

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
INTERDISCIPLINARNI PODIPLOMSKI ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Špela BAEBLER

**IZRAŽANJE GENOV PRI OBČUTLJIVI IN ODPORNI SORTI
KROMPIRJA (*Solanum tuberosum* L.) V ZGODNJEM ODZIVU NA
OKUŽBO S KROMPIRJEVIM VIRUSOM Y^{NTN}**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**GENE EXPRESSION IN SENSITIVE AND RESISTANT CULTIVAR
OF POTATO (*Solanum tuberosum* L.) IN EARLY RESPONSE TO
POTATO VIRUS Y^{NTN} INFECTION**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2006

Z doktorsko disertacijo zaključujem podiplomski doktorski študij s področja biotehnologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani.

Doktorsko delo je bilo večinoma opravljeno na Oddelku za rastlinsko fiziologijo in biotehnologijo Nacionalnega inštituta za biologijo v Ljubljani. Nekatere analize (merjenje kvalitete RNA in optično branje mikromrež) so bile opravljene na Centru za funkcijsko genomiko in biočipe Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani.

Senat Biotehniške fakultete je za mentorico doktorske disertacije imenoval prof. dr. Jana Žel.

Mentorica: prof. dr. Jana Žel.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Borut BOHANEČ

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: prof. dr. Borut ŠTRUKELJ

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo

Članica: prof. dr. Jana ŽEL

Ljubljana, Nacionalni inštitut za biologijo

Datum zagovora: 27.3.2006

Izjavljam, da je predložena doktorska disertacija rezultat samostojnega raziskovalnega dela.

mag. Špela Baebler

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dd
- DK UDK 581.1:577.2.08:632.3:633.491(043)=863
- KG izražanje genov/krompir/*Solanum tuberosum*/virusi/PVY^{NTN} /proteini vročinskega šoka/ proteini povezani s patogenezo /proteinazni inhibitorji/cDNA-mikromreže/PCR v realnem času
- AV BAEBLER, Špela, univ.dipl.biol, mag. biotehnoloških znanosti
- SA ŽEL, Jana (mentor)
- KZ 1000 Ljubljana, SLO, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni podiplomski študij biotehnologije
- LI 2006
- IN IZRAŽANJE GENOV PRI OBČUTLJIVI IN ODPORNI SORTI KROMPIRJA (*Solanum tuberosum* L.) V ZGODNJEM ODZIVU NA OKUŽBO S KROMPIRJEVIM VIRUSOM Y^{NTN}
- TD Doktorska disertacija
- OP XV, 108 str., 18 pregl., 23 sl., 197 vir.
- IJ sl
- JI sl / en
- AI Z metodama cDNA-mikromreže in PCR v realnem času smo ugotavljali različno izražanje genov krompirja (*Solanum tuberosum* L.) na okužbo s krompirjevim virusom Y^{NTN} pri sorti krompirja 'Igor', ki je na virus občutljiva, in na virus odporni sorti 'Sante'. Izražanje smo primerjali med slepo inokuliranimi in z virusom okuženimi rastlinami, v zgodnjem odgovoru na okužbo, 30 minut in 12 ur po inokulaciji, v treh bioloških ponovitvah. Vzorce komplementarne cDNA, prepisane iz celokupne RNA, smo hibridizirali na cDNA-mikromreže s cDNA krompirja (TIGR) in hibridizirano cDNA označili z dendrimeri fluorescenčnih barvil. Po optičnem branju in predpripravi podatkov, ki je vključevala kontrolo kvalitete, normalizacijo in filtriranje, smo podatke analizirali s statističnima testoma t-test in ANOVA. Geni, ki so bili po okužbi različno izraženi, so vključeni v odgovor na stres, obrambne procese, izražanje genov, sintezo proteinov ali pa njihova funkcija ni poznana. Z metodo PCR v realnem času smo ugotavljali izražanje 9 genov: 5 proteinov vročinskega šoka, dveh s patogenezo povezanih proteinov in dveh proteinaznih inhibitorjev, kar je potrdilo njihovo vlogo v odzivu na okužbo z virusi. Rezultati obeh metod so se v primeru genov, ki so se močno odzivali na okužbo, ujemali. Poleg ugotavljanja izražanja genov, smo optimizirali nekatere postopke, potrebne za pripravo cDNA (razgradnjo genomske DNA in obratno prepisovanje) ter prilagodili analizo podatkov tako, da smo upoštevali čim več vzrokov variabilnosti.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- ND Dd
- DC UDK 581.1:577.2.08:632.3:633.491(043)=863
- CX plants/potato/*Solanum tuberosum*/virus/PVY^{NTN} /differential gene expression/heat shock protein/pathogenesis-related protein/proteinase inhibitor/cDNA-microarray/real-time PCR
- AU BAEBLER, Špela
- AA ŽEL, Jana (supervisor)
- PP 1000 Ljubljana, SLO, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdisciplinary Postgraduate Study in Biotechnology
- PY 2006
- TI GENE EXPRESSION IN SENSITIVE AND RESISTANT CULTIVAR OF POTATO (*Solanum tuberosum* L.) IN EARLY RESPONSE TO POTATO VIRUS Y^{NTN} INFECTION
- DT Doctoral Dissertation
- NO XV, 108 p., 18 tab., 23 fig., 197 ref.
- LA sl
- AL sl / en
- AB Differential gene expression in early response of potato (*Solanum tuberosum* L.) plants to potato virus Y^{NTN} infection was studied using cDNA-microarrays and real-time PCR. Expression in two potato cultivar, a susceptible cv. Igor and resistant cv. Sante, 30 minutes and 12 hours after virus inoculation was compared between mock inoculated and virus infected plants, in three biological replicates. Samples of complementary cDNA, reverse transcribed from DNase-digested total RNA, were hybridized to cDNA-microarrays containing potato clone cDNAs. Hybridized cDNA was labeled with dendrimers of fluorescent dyes. After scanning and data preparation that included quality control, normalization and gene filtering, data was analyzed using t-test and ANOVA. Genes that were differentially expressed following virus infection were involved in stress and defense responses, gene expression, and protein synthesis or were of unknown function. Real-time PCR was used to monitor the expression of nine genes: 5 genes for heat shock proteins two genes for pathogenesis-related proteins and two genes for proteinase inhibitors. In the case of genes that responded strongly to virus infection, the results of expression obtained by both methods were in accordance. Additionally, the procedure for cDNA preparation (DNase digestion and reverse transcription) and data analysis were optimized.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VII
KAZALO SLIK.....	VIII
SEZNAM OKRAJŠAV	XI
1 UVOD	1
1.1 CILJI DOKTORSKE NALOGE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 ODGOVOR RASTLIN NA OKUŽBO	3
2.1.1 Obrambni odgovor rastline	4
2.1.2 Posebnosti odgovora rastline na okužbo z virusi	8
2.1.2.1 Delovanje virusa	8
2.1.2.2 Odpornost rastlin proti virusom	9
2.1.3 Odgovor rastline na okužbo z virusom PVY ^{NTN}	10
2.1.3.1 Krompirjev virus Y ^{NTN}	10
2.1.3.2 Raziskave interakcije krompirja in PVY ^{NTN}	11
2.2 METODE ZA ŠTUDIJ IZRAŽANJA GENOV PRI ODGOVORU RASTLINE NA OKUŽBO.....	13
2.2.1 Mikromreže	14
2.2.1.1 Priprava in hibridizacija cDNA mikromrež.....	15
2.2.1.2 Analiza podatkov cDNA-mikromrež	16
2.2.1.3 Uporaba mikromrež za študij odgovora rastline na okužbo	18
2.2.2 PCR v realnem času.....	19
3 MATERIALI IN METODE	23
3.1 PRIPRAVA RASTLINSKEGA MATERIALA	24
3.1.1 Rastlinski material	24
3.1.2 Gojišča in raztopine za pripravo rastlinskega materiala	24
3.1.3 Mehanska inokulacija rastlin	24
3.1.4 Pobiranje rastlinskega materiala	25
3.1.5 Serije.....	25
3.1.6 Vzorci	25
3.2 PRIPRAVA RNA	26
3.2.1 Raztopine za pripravo RNA	26
3.2.2 Izolacija celokupne RNA	27
3.2.3 Razgradnja genomske DNA	27
3.2.4 Čiščenje RNA	28
3.2.5 Merjenje koncentracije in inegritete RNA	28
3.2.5.1 Določanje koncentracije in kvalitete RNA z aparaturom BioAnalyzer	28
3.2.5.2 Agarozna gelska elektroforeza	29
3.3 cDNA MIKROMREŽE	29
3.3.1 Mikromreže	30
3.3.2 Raztopine hibridizacije mikromrež	32
3.3.3 Priprava cDNA	33
3.3.3.1 Obratno prepisovanje	33
3.3.3.2 Koncentriranje cDNA	33
3.3.4 Hibridizacija	34
3.3.4.1 Predhibridizacija	34
3.3.4.2 Hibridizacija s cDNA	34
3.3.4.3 Spiranje mikromrež po cDNA hibridizaciji.....	35
3.3.4.4 Hibridizacija z dendrimeri.....	35
3.3.4.5 Spiranje mikromrež po hibridizaciji z dendrimeri	35

