA-sionalling	TGA6	MICRO 14778 C1	0.6												-0.8					-0.6
SA-signalling	TGA6	MICRO 14867 C1	0.5								0.5									
SA-signannig	TUAU	WIICKU.14007.U1	0.0					L			0.0									

			Nał	ıG-D	ésiré	e spo	dnji	ľ	Désir	ée' sp	odn	ji			'Dés	irée'	siste	mski		
Model	Kratko ime	POCI identifikator	1	3	4	5	7	1	3	4	5	7	1	3	4	5	7	8	9	11
SA-signalling	TGA6	MICRO.7474.C2		-0.5	0.6		-0.5	0.8	1.0		1.6	1.2	1.0		-0.6	0.5		-0.5	0.7	0.6
SA-signalling	TGA6	MICRO.7474.C5	0.3	-0.4				0.7	0.7	0.4	0.7	0.8	0.7						0.3	
SA-signalling	TGA6	MICRO.8878.C1	0.4																	-0.4
SA-signalling	TGA6	POAC439TP	1.4			-0.7						-0.6					-0.7			
SA-signalling	TGA6	POAD811TV								-0.4										
SA-signalling	TGA6	STMHL35TV	1.4					0.8			0.8					0.9				
SA-signalling	TGA6	bf_arrayxxx_0075b06.t7m.scf	1.5					0.7												
SA-signalling	TGA7	MICRO.7474.C6					-0.4													-0.3
SA-signalling	IMPA1	MICRO.1291.C1	-0.4									0.3	0.4	0.2	0.2		0.2		-0.3	I
SA-signalling	IMPA1	MICRO.2306.C2	-0.3			0.3														
SA-signalling	IMPA1	MICRO.2306.C3	0.7																	
SA-signalling	IMPA1	MICRO.26.C1		0.5					-0.5	0.5				-0.5	0.7					
SA-signalling	IMPA1	MICRO.7131.C1															0.3			
SA-signalling	IMPA1	MICRO.855.C1		_												0.7	-0.6			
SA-signalling	IMPA1	bf_arrayxxx_0103f12.t3m.scf	-0.3	0.5				0.6		0.5	0.5		0.4		0.4			0.3		
SA-signalling	IMPA1	cSTB37G24TH		-0.2		0.3									-0.2					
SA-signalling	TRX3	MICRO.10315.C1		_			0.6			-0.6		-0.6	-0.6							
SA-signalling	TRX3	MICRO.7055.C2	0.9			-0.5									-0.6					
SA-synthesis	CM1	MICRO.16857.C1								-0.8					-0.7					
SA-synthesis	CM1	MICRO.2501.C1				1.0	1.3													
SA-synthesis	PAL1	MICRO.13476.C1					1.3				-0.9		-1.0		-0.6					
SA-synthesis	PAL1	MICRO.13477.C1					1.8				-2.7		-1.8		-1.5	-1.9				-1.9
SA-synthesis	PAL1	MICRO.17807.C1										_			_					
SA-synthesis	PAL1	MICRO.2219.C1					2.1				-1.4			1.6						
SA-synthesis	PAL1	MICRO.2219.C3			0.7		0.7		-0.5			0.4								
SA-synthesis	PAL1	MICRO.2219.C6			0.8		1.9						-0.9		-0.9					
SA-synthesis	PAL1	MICRO.2219.C8					0.5	-0.4	-0.3											
SA-synthesis	PAL1	MICRO.2219.C9					1.8				-1.4			2.1						
SA-synthesis	PAL1	MICRO.6071.C1						-2.1			-2.1					-2.4				
SA-synthesis	PAL1	POCAI92TV			1.1	1.1	2.5									0.9	1.0			
SA-synthesis	PAL1	bf_ivrootxx_0039a07.t3m.scf					1.1				-0.8		-0.9							
SA-synthesis	PAL1	bf_mxlfxxxx_0023e08.t3m.scf		0.8	1.3	1.4	1.8			2.1	0.8		1.2		2.1	1.5	0.8			
SA-synthesis	PAL1	cSTE25G4TH				_		1.1	1.9		1.1		1.0	1.5						
StAVR9	AP2C1	MICRO.9054.C1	2.3		2.3		2.0													
StPK11	SNRK2.1	MICRO.5245.C2			-1.4	-1.1	-1.0						0.6			1.2				-0.6
StPK11	SNRK2.4	MICRO.5245.C3		-0.7	-0.7	-0.9		0.7								0.9	-0.7			
StPP2C	AP2C1	MICRO.12023.C1		-1.3	1.8															
StPP2C	AP2C1	STMGP26TV		-1.9	2.7					-1.9										
StSAPK8	SNRK2.1	MICRO.1134.C1	0.5	1.3	2.1	0.9	0.6	0.4		0.8		0.7		1.1	0.8	0.8	1.1	0.7	0.6	0.5
StSAPK8	SNRK2.1	MICRO.1134.C2	1.0	0.8	1.0	0.5	1.0			0.7		0.6		0.5			0.6			
StSAPK8	SNRK2.1	MICRO.1134.C3	1.1	1.6	3.1	1.0	1.3	0.8		1.7		1.3		1.3	1.5	1.4	1.4	0.9	1.0	0.8
StSAPK8	SNRK2.1	MICRO.1134.C4	1.0	1.6	3.2	1.1	1.2	1.0	0.7	1.8	0.8	1.6	0.8	1.3	1.2	1.5	1.7	1.0	1.0	0.9

Priloga G: Ortologi kinaze StSAPK8 in StPK11 v krompirju in navadnem repnjakovcu (glede na predikcijo PLAZE in šibkih komponent).