3.3.5	Optično branje mikromrež	36
3.3.6	Obdelava podatkov	36
3.3.6.1	Analiza slike	36
3.3.6.2	Predpriprava podatkov	38
3.3.6.3	Analiza podatkov	39
3.4	PCR V REALNEM ČASU	39
3.4.1	Sonde in začetni oligonukleotidi	40
3.4.2	Obratno prepisovanje	43
3.4.3	Načrtovanje začetnih oligonukleotidov	44
3.4.4	PCR v realnem času	44
3.4.4.1	Optimizacija koncentracije začetnih oligonukleotidov in tarčne cDNA	45
3.4.5	Obdelava podatkov	46
4	REZULTATI	48
4.1	PRIPRAVA RASTLINSKEGA MATERIALA	48
4.2	PRIPRAVA RNA	49
4.2.1	Izolacija celokupne RNA	49
4.2.2	Razgradnja genomske DNA	50
4.3	MIKROMREŽE	51
4.3.1	Priprava cDNA, hibridizacija in spiranje	51
4.3.2	Analiza podatkov	51
4.4	PCR V REALNEM ČASU	54
4.4.1	Obratno prepisovanje	54
4.4.2	Ponovljivost reakcij PCR v realnem času	56
4.4.3	Načrtovanje začetnih oligonukleotidov	56
4.4.4	Določanje pomnoževanja ter optimalnih koncentracij cDNA, in začetnih oligonukleotidov ..	57
4.4.5	Obdelava podatkov	58
4.5	IZRAŽANJE GENOV PO OKUŽBI S PVY ^{NTN}	59
4.5.1	Profil izražanja genov po okužbi v virusom PVY ^{NTN}	60
4.5.2	Izražanje izbranih genov po okužbi v virusom PVY ^{NTN}	73
4.5.3	Primerjava rezultatov, pridobljenih z metodama mikromreže in PCR v realnem času	76
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	79
5.1	RAZPRAVA	79
5.1.1	Priprava rastlinskega materiala	79
5.1.2	Priprava RNA	80
5.1.3	Mikromreže	80
5.1.4	PCR v realnem času	81
5.1.5	Izražanje genov po okužbi z virusom PVY ^{NTN}	83
	SKLEPI	90
6	POVZETEK (SUMMARY)	91
6.1	POVZETEK	91
6.2	SUMMARY	93
7	VIRI	95

ZAHVALA

PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Vzorci rastlinskega materiala, iz katerih smo izolirali RNA, in poimenovanje parov, ki smo jih primerjali z metodama mikromreže in PCR v realnem času.....	26
Preglednica 2: Tarčni geni pri analizi PCR v realnem času, sistem detekcije, uporaba in vir.....	40
Preglednica 3: Sonde in začetni oligonukleotidi za PCR v realnem času: tarčni gen, nukleotedno zaporedje za smiselni (F) in protismiselni (R) začetni oligonukleotid ter sondo (S).....	42
Preglednica 4: Uspešnost razgradnje genomske DNA v vzorcih celokupne RNA (totRNA).....	51
Preglednica 5: Primerjava učinkovitosti sinteze cDNA s kompletoma GeneAmp® RNA PCR Kit (GeneAmp) in High-Capacity cDNA Archive Kit (Archive).....	54
Preglednica 6: Ponovljivost sinteze cDNA (RT) iz istega vzorca celokupne RNA.....	55
Preglednica 7: Ponovljivost reakcije PCR v realnem času.....	56
Preglednica 8: Novo konstruirani začetni oligonukleotidi za PCR v realnem času.....	58
Preglednica 9: Analiza izražanja genov z metodama mikromreže in PCR v realnem času: vzorci.....	60
Preglednica 10: Število značilno različno izraženih genov v okuženih rastlinah pri sortah 'Igor' in 'Sante' 30 minut in 12 ur po inokulaciji.....	61
Preglednica 11: Seznam bolj izraženih genov v okuženih rastlinah krompirja sorte 'Igor' 30 minut po inokulaciji.....	61
Preglednica 12: Seznam manj izraženih genov v okuženih rastlinah krompirja sorte 'Igor' 30 minut po inokulaciji.....	62
Preglednica 13: Seznam bolj izraženih genov v okuženih rastlinah krompirja sorte 'Sante' 30 minut po inokulaciji.....	63
Preglednica 14: Seznam manj izraženih genov v okuženih rastlinah krompirja sorte 'Sante' 30 minut po inokulaciji.....	64
Preglednica 15: Seznam bolj izraženih genov v okuženih rastlinah krompirja sorte 'Igor' 12 ur po inokulaciji.....	65
Preglednica 16: Seznam manj izraženih genov v okuženih rastlinah krompirja sorte 'Igor' 12 ur po inokulaciji.....	66
Preglednica 17: Seznam bolj izraženih genov v okuženih rastlinah krompirja sorte 'Sante' 12 ur po inokulaciji.....	67
Preglednica 18: Seznam manj izraženih genov v okuženih rastlinah krompirja sorte 'Sante' 12 ur po inokulaciji.....	68

KAZALO SLIK

Slika 1: Kompleksnost signalnih poti, ki omogočajo aktivacijo obrambnih odgovorov (Hammond-Kosack in Jones, 1996).	4
Slika 2: Detekcija z uporabo SYBR Green in TaqMan kemije pri PCR v realnem čas (Walker, 2002).	20
Slika 3: Shema eksperimentalnega dela: priprava rastlinskega materiala in RNA ter analiza izražanja genov z metodama cDNA-mikromreže in PCR v realnem času	23
Slika 4: Shema hibridizacije z označevanjem z dendrimeri.	30
Slika 5: Shema TIGR krompirjevih cDNA-mikromrež: cDNA je natisnjena v 48 blokih (levo), v vsakem (desno) je 25 stolpcev in 26 vrstic točk cDNA.	31
Slika 6: Shema položaja lokalnih kotov (pobarvani temno sivo) točk nanešene cDNA na mikromreži, iz signala katerih smo izračunali ozadje za posamezno točko.	37
Slika 7: Rastline (zgoraj) in listi (spodaj) sort krompirja 'Igor' (levo) in 'Sante' (desno) 14 dni po inokulaciji z virusom PVY ^{NTN}	48
Slika 8: Primer elektroferograma agarozne gelske elektroforeze (negativ) celokupne RNA izolirane iz listov krompirja.	49
Slika 9: Primer elektroferograma kapilarne elektroforeze (BioAnalyzer) celokupne RNA izolirane iz listov krompirja sorte 'Sante' 30 minut po slepi (1) ali virusni inokulaciji (2) 50	
Slika 10: Slike signala barvila Cy5 (G), Cy3 (R) ter ozadja Cy5 (Rb) in Cy3 (Gb) na 4 cDNA mikromrežah. Intenzivnejša barva predstavlja močnejši signal.	52
Slika 11: Grafikon kvantilov vrednosti M na 11 mikromrežah pred (levo) in po normalizaciji loess (desno).	53
Slika 12: MA grafikon ene mikromreže pred (levo) in po loess normalizaciji (desno). 0 – točke slabe kvalitete, izločene pri analizi slike, 1 – točke dobre kvalitete.	53
Slika 13: Primerjava učinkovitosti sinteze cDNA z različnimi kombinacijami začetnih oligonukleotidov v 4 vzorcih listov krompirja.	55
Slika 14: Graf pomnoževanja Hsp70_1 in redčitvena krivulja 4 koncentracij cDNA (levo) in disociacijska krivulja cDNA Hsp70_1 in Hsp70_2 (desno) v PCR v realnem času.	57
Slika 15: Vrednosti Ct treh normalizatorskih genov in povprečna vrednost Ct pri 10 vzorcih listov krompirja.	59
Slika 16: Toplotna mapa genov, ki se na okužbo z virusom odzivajo različno glede na sorto krompirja.	69
Slika 17: Toplotna mapa genov, ki se na okužbo z virusom odzivajo različno glede na čas po inokulaciji.	71
Slika 18: Toplotna mapa genov, ki se na okužbo z virusom odzivajo različno v interakciji sorta in čas po inokulaciji.	72
Slika 19: Izražanje 9 genov v 13 parih vzorcev krompirja po okužbi s PVY ^{NTN}	74
Slika 20: Izražanje 9 genov v dveh sortah in krompirja po okužbi s PVY ^{NTN}	75

- Slika 21:** Združevanje genov in vzorcev po metodi združevanja s evklidsko razdaljo in maksimalno metodo pri 9 genih v 13 parih vzorcev krompirja po okužbi s PVY^{NTN} 76
- Slika 22:** Ujemanje rezultatov relativnega izražanja pridobljenih z mikromrežami (M) in PCR v realnem času (qPCR). 77
- Slika 23:** Ujemanje rezultatov relativnega izražanja pridobljenih z mikromrežami (klona STMGU47 in STMCE08) in PCR v realnem času (qPCR) za gen za PCPI. 78

KAZALO PRILOG

Priloga A: Sonde in začetni oligonukleotidi za PCR v realnem času

Priloga B: Izražanje 9 genov v 13 parih vzorcev krompirja po okužbi s PVY^{NTN}

SEZNAM OKRAJŠAV

18S	18 S rRNA
A	intenziteta signala na mikromreži: log ₂ polovice produkta intenzitete barvila Cy3 in Cy5
ACCOx	aminociklopropan oksidaza
AFLP	raznolikost dolžin pomnoženih delov
ANOVA	analiza variance (analysis of variance)
AP PCR	verižna reakcija s polimerazo z naključnimi začetnimi oligonukleotidi
Archive	komplet High-Capacity cDNA Archive Kit
bp	bazni par
BSA	goveji serumski albumin
CaMV	virus mozaika cvetače (<i>Cauliflower mosaic virus</i>)
cat1	katalaza 1
cDNA	komplementarna DNA (complementary DNA)
CMV	virus mozaika kumar (<i>Cucumber mosaic virus</i>)
CP PVY ^{NTN}	plaščni protein PVY ^{NTN}
Ct	cikel PCR v realnem času, kjer fluorescenca preseže nastavljeni prag (threshold cycle)
Cy3	fluorescenčno barvilo cyanine3
Cy5	fluorescenčno barvilo cyanine5
Da	dalton, enota za molekulsko maso
dATP	2'-deoksiadenozin trifosfat
ddH ₂ O	dvakrat destilirana voda
DEPC	dietil pirokarbonat
DNA	deoksiribonukleinska kislina
DNaza	deoksiribonukleaza
dNTP	2'-deoksinukleozid trifosfat
DTT	ditiotreitol (treo-1,4-dimerkapto-2,3-butandiol)
E	učinkovitost pomnoževanja v reakciji PCR v realnem času
EDTA	etilendiamonotetraocetna kislina
ef-1	elongacijski faktor 1
ELISA	encimsko imunska metoda
EST	izražene oznake zaporedij (expressed sequence tags)
FAM	6-karboksi-fluorescein
G	signal barvila Cy3
GAL	seznam podatkov o nanoseni cDNA na mikromreži (Genepix Allocation List)
Gb	signal ozadja barvila Cy3
gDNA	genomska DNA
GeneAmp	komplet GeneAmp® RNA PCR Kit

Gf	signal barvila Cy3
HR	preobčutljivostna reakcija (hypersensitive reaction)
Hsp70_1	protein vročinskega šoka 70, homologen Hsp 70 riža
Hsp70_2	protein vročinskega šoka 70, homologen Hsp 70 paradižnika
Hsp90	protein vročinskega šoka 90
Hsp	protein vročinskega šoka
Hsp40	protein vročinskega šoka 40 (DnaJ)
INSV	virus nekrotične pegavosti vodenke (<i>Impatiens necrotic spot virus</i>)
JA	jasmonska kislina
luc	luciferaza
M	enota za molarnost, mol/l
M	log ₂ razmerja med jakostjo signala dveh barvil na mikromreži ali log ₂ razmerja izražanja genov med slepo inokuliranimi in okuženimi rastlinami
MGB	molekula, ki se veže na DNA (minor groove binder)
MP	gibalni proteini
mRNA	informacijska RNA (messenger RNA)
NADP	nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat
NADPH	reducirana oblika nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfata
PCPI	krompirjev cisteinski proteinazni inhibitor
PCR	verižna reakcija s polimerazo
pH	negativni logaritem koncentracije vodikovih ionov
PI	inhibitor proteinaz
pin II	proteinazni inhibitor krompirja skupine II
PI-TR8	proteinazni inhibitor TR-8
PLRV	virus zvijanja listov krompirja (<i>Potato leafroll virus</i>)
PopMV	virus mozaika topola (<i>Poplar mosaic virus</i>)
PR-1	s patogenezo povezan protein 1
PR-10	s patogenezo povezan protein 10 (STH2)
PR-protein	s patogenostjo povezan protein (pathogenesis related protein)
PSbMV	virus mozaika graha, ki se prenaša s semenom (<i>Pea seed-borne mosaic virus</i>)
PTGS	Post-transkripcijsko utišanje genov (post-transcriptional gene silencing)
PTNRD	obročasta nekroza gomoljev krompirja (potato tuber necrosis disease)
puf	protein z neznano vlogo [24/76]
PVY	krompirjev virus Y (<i>Potato virus Y</i>)
PVY ^{NTN}	nekrotični različek krompirjevega virusa Y (<i>Potato virus Y^{NTN}</i>)
PVY ^O	krompirjev virus Y ^O (<i>Potato Y^O virus</i>)
PVX	krompirjev virusu X (<i>Tobacco virus X</i>)
Rb	signal ozadja barvila Cy5
Rf	signal barvila Cy5
RNA	ribonukleinska kislina

ROS	reaktivne kisikove zvrsti (reactive oxygen species)
ROX	6-karboksi-X-rodamin
rRNA	ribosomska ribonukleinska kislina
RT	obratno prepisovanje (reverse transcription)
RT-PCR	obratna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo
SA	salicilna kislina
SAGE	zaporedna analiza izražanja genov (serial analysis of gene expression)
SAR	sistemska pridobljena odpornost (systemic acquired resistance)
SD	standardna deviacija
SDS	natrijev dodecil sulfat
sHsp	mali protein vročinskega šoka
SSC	raztopina natrijevega klorida in natrijevega citrata
StGI	baza podatkov nukleotidnih zaporedij EST krompirja (TIGR <i>Solanum tuberosum</i> Gene index)
SYNV	virus rumene zamreženosti škrbinke (<i>Sonchus yellow net virus</i>)
TAE	raztopina Trisa, acetata in EDTA
TAMRA	6-karboksi-tetrametilrodamin
TC	verjetno skupno zaporedje (tentative consensus sequence)
TE	raztopina Trisa in EDTA
TF	transkripcijski faktor (transcription factor)
TEV	virus jedkanja tobaka (<i>Tobacco etch virus</i>)
T _m	temperatura, pri kateri se verigi DNA razpreta (melting temperature)
TMV	virus mozaika tobaka (<i>Tobacco mosaic virus</i>)
Tris	2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiol
TuMV	virus mozaika repe (<i>Turnip mosaic virus</i>)
TVMV	virus žilne marogavosti tobaka (<i>Tobacco vein mottling virus</i>)
UMM	reagent Universal PCR Master Mix za PCR v realnem času
UV	ultravijolično

Standardne kratice za nukleotide

A adenin
C citozin
G gvanin
T timin
U uracil

R G ali A
Y C ali T
M A ali C
K G ali T
S G ali C
W A ali T

H A ali C ali T
B G ali T ali C
V G ali C ali A
D G ali A ali T
N A, C, G ali T

1 UVOD

Rastline se v naravi srečujejo z vrsto dejavnikov iz okolja, vključno z napadi virusov, bakterij, gliv in drugih povzročiteljev bolezni. Zaradi mehanske bariere, ki jo predstavlja celična stena, rastline ne morejo imeti specializiranih obrambnih celic, zato mora biti vsaka celica sposobna odziva na povzročitelja bolezni. Posledica tega je, da so rastline odporne proti večini povzročiteljev bolezni. Dejansko obstaja malo »kompatibilnih« parov, pri katerih napad povzročitelja bolezni vodi v nastanek bolezenskih znakov. Vendar tudi pri občutljivih vrstah rastlin najdemo posamezne odporne sorte (Ebel in Mithöfer, 1998).

Poznavanje odnosa med rastlinami in povzročitelji bolezni je že dolgo predmet obsežnih raziskav, kajti le razumevanje tega odnosa omogoča iskanje ustreznih rešitev za zaščito rastlin pred povzročitelji bolezni. Kljub temu, da je bilo objavljenih že veliko raziskav s tega področja (večinoma pri navadnem repnjakovcu), odgovor rastlin na napad povzročiteljev bolezni še vedno ni v celoti pojasnjen (Ramonell in Somerville, 2002). Razlog za to je velika kompleksnost odnosa rastlina - povzročitelj bolezni.

Vpliv virusne okužbe na rastlino, zgodnje rumenenje listov pri konjski grivi (*Eupatorium makinoi*), ki ga je povzročila okužba z virusom, je bil opisan že v japonski pesnitvi iz 8. stoletja (Saunders in sod. 2003). Kljub zgodnjemu zavedanju problematike pa je interakcija rastlina – virus precej slabše poznana kot interakcije z bakterijami ali glivami.

Krompirjev virus Y^{NTN} (PVY^{NTN}), ki povzroča obročkasto nekrozo gomoljev krompirja (*Solanum tuberosum*), je razširjen po celi Evropi ter v mnogih drugih državah po svetu. Pridelek zmanjšuje bolj kot ostali virusi, pri občutljivih sortah pa vpliva tudi na kakovost pridelka. Za bolezen so dovzetne skoraj vse sorte krompirja. Ker se bolezen prenaša z listnimi ušmi, je tudi širjenje zelo hitro in ga je težko ustaviti (Kus, 1994).