V prvem stolpcu je označen genski identifikator, v drugem identifikator pripadajoče ortologne skupine glede na predikcijo PLAZA, v tretjem identifikator pripadajoče ortologne skupine glede na predikcijo šibki komponent, v zadnjem pa opis gena.

Appendix G: Kinases StSAPK8 and StPK11 orthologues in potato and Arabidopsis (according to PLAZA and weak component prediction).

In the first column gene idnentifier is listed, in the second column coresponding orthologue group identifier according to PLAZA prediction is listed, in the third coresponding orthologues group identifier according to weak component prediction and in the last one gene name.

Identifikator gena	PLAZA	WC	Opis gena
AT1G10940	ORTHO03D000115	wc00998	SnRK2.4
AT1G60940	ORTHO03D000115	wc00998	SnRK2.10
AT1G66080	-	wc00998	unknown protein
AT1G78290	ORTHO03D016397	wc05964	SnRK2.8
AT2G23030	ORTHO03D006395	wc08124	SnRK2.9
AT3G50500	ORTHO03D000115	wc13318	SnRK2.2
AT4G33950	ORTHO03D000115	wc16666	SnRK2.6
AT4G40010	ORTHO03D040694	wc05964	SnRK2.7
AT5G08590	ORTHO03D000115	wc00998	SnRK2.1
AT5G63650	ORTHO03D000115	wc00998	SnRK2.5
AT5G66880	ORTHO03D000115	wc13318	SnRK2.3
Sotub01g040930.1.1	ORTHO03D000115	wc00998	Serine/threonine protein kinase
Sotub01g045450.1.1_StSAPK8	ORTHO03D006395	wc16666	Serine/threonine protein kinase
Sotub02g032470.1.1	ORTHO03D000115	-	Serine-threonine protein kinase
Sotub02g032520.1.1	-	wc16666	Serine/threonine protein kinase StSAPK8-like protein
Sotub02g032550.1.1	-	wc16666	Serine/threonine protein kinase StSAPK8-like protein
Sotub02g032570.1.1	-	wc16666	Serine/threonine protein kinase StSAPK8-like protein
Sotub02g032590.1.1	-	wc16666	Serine/threonine protein kinase StSAPK8-like protein
Sotub04g011170.1.1	ORTHO03D000115	wc05964	Serine-threonine protein kinase
Sotub04g028300.1.1	ORTHO03D016397	wc05964	Serine-threonine protein kinase
Sotub05g029770.1.1	ORTHO03D000115	wc00998	Serine/threonine-protein kinase
Sotub05g029780.1.1	-	wc00998	C11orf73 homolog
Sotub12g025700.1.1	ORTHO03D016397	wc05964	Serine-threonine protein kinase
Sotub08g023320_StPK11	ORTHO03D012645	wc47192	Serine/threonine protein kinase

Priloga H: Ortologi fosfataz StPP2C in StAvr9 v krompirju in navadnem repnjakovcu (glede na predikcijo PLAZE in šibkih komponent).

V prvem stolpcu je označen genski identifikator, v drugem identifikator pripadajoče ortologne skupine glede na predikcijo PLAZA, v tretjem identifikator pripadajoče ortologne skupine glede na predikcijo šibki komponent, v zadnjem pa opis gena.

Appendix H: Phosphatase StPP2C and StAvr9 orthologues in potato and Arabidopsis (according to PLAZA and weak component prediction).

In the first column gene idnentifier is listed, in the second column coresponding orthologue group identifier according to PLAZA prediction is listed, in the third coresponding orthologues group identifier according to weak component prediction and in the last one gene name.

Identifikator gena	PLAZA	WC	Opis gena
AT1G07160	ORTHO03D003429	wc00622	PP2C putative
AT1G67820	-	wc00622	PP2C putative
AT2G30020	ORTHO03D003429	wc00622	PP2C putative
AT3G63320	ORTHO03D003042	wc00622	PP2C-related
AT3G63330	-	wc00622	protein kinase family protein
AT3G63340	ORTHO03D003042	wc00622	PP2C-related
Sotub06g006210	-	wc00622	Integrin-linked kinase-associated PP2C
Sotub04g016340	-	wc00622	Protein phosphatase 2C
Sotub09g020420_StPP2C	ORTHO03D003042	wc00622	Protein phosphatase 1L-like protein
Sotub04g016100	-	wc00622	Protein phosphatase 2C
Sotub04g016120	-	wc00622	Protein phosphatase 2C
Sotub06g032840_StAVR9	ORTHO03D003429	wc00622	Integrin-linked kinase-associated serine/threonine phosphatase 2C
Sotub07g028750	-	wc00622	Integrin-linked kinase-associated serine/threonine phosphatase 2C
Sotub06g033450	-	wc00622	Serine/threonine phosphatase stp
Sotub09g020430	-	wc00622	Unknown Protein
Sotub06g034550	-	wc00622	Unknown Protein