Dosedanje raziskave so pokazale, da so različne sorte krompirja različno občutljive na PVY^{NTN}, vendar mehanizmi, ki privedejo do razlik v občutljivosti, niso natančno poznani. Med najbolj občutljive sorte sodi nekoč zelo priljubljena slovenska sorta 'Igor', pri kateri okužba z virusom povzroči razvoj izrazitih bolezenskih znamenj, tako na poganjkih kot na gomoljih (Kus, 1995). Pri odporni sorti 'Sante' odpornost izvira iz divje vrste krompirja *Solanum stoloniferum*.

Interakcija krompirja s PVY^{NTN} je zelo dobro raziskana na morfološkem in biokemijskem nivoju, ni pa še popolnoma razjasnjeno, kakšne so spremembe na nivoju izražanja genov, ki privedejo do opaženih sprememb. Posebej zanimivo je ugotavljanje morebitnih razlik na nivoju izražanja genov med občutljivimi in odpornimi sortami v zgodnjem odgovoru rastline na okužbo z virusom, saj gre tu v večji meri za odgovor rastline na okužbo in ne na posledice okužbe.

Mikromreže so med najbolj zmogljivimi metodami za ugotavljanje izražanja genov. Rezultati pridobljeni s to metodo, lahko v kombinaciji z metodo verižne reakcije s polimerazo (PCR) v realnem času, katera je sicer manj zmogljiva, a bolj natančna, lahko omogočijo natančnejši vpogled v interakcijo virus – rastlina.

Namen doktorskega dela je bil poglobiti razumevanje odgovora rastlin na okužbo z

virusom. V ta namen smo ugotavljali razlike v izražanju genov v zgodnjem odgovoru dveh različno občutljivih sort krompirja na okužbo s PVY^{NTN}. Hkrati smo razvili postopek, ki je omogočal pripravo kakovostne cDNA iz vzorcev rastlin krompirja in analizo cDNA z metodama PCR v realnem času in mikromreže ter optimizirali analizo podatkov, dobljenih z obema metodama.

1.1 CILJI DOKTORSKE NALOGE

- Ugotavljanje razlik v izražanju genov pri dveh sortah krompirja, ki sta različno občutljivi na PVY^{NTN}, v zgodnjem odgovoru na okužbo
 - študij profila izražanja genov z metodo mikromrež,
 - spremljanje izražanja izbranih genov (s patogenezo povezani proteini, proteinazni inhibitorji in proteini vročinskega šoka) z metodo PCR v realnem času.
- Uvedba in optimizacija metod za učinkovito in ponovljivo pripravo vzorcev za analizo z mikromrežami in PCR v realnem času.
- Razvoj metod za natančno in statistično zanesljivo analizo podatkov, pridobljeno z obema metodama.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ODGOVOR RASTLIN NA OKUŽBO

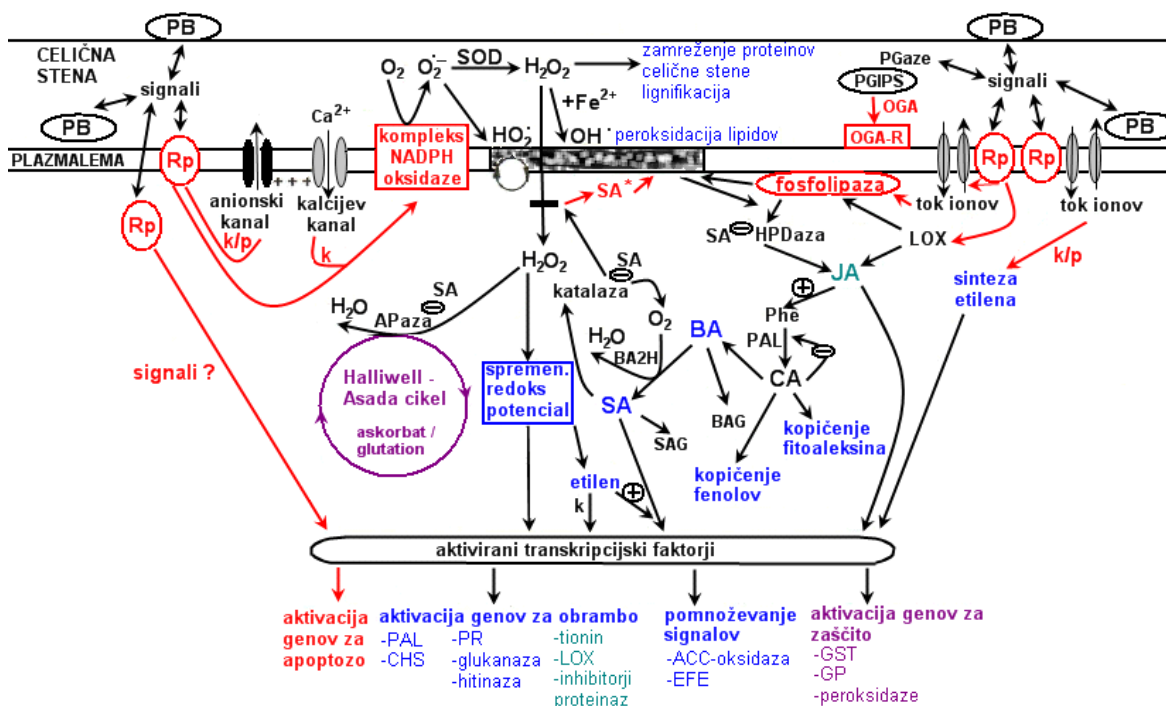
Rastline so v naravnem okolju stalno izpostavljene številnim povzročiteljem bolezni. Kljub temu redko pride do razvoja bolezni, saj so rastline razvile številne obrambne mehanizme, s katerimi povzročitelje bolezni prepoznavajo in se pred njimi branijo. Po drugi strani pa se tudi povzročitelji rastlinskih bolezni v procesu koevolucije prilagajajo, tako da lahko obidejo obrambni odgovor rastline (Mysore in Ryu, 2004).

Razumevanje odgovora rastlin na napad povzročitelja bolezni je v zadnjih letih zelo napredovalo, saj so napredovale tudi metode raziskovanja v celični biologiji, biokemiji, molekularni biologiji in genetiki. Vedno bolj očitno postaja, da je obramba pred povzročitelji bolezni v rastlinah funkcionalno, prostorsko in časovno zelo zapletena. 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 velikimi spremembami izražanja genov. Prostorska organizacija teh sprememb je prav tako zelo zapletena in vpliva na znotrajcelično porazdelitev na različne organele, preživetje celic in nenazadnje tudi na tkivo, ki obdaja mesto okužbe. Visoka dinamičnost odgovora na napad povzročitelja bolezni predstavlja še dodatno, časovno kompleksnost procesov (Somssich in Hahlbrock, 1998). Regulacija procesov se dogaja na dveh nivojih: na nivoju regulacije delovanja obstoječih encimov in na nivoju transkripcijske regulacije (Buckhout in Thimm, 2003).

Od hitrosti in obsega odgovora rastline je odvisen izid interakcije rastline s povzročiteljem bolezni (Benhamou in sod., 1996). Ta je lahko kompatibilna ali nekompatibilna. Pri nekompatibilni interakciji se pogosto razvijejo točkaste nekroze, ki onemogočajo ali vsaj zavirajo širjenje povzročitelja bolezni (Hinrichs-Berger in sod., 1999). Pri kompatibilni interakciji pa pogosto pride do razvoja bolezenskih znamenj, kar je posledica sposobnosti povzročitelja bolezni, da obide gostiteljeve obrambne odgovore. Čeprav v kompatibilni interakciji gostiteljeva obramba ni učinkovita, je odgovor na povzročitelja bolezni prisoten in prav tako kot pri nekompatibilni reakciji kompleksen (Maule in sod., 2000), vendar pa gre verjetno za prešibak ali prepozen odgovor, da bi preprečil razvoj bolezenskih znamenj (Talarczyk in Henning, 2001).

2.1.1 Obrambni odgovor rastline

Napad povzročitelja bolezni lahko v rastlini sproži obrambni odgovor, ki je zelo kompleksen in v katerega je vpletena vrsta signalnih poti, ki so med seboj prepletene (slika 1).



Slika 1: Kompleksnost signalnih poti, ki omogočajo aktivacijo obrambnih odgovorov (Hammond-Kosack in Jones, 1996).

Prikazane so znane komponente in signalne poti (označene z modro) in tiste, za katere predvidevamo, da so del obrambnega odgovora (označene z rdečo), komponente in signalne poti, ki jih inducira JA (označene z zeleno) in tiste, ki omogočajo zaščito rastlinske celice (označene z vijolično); (+) - pozitivna interakcija, (-) - negativna interakcija, ACC-oksிடaza - 1-aminociklopropan-1-karboksilat-oksிடaza, APaza - askorbat-peroksidaza, BA - benzojska kislina; BAG - glukozna skupina BA; BA2H - BA-2-hidroksilaza; CA - cimeta kislina; CHS - halkan-sintaza; EFE - encim za tvorbo etilena; HO₂[·] - radikal hidroperoksida; HPDaza - hidroksiperoksid-dehidraza; GP - glutation-peroksidaza; GST - glutation-S-transferaza; JA - jasmonska kislina; k - kinaza; LOX - lipoksigenaza; O₂⁻ - superoksidni anion; OH[·] - hidroksilni radikal; OGA in OGA-R - oligogalakturonidni fragment in receptor; p - fosfataza; PAL - fenilalanin/amunium liaza; PGaze - poligalakturonaze; PGIPS - inhibitorji poligalakturonske kisline; Phe - fenilalanin; PR - s patogenostjo povezani; Rp - receptorji; SA in SAG - salicilna kislina in glukozid-SA; SA^{*} - radikal SA; SOD - superoksid-dismutaza

Figure 1: Complexity of signalling events controlling activation of defense responses (Hammond-Kosack and Jones, 1996).

Obrambni odgovor rastline sproži neposredna ali posredna interakcija med produktom *R* gena rastline in produktom *Avr* gena povzročitelja bolezni. Odgovor je lahko preobčutljivostna reakcija (HR), ki vodi v programirano celično smrt, oksidativni stres, povišan nivo kalcija, fosforilacija proteinov ali sinteza s patogenostjo povezanih proteinov

(Birch in Kamoun, 2000).

Najzgodnejši odziv rastline na povzročitelja bolezní se dogaja na mestu vdora povzročitelja bolezní. Takoj po prepoznavanju povzročitelja, se v rastlini sproži kaskada sprememb, ki vključuje sintezo reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS), tok ionov, spremembo organizacije citoskeleta, fosforilacijo in defosforilacijo proteinov, sintezo dušikovega oksida in aktivacijo transkripcijskih faktorjev (TF), v nekaterih primerih tudi indukcijo programirane celične smrti. Vse omenjene zgodnje spremembe so neodvisne od prepisovanja in temeljijo na aktivaciji encimov in drugih kemijskih reakcijah (Talarczyk in Hennig, 2001).

v obrambnem odgovoru rastline na napad povzročitelja bolezní ima oksidativni stres različne vloge. Vodikov peroksid, ki ob tem nastane, deluje toksično na povzročitelje bolezní in sodeluje pri utrjevanju celične stene. Oksidativni stres ima lahko tudi signalno vlogo pri akumulaciji salicilne kisline (SA) in za aktivacijo nekaterih encimov (Hammond-Kosack in Jones, 1996).

Tok ionov, še posebej Ca²⁺ sproži kaskade proteinskih kinaz. Za obrambni odgovor specifični sta MAP-kinazi WIPK (wounding induced protein kinase) in SIPK (salicylic acid induced protein kinase), ki sprožita izražanje obrambnih genov, med drugim genov za transkripcijske faktorje WRKY in MYB (Eulgem in sod., 2005).

Zgodnjemu odzivu sledijo metabolne spremembe, ki vodijo v sintezo sekundarnih metabolitov, predvsem produktov fenilpropanoidne poti. Ti produkti delujejo antimikrobno, kot ojačevalci celične stene ali kot signalne molekule (npr. SA). Aktivirajo se tudi geni za sintezo s patogenostjo povezanih proteinov (PR-proteinov), z navzkrižnim povezovanjem glikoproteinov se ojačajo celične stene, hkrati pa se sintetizirajo se tudi številni novi proteini (Talarczyk in Hennig, 2001).

Aktiven odgovor rastline ima lahko tudi negativen vpliv na rastlino. ROS lahko delujejo toksično, zato jih je potrebno odstranjevati (peroksidaze). Zaradi močnega premika metabolizma iz primarnih v sekundarne metabolne poti se ustavijo nekateri procesi (Talarczyk in Hennig, 2001). Opaženo je bil npr. znižanje vsebnosti fotosinteznih encimov in upočasnjeno razmnoževanje celic (Sommsich in Hahlbrock, 1998). HR največkrat vodi v celično smrt, katera je omejena na mesto vdora patogena s procesom avtofagije (Liu in sod., 2005).

SA, jasmonska kislina (JA) in etilen so signalne molekule, ki po napadu povzročitelja bolezní vodijo v različne metabolne poti, posledica katerih je povečano izražanje genov, povezanih s patogenozo (Rushton in Somssich, 1998). Količina signalnih molekul se spreminja glede na vrsto povzročitelja bolezní, torej sam povzročitelj vpliva na to, kakšen obrambni odziv se bo sprožil v rastlini (Reymond in Farmer, 1998). Etilen in JA delujeta v isti signalni poti, medtem ko SA na signalno pot v kateri sodelujeta JA in etilen vpliva antagonistično (Feys in Parker, 2000).

Sinteza JA se v rastlini poveča pod vplivom lokalnih ali sistemskih signalnih molekul - elicitorjev (npr. oligosaharidi, oligouronidi, ki se sprostijo iz celične stene, sistemin ali abscizinska kislina), ki se sprostijo kot posledica napada povzročitelja bolezní in reagirajo z receptorji v plazmalemi, kar vodi v aktivacijo lipaze in posledično v sprostitvev linolenske kisline v citoplazmo. Linolenska kislina se nato v oktadekanoidni poti pretvori v JA

(Creelman in Mullet, 1997). Le-ta vpliva na izražanje genov preko TF in proteinskih kinaz (Menke in sod., 1999).

Obrambni odgovor v rastlini lahko sproži tudi sprememba v sestavi topnih sladkorjev v rastlini. 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 nivoja fotosinteze in sprožitev obrambnega odgovora v rastlini (Herbers in sod., 2000).

PR-proteini so rastlinski proteini, katerih sinteza se sproži po okužbi s povzročitelji bolezni ali v drugih stresnih situacijah. Akumulirajo se tako lokalno, v okuženem tkivu, kot tudi sistemsko, v neokuženih tkivih, kjer zavirajo rast, razmnoževanje in razširjanje povzročiteljev bolezni. Vlogo imajo lahko tudi pri rasti in razvoju rastlin. Ugotovili so, da se v različnih rastlinskih vrstah izražajo različni PR-proteini. Gre za raznolike proteine, ki so jih najprej odkrili pri HR tobaka (*Nicotiana tabacum*) v odgovoru na okužbo z virusom mozaika tobaka (TMV). PR-proteine razvrščajo v 14 skupin (van Loon in van Strien, 1999). Proteini iz družine PR-1 (najbolj raziskani pri tobaku in paradižniku, *Lycopersicon esculentum*) imajo zmerno protiglivno aktivnost, njihova natančna vloga pa ni poznana. Kljub temu je bilo ugotovljeno, da se nekateri proteini iz te družine specifično odzivajo na okužbo in so lahko markerji za sistemsko pridobljeno odpornost (SAR). Proteini PR-2 (β -1,3-glukanaza) ter PR-3, PR-4, PR-8, PR-11 (endohitinaze) so vključeni v obrambo rastlin proti glivam. Proteini PR-5 so taumatinu podobni proteini, ki povečajo prepustnost membran pri glivah. Proteini PR-6 so proteinazni inhibitorji (PI). Skupina proteinov PR-7 (endoproteinaze), ki so jih doslej odkrili samo v paradižniku, sodeluje pri obrambi proti glivam. Družina PR-9 (peroksidaze) je vpletena v lignifikacijo celične stene. Proteini iz družine PR-10 so intracelularni proteini velikosti 16 – 18 kDa, strukturno sorodni ribonukleazam, vendar je njihova vloga v celici neznan. Raziskave kažejo, da so vključeni v obrambni odgovor rastline, morda tudi v razvoj odpornosti (Poupard in sod., 2003). Proteini skupin PR-12, PR-13 in PR-14 (defenzini in tionini) delujejo na plazmalemo bakterij in gliv (van Loon in van Strien, 1999).

Izražanje proteinaznih inhibitorjev (PR-6) se v rastlini vzpodbudi s sintezo JA, kot posledica različni stresnih dejavnikov, kot so napad povzročiteljev bolezni in ranitev (Farmer in Ryan 1992). PI zavirajo delovanje proteinaz s tem, da se vežejo na aktivno mesto proteaze. Delimo jih glede na proteaze, ki jih inhibirajo: serinske, cisteinske, aspartatne in metaloproteaze. Pri rastlinah so najbolj razširjeni inhibitorji iz družine sojinega Kunitzovega tripsinskega inhibitorja in krompirjevega inhibitorja I (Mosolov in Vauleva, 2005). PI imajo vlogo pri regulaciji delovanja endogenih proteinaz, kar je pomembno pri kalitvi, metabolizmu proteinov, programirani celični smrti, HR ter staranju. Poleg tega lahko služijo kot založni proteini v semenu. Zelo zanimiva pa je njihova vloga v obrambi. Najbolj raziskana je vloga v obrambi pred herbivori, inhibicija aktivnosti prebavnih encimov žuželk. PI zavirajo tudi aktivnost prebavnih encimov glist in zunajceličnih encimov, ki jih izločajo glive (Mosolov in Vauleva, 2005).

Pomembno vlogo pri odgovoru na različne stresne dejavnike imajo proteini vročinskega šoka (Hsp). Gre za šaperone, šaperonine in košaperone, ki sodelujejo pri zvijanju novonastalih proteinov v celici. Pomen imajo tudi pri zaščiti rastlinske celice pred stresom,

saj zagotavljajo normalno konformacijo proteinov in tako celično homeostazo. Poznamo pet družin proteinov vročinskega šoka: družina Hsp70, družina šaperoninov (GroEL in Hsp60), družina Hsp90, družina Hsp100 (Clp) in družina majhnih proteinov vročinskega šoka (sHsp). Hsp se nahajajo v citoplazmi, jedru, mitohondrijih, kloroplastih in endoplazemskem retikulumu. Košaperoni z vezavo na šaperone regulirajo njihovo aktivnost ter pomagajo pri njihovem delovanju. Najbolj znan je košaperon Hsp40 (podoben bakterijskim košaperonom DnaJ, ki sodeluje s šaperoni Hsp70 in Hsp90. Različne skupine Hsp medsebojno sodelujejo, ter se dopolnjujejo v delovanju (Wang in sod., 2004).

Proteini družine šaperonov Hsp70 (67 - 76 kDa) skupaj s košaperoni (Hsp40 in GrpE) sodelujejo pri procesu zvijanja proteinov v skoraj vseh celičnih razdelkih. Njihova poglavitna naloga je preprečevanje agregacije denaturiranih proteinov in pomoč pri njihovem ponovnem pravilnem zvijanju v normalnih in stresnih pogojih. Poddružina družine Hsp70 je DnaK (podobni bakterijskim DnaK šaperonom, npr. Hsp70, Hsc70, Bip). Izražanje nekaterih Hsp70 je konstitutivno (npr. Hsc70), medtem ko se drugi izrazijo v odgovoru na stres. Nekateri so vpleteni v nadzor biološke aktivnosti že zvitih regulatornih proteinov in lahko delujejo kot negativni represorji transkripcije, ki jo posreduje faktor vročinskega šoka. Proteini Hsp70 imajo poleg splošne vloge kot šaperoni, vlogo tudi v regulaciji izražanja genov v stresnih situacijah.

Proteini družine Hsp60 (58 – 565 kDa; npr. Cpn60, CCT) so šaperonini, ki se nahajajo v mitohondrijih in plastidih. Njihova vloga je, da pomagajo, da na novo sintetizirani in translocirani proteini dosežejo svojo nativno strukturo.

Glavna naloga šaperonov Hsp90 (80-94 kDa; npr. Hsp90-1, Hsp90-5, Hsp82, Hsp80) je, da pomagajo pri zvijanju proteinov, po drugi strani pa ima pomembno vlogo v signalizaciji, v kontroli celičnega cikla, pri degradaciji proteinov in razmeščanju proteinov v celici. Delujejo skupaj s Hsp70 in košaperoni (med drugim tudi s Hsp40). Izražajo se konstitutivno, njihovo izražanje pa se lahko poveča v odgovoru na stres.

Šaperoni družine Hsp100, velikosti (80 – 110 kDa, npr. ClpB, ClpA, ClpD) delujejo pri disagregaciji in/ali razstavljanju proteinov, kar omogoča, da Hsp70 ponovno zviže protein.

Šaperoni sHsp so nizkomolekularni Hsp (12 - 40 kDa) in najpogostejši Hsp v rastlinah. Razdeljeni so v 6 poddružin, med katerimi se jih nekaj močno izraža. Velika raznolikost proteinov sHsp v rastlinah verjetno odraža način molekularne adaptacije rastlin na stresne pogoje, ki so edinstveni za rastline. Sami ne omogočajo ponovnega zvijanja denaturiranih proteinov, se pa lahko nanje vežejo in tako pomagajo sistemu Hsp70, da opravi to nalogo. Množina sHps in njihove lastnosti vezanja in stabilizacije denaturiranih proteinov kažejo, da igrajo sHps pomembno vlogo v pridobljeni toleranci rastlin na stres (Wang in sod., 2004).

2.1.2 Posebnosti odgovora rastline na okužbo z virusi

Biokemijske in fiziološke spremembe, ki so posledica okužbe, so pogojene z vrsto povzročitelja, saj različni povzročitelji vplivajo na različne signalne poti (Hammond-Kosack in Jones, 1996). Rastlinski virusi so obligatni paraziti, ki sami kodirajo le nekaj proteinov. Njihov vpliv na metabolizem rastlin pa je na dveh, med sabo težko ločljivih nivojih. Na eni strani izkoristijo rastlinske proteine, membrane in nukleinske kisline za svoje razmnoževanje in premikanje po rastlini, po drugi strani pa se rastline na prisotnost virusa odzovejo z obrambnim odgovorom, ki tudi vključuje različne proteine (Maule in sod., 2002).

2.1.2.1 Delovanje virusa

Virus vstopi v celice preko mehanske poškodbe in ob odsotnosti obrambnih mehanizmov se tu namnoži in razširi v druge celice skozi plazmodezme. Kot posledica virusnega širjenja in razmnoževanja se pri večini kompatibilnih interakcij razvijejo bolezenski znaki, ki vključujejo strukturne in fiziološke spremembe, te pa v končni fazi vodijo v zastoj rasti in razvoja celotne rastline (Maule in sod., 2002).

Zanimivo je, da različni virusi uporabljajo različne rastlinske proteine za svoje razmnoževanje in transport, prav tako pa so v post-transkripcijsko utišanje genov (PTGS) za različne viruse vključeni različni proteini (Nelson in Citovsky, 2005). Razmnoževanje virusa v rastlini je tesno povezano s procesi, ki so normalno prisotni v celici, medtem ko mora virus za svoje premikanje po rastlini spremeniti obstoječe procese v rastlini, kar pa seveda privede do metabolnih sprememb v rastlini. Translokacijo virusa omogočajo virusni gibalni proteini (MP), ki se v celici povezujejo z različnimi komponentami (pektin-metiltransferaze, mikrotubuli) (Maule in sod., 2002).

Rastlinski geni, za katere so ugotovili, da sodelujejo pri razmnoževanju in transportu virusov in so zato bolj izraženi po okužbi z virusi, so med drugimi: gen za translacijski iniciacijski faktor *eIF4E* (Leonard in sod., 2000), *Hsp101*, geni za protein ribosomskega kompleksa 60S, *Hsp70* in ubikvitin (Maule in sod., 2002). Indukcija izražanja slednjih genov je hitra in prehodna (Aranda in sod., 1996). V zgodnjem odgovoru na okužbo so opazili tudi prehodno znižanje izražanja številnih genov rastline (gene shut-off), kar je prilagoditev na prepisovanje in prevajanje virusnih proteinov (Aranda in Maule, 1998). Pri potivirusu virus mozaika repe (TuMV) so ugotovili, da je za izklop gostiteljevih genov odgovorna vezava virusnega proteina VPg na translacijski iniciacijski faktor IFiso4E (Leonard in sod., 2000), lahko pa gre tudi za aktivno razgradnjo RNA. Izklop genov preneha takoj, ko se virus namnoži (Aranda in Maule, 1995). Zaradi potreb pri premikanju virusa pa ostane nespremenjeno izražanje genov za elemente citoskeleta (aktin, tubulin) (Escaler in sod., 2000).

Okužba z virusi povzroča poleg lokalnih tudi sistemske spremembe, do katerih pride zaradi sprememb v transportu molekul (mRNA, makromolekule, signalne molekule, sladkorji). Pri kumari, okuženi z virusom mozaika kumare (CMV), so ugotovili povišano izražanje gena za od NADP odvisni encim jabolčne kisline (NADP-dependent malic enzyme) približno 20 celic stran od mesta okužbe, kar naj bi pripravilo celice na povišane potrebe za biosintezo virusnih komponent (Havelda in Maule, 2000). Poleg omenjenega encima so

opazili sistemsko indukcijo genov za glutation-reduktazo, katalazo, peroksidaze, superoksid-dismutazo, s patogenostjo povezanih proteinov in glutation-S-transferaze (Maule in sod., 2002). V končni fazi kompatibilna reakcija vodi v izgubo fotosintezne aktivnosti, povečano respiracijo ter spremenjeno razporejanje ogljikovih hidratov in nalaganje škroba (Maule in sod., 2002).

2.1.2.2 Odpornost rastlin proti virusom

Mehanizem odpornosti proti rastlinskim virusom še ni v celoti pojasnjen, poznamo pa dva tipa odpornosti (Soosaar in sod., 2005):

- a) od R proteinov odvisna odpornost, ki vključuje HR in SAR in
- b) post-transkripcijsko utišanje genov (PTGS).

R proteini za odpornost proti različnim vrstam virusov so strukturno zelo podobni in imajo na N-terminalnem koncu z levcinom bogate ponovitve. R protein Y-1 povzroča odpornost krompirja na PVY, vendar njegova vloga še ni natančno pojasnjena (Vidal in sod., 2002). Eno od možnosti prepoznavanja Avr proteinov povzročiteljev bolezni opisuje t.i. »varovalna teorija«: Avr protein deluje na varovani protein rastline in zaradi spremenjene povezave med varovalnim (R) in varovanim proteinom, se sproži obrambni odgovor rastline. Tako lahko rastlina z majhnim številom različnih R proteinov, v genomu navadnega repnjakovca (*Arabidopsis thaliana*) naj bi jih bilo le 200, odgovarja na številne viruse (Soosaar in sod., 2005). R proteini so v celici povezani s Hsp90 in drugimi šaperoni, ki verjetno omogočajo stabilnost R proteinov in so zato nujni za odpornost na viruse (Liu in sod., 2004).

SA je vpletena v zaviranje pomnoževanja in sistemskega premikanja virusa po rastlini tako, da znižuje izražanje rastlinskih genov, ki nosijo zapis za rastlinske faktorje in sodelujejo pri razmnoževanju in razširjanju virusa po rastlini, ali pa povzroči kopičenje inhibitorjev virusnega razmnoževanja in razširjanja. SA vpliva tudi na izražanje s patogenostjo povezanih genov (Murphy in sod., 1999). Pri s SA inducirani odpornosti ima pomembno vlogo alternativna oksidaza, ki verjetno deluje na viruse preko spremembe mitohondrijskega in/ali celičnega redoks stanja in nadzora tvorbe ROS ali preko regulacije programirane celične smrti (Murphy in sod., 1999).

V programirano celično smrt, ki sledi HR, so vključene kaspazam podobne proteaze, ena med njimi je VPE (Hatsugai in sod., 2004), in ubikvitin. Za razliko od HR, ki se pojavi na mestu okužbe, so SAR opazili v neokuženih tkivih. Signalizacija, ki vodi v SAR, ni poznana, čeprav je tudi tu vključena SA (Soosaar in sod., 2005).

PTGS je evolucijsko star mehanizem odpornosti proti virusom. Rezultat te odpornosti je, da so na novo zrasli listi okužene rastline brez bolezenskih znakov. PTGS deluje na osnovi prepoznavanja nukleinskih kislin preko parjenja baz in vodi v specifično razgradnjo homologne RNA. Sprožijo ga lahko virusi, transgeni ali edogeni. Dvovijačna RNA in sparjeni odseki komplementarne RNA, ki nastajajo med podvajanjem virusnega genoma, so glavni prožilci RNA utišanja genov (Rovere in sod., 2002).

Opazili pa so tudi, da ima virus mehanizme, s katerimi se lahko upre gostiteljevi odpornosti. Primer takega mehanizma je potivirusni protein HC-Pro, ki zavira delovanje

razgradnje virusne RNA (Brigneti in sod., 1998). Virusna aktivacija rastlinskega proteina P58^{IPK} pa na primer omogoči preživetje gostiteljske rastline in tako nadaljnje razmnoževanje virusa (Bilgin in sod., 2003).

2.1.3 Odgovor rastline na okužbo z virusom PVY^{NTN}

2.1.3.1 Krompirjev virus Y^{NTN}

Krompirjev virus Y (PVY) uvrščamo v rod *Potyvirus* iz družine *Potyviridae*. Potivirusi so sestavljeni iz ene molekule RNA, ki jo obdaja 2000 molekul plaščnega proteina. Genom potivirusov sestavlja linearna, enoverižna, pozitivno usmerjena RNA z dolžino okoli 10000 baz. RNA se prevede v en sam 340 – 370 kDa velik poliprotein, ki se med in po translaciji razreže na naslednje proteine: P1, Hc-Pro, P3, CI, NIa, NIB in CP. Ti proteini sodelujejo pri cepitvi vezi v poliproteinu (P1, Hc-Pro, NIa), razmnoževanju virusa (P3, NIa), premikanju virusa (CI, NIa) ali vezavi na rastlinsko RNA (NIB). Protein CP tvori plašč virusne RNA. Pri okužbi se protein CP veže na rastlinsko celico, zato določa specifičnost gostiteljev. Vključen je tudi v premikanje virusa po rastlini, bodisi preko uravnavanja velikosti plazmodezm ali kot MP, v prenos z listnimi ušmi in regulacijo pomnoževanja virusa. Hc-Pro zavira delovanje obrambnega sistema rastline, usmerjenega proti virusni RNA ali pomnoževanju virusa, ter sodeluje pri prenosu iz rastline v rastlino z listnimi ušmi (Urcuqui-Ichima in sod., 2001).

Krompirjev virus Y ima več različkov, ki jih razvrščamo v skupine: PVY^O, PVY^C in PVY^N (Kus, 1994).

PVY^{NTN} je zelo agresiven in virulenten različek virusa PVY, ki povzroča obročkasto nekrozo gomoljev krompirja. Prenaša ga več vrst listnih uši (do sedaj je znanih najmanj 28 vrst), redkeje se lahko prenese tudi z dotikom. Obročasto nekrozo gomoljev krompirja so prvič opazili leta 1979 na Madžarskem in kmalu se je razširila po vsem svetu. V Sloveniji se je pojavila leta 1988. Od takrat se je močno razširila tudi na druge rastline iz družine razhudnikovk (Kus, 1994). To je nedvomno ena od bolezní, ki so slovenskim pridelovalcem krompirja povzročile največjo škodo (Kus, 1995). Epidemija krompirjevega virusa Y^{NTN} je skoraj popolnoma uničila pridelavo semenskega krompirja. Bolezen je najbolj prizadela sorto 'Igor', ki je takrat predstavljala 60% celotne pridelave jedilnega krompirja v Sloveniji. Tri leta po pojavu bolezní so pri nas to sorto prenehali pridelovati (Kus, 1995).

Bolezenska znamenja, ki se pokažejo po primarni okužbi, so pri različnih sortah različna. Na primarno okuženih listih se pojavijo točkaste nekroze, na listnih žilah pa črtaste nekroze. Pri nekaterih sortah se črtaste nekroze pojavijo tudi na listnih pecljih in stebelu. Na sistemsko okuženih listih, ki se razvijejo nad okuženimi, se na listih pojavi rumen mozaik, listna površina pa postane kodrava. Zaradi predčasnega staranja in odpadanja spodnjih listov rastline kažejo bolezenska znamenja palmovega drevesa. Rastline zaostajajo v rasti za zdravimi rastlinami. Pri rastlinah, ki zrastejo iz okuženih gomoljev, se razvijejo sekundarna bolezenska znamenja, ki so milejša. (Kus, 1994). Pri nekaterih sortah se

bolezenska znamenja pojavijo tudi na gomoljih: izbočeni obroči ali nabrekline temnejše barve, se čez nekaj časa posušijo, vdrejo in postanejo črne. Pri najbolj občutljivih sortah se plast rjavega tkiva pod površinskimi nekrozami širi v notranjost (Kus, 1994).

Sorta 'Igor' je na PVY^{NTN} zelo občutljiva. Bolezenska znamenja se pojavijo tako na nadzemnem delu rastline kot na gomoljih. Nekoliko manj je občutljiva sorta 'Désirée', ki ima bolezenska znamenja na nadzemnem delu rastline in na manjšem številu gomoljev (Kus, 1994). Sorta 'Pentland Squire' je za virus sicer dovzetna, saj se virus po rastlini lahko širi, vendar je za virus tolerantna, saj je posledica okužbe le zmanjšana rast rastlin.

Sorti 'Sante' in 'Carlingford' sta odporni proti okužbi s PVY^{NTN}. Pri sorti 'Carlingford' je odpornost verjetno poligenska. Geni za rezistenco med drugim kodirajo z glicinom bogate proteine in nukleotid-vezavne proteine, ki sodelujejo pri prepoznavanju povzročitelja boleznin in odgovoru rastline na okužbo (Baker in sod., 1997).

Sorta 'Sante' ima s klasičnim križanjem vnesen dominanten gen za odpornost *Ry_{sto}*, ki je bil izoliran iz divje vrste krompirja *Solanum stoloniferum*. Rastline, ki nosijo ta gen, ne razvijejo bolezenskih znakov (Mehle in sod., 2004). Virus tako sicer vstopi v celico, vendar se premakne le v sosednje celice, kjer sproži HR, ki zaustavi širjenje virusa v druge dele rastline (Hinrichs in sod., 1998). Odpornost se kaže že na nivoju protoplastov (Barker in sod., 1984), kar kaže na to, da je mehanizem odpornosti morda inhibicija razmnoževanja virusa ali destabilizacija virusa (Brigneti in sod., 1997).

2.1.3.2 Raziskave interakcije krompirja in PVY^{NTN}

Interakcije različnih sort krompirja s PVY^{NTN} so že nekaj časa predmet intenzivnih raziskav. Raziskave so potekale na rastlinah gojenih v tkivni kulturi ali v substratu (zemlji ali pesku) v rastni komori, na primarno in sekundarno okuženih rastlinah. Primerjava zbranih rezultatov je zahtevna. Izkazalo se je namreč, da so sorte, ki so sicer za PVY^{NTN} zelo občutljive, med gojenjem v tkivni kulturi manj občutljive za ta virus (Dermastia in Ravnikar, 1996). Kljub temu so bile sekundarno okužene rastline krompirja sorte 'Igor', gojene v tkivni kulturi, manjše od zdravih rastlin. Imele so manjše stebelne meristeme v katerih je bila, v primerjavi z meristemi zdravih rastlin manjša mitotska aktivnost (Dolenc in sod., 2000). Po okužbi krompirja sorte 'Igor' sta se spremenila tudi število in struktura kloroplastov (Pompe-Novak in sod., 2001).

Mehle in sodelavci (2004) so z metodami DAS-ELISA, odtis tkiva (tissue printing), elektronsko mikroskopijo in metodo verižne reakcije s polimerazo (PCR) v realnem času spremljali širjenje PVY^{NTN} pri sortah krompirja, ki so na ta virus različno občutljive. V krompirju sort 'Igor', 'Désirée' in 'Pentland Squire' se je virus v štirih do petih dneh po inokulaciji namnožil v inokuliranih listih. V šestih do osmih dneh se je virus iz inokuliranih listov razširil, najprej v steblo, nato pa v zgornje, neinokulirane liste in v korenine. V odporni sorti 'Sante' se virus ni množil. Med uporabljenimi metodami detekcije virusa je bila metoda PCR v realnem času najbolj občutljiva.

Okužba rastlin krompirja je spremenila vzorec izražanja proteinov, vendar pa so bile spremembe odvisne od sorte krompirja. Dva tedna po okužbi je bila pri sorti 'Igor'

koncentracija proteinov v soku okuženih rastlin trikrat višja kot v soku zdravih rastlin, pri sortah 'Désirée', 'Pentland Squire' in 'Sante' pa je bila razlika med okuženimi in zdravimi rastlinami manjša. Po inokulaciji se je v okuženih rastlinah sorte 'Igor' na novo pojavilo ali močnejše izrazilo 9 različnih proteinov, pri rastlinah sorte 'Désirée' 2 in pri rastlinah sorte 'Pentland Squire' 3 različni proteini. Pri sorti 'Sante' se noben protein ni na novo pojavil ali močnejše izrazil (Gruden in sod. 2000). V nasprotju s temi podatki pri rastlinah sorte 'Igor' 5 dni po inokulaciji niso opazili večjih razlik v količini topnih in ionsko vezanih proteinov med okuženimi in neokuženimi rastlinami (Semprimožnik, 1999). Pri sorti 'Igor' se je po okužbi spremenila aktivnost topnih, ionsko in kovalentno vezanih peroksidaz. Zgodnje povišanje aktivnosti peroksidaz (24 ur po inokulaciji) kaže na obrambni odgovor rastline. Spremembe aktivnosti teh encimov ob pojavu bolezenskih znamenj so verjetno povezane s spremembami zaradi okužbe (Semprimožnik, 1999). 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 (Anžlovar in sod. 1996). V nasprotju je Mojca Semprimožnik (1999) v svojem magistrskem delu opisala znižanje celokupne količine fotosintetskih pigmentov tudi pri sorti 'Igor', kar sovпада s pojavom bolezenskih znakov in namnožitvijo virusa v rastlini (Mehle in sod., 2004).

Povišanje relativne vsebnosti karotenoidov glede na klorofil v rumenih listih in listih s primarnimi bolezenskimi znamenji (Milavec in sod., 2001) je ena od značilnosti staranja. To nakazuje, da je pri sorti 'Igor' posledica primarne okužbe med drugim tudi proces, podoben staranju.

Okužba s PVY^{NTN} je vplivala tudi na vsebnost endogenih rastlinskih regulatorjev. V primarno in sekundarno okuženih rastlinah krompirja sorte 'Igor' gojenih v substratu v rastni komori je razmerje med aktivnimi in neaktivnimi citokinini nižje kot v neokuženih rastlinah. Pri sorti 'Sante' razlik med okuženim in neokuženimi rastlinami (Dermastia in sod. 1995) ni bilo. Pri sekundarno okuženih rastlinah krompirja sorte 'Igor', gojenih v tkivni kulturi, se je pod vplivom okužbe spremenila količina endogene jasmonske kisline; znižala se je v poganjkih in zvišala v poganjkih (Petrovič in sod., 1997). Pri sorti 'Igor' se je 24 ur po inokulaciji s PVY^{NTN} v spodnjih inokuliranih listih in zgornjih intaktnih listih povišala količina SA, ne pa njenega derivata, gentijske kisline (GA), 11 dni po inokulaciji pa se je 3-kratno povišala količina SA in 2-kratno GA, kar pa naj ne bi bilo povezano z neposrednim odgovorom na okužbo, ampak bolj s splošnim odgovorom na stres (Krečič Stres in sod., 2005). Po tretiranju krompirja sorte 'Igor' z 1 mM SA se je delno inducirala odpornost proti PVY^{NTN}, kar se je kazalo v zakasnitvi pojavljanja in manjši izraženosti bolezenskih znakov (Krečič Stres, 2001).

V primarno okuženih rastlinah sorte 'Igor' gojenih v substratu v rastni komori se je zmanjšalo kopičenje rutina, medtem ko v rastlinah sort 'Désirée' in 'Sante' ni bilo sprememb (Kreft in sod. 1999).

Pompe Novak (2002) je v svojem doktorskem delu preučevala odziv 187 genov, natisnjenih na lastno izdelani mikromreži, v poznem odgovoru na okužbo s PVY^{NTN} (ob pojavu primarnih in sekundarnih bolezenskih znamenj). Pri sorti 'Igor' so bile najbolj izrazite razlike v vzorcu izražanja genov 14 dni po inokulaciji, ob pojavu sekundarnih bolezenskih znakov ter v listih iz sekundarno okuženih rastlin. Najbolj različno izraženi so bili geni za Hsp, katalazo 1, β -1,3-glukanazo, z ranitvijo izzvanega gena in geni, ki so

vkjučeni v fotosintezo (Pompe Novak in sod., v tisku). Primerjava izražanja genov med različno občutljivimi sortami ('Igor', 'Désirée', 'Pentland Squire', 'Carlingford' in 'Sante') 5 dni po inokulaciji je pokazala, da se te sorte različno odzivajo na okužbo (Pompe Novak, 2002).

2.2 METODE ZA ŠTUDIJ IZRAŽANJA GENOV PRI ODGOVORU RASTLINE NA OKUŽBO

Prva in ključna faza študija odgovora rastline na okužbo je prepoznavanje razlik v izražanju genov po okužbi (Birch in Kamoun, 2005). Za študij izražanja genov v odgovoru rastline na okužbo je bilo uporabljenih že kar nekaj metod. Metode, ki omogočajo paralelno analizo več genov, včasih celo analizo celotnega transkriptoma, temeljijo bodisi na ločevanju produktov PCR z gelsko elektroforezo, hibridizaciji (mikromreže, odvzemne knjižnice), sekveniranju ali bioinformatiki obdelavi dostopnih podatkov iz knjižnic izraženih oznak zaporedja (expressed sequence tags, EST) (Baldwin in sod., 1999).

Ena izmed najstarejših metod za ugotavljanje izražanja genov je northern prenos. Le-ta je bil razvit na osnovi hibridizacije po Southernu in daje kvantitativne rezultate o količini mRNA v vzorcu, vendar pa omogoča opazovanje le nekaj genov hkrati. Uporabljen je bil npr. pri ugotavljanju sprememb v izražanju nekaterih genov graha po okužbi z virusom mozaika graha, ki se prenaša s semenom (PSbMV) (Escaler in sod., 2000), pogosto pa se uporablja v kombinaciji z drugimi tehnikami npr. mikromrežami (Senthil in sod., 2005).

Metode diferencialni prikaz (differential display, DD), raznolikost dolžin pomnoženih delov (cDNA-AFLP) in PCR z naključnimi oligonukleotidi (AP-PCR) združujejo metodi PCR in elektroforezo na poliakrilamidnem gelu. Razlikujejo se v uporabi začetnih oligonukleotidov za obratno prepisovanje (RT) in PCR (Birch in Kamoun, 2000). Te metode so bile uspešno uporabljene za študij odgovora rastlin na okužbo z virusi: DD so uporabili za identifikacijo genov, ki so bili bolj izraženi po okužbi navadnega repnjakovca z virusom mozaika cvetače (CaMV) (Geri in sod., 1999), in tobaka s TMV (Yamaguchi in sod., 2003). cDNA-AFLP so uporabili za študij HR na TMV pri metliki (*Chenopodium amaranticolor*) (Cooper, 2001). Prednost teh metod je njihova preprostost in dejstvo, da za njihovo izvedbo ni treba poznati nukleotidnega zaporedja iskanih genov. Slabost omenjenih metod pa je razmeroma majhna količina transkriptov, ki jih lahko analiziramo, saj je odvisna predvsem od različnih kombinacij začetnih oligonukleotidov PCR (Birch in Kamoun, 2000).

Razvoj metod sekveniranja je omogočil analizo transkriptov s pomočjo analize klonov EST. »Digitalni« prenos northern omogoča izračun izražanja posameznega gena glede na njegovo prisotnost v bazah EST. Metoda je pogosto uporabljena za validacijo rezultatov, dobljenih z mikromrežami (Shi in sod., 2005).

Na sekveniranju temelji tudi metoda zaporedne analize izražanja genov (SAGE), ko cDNA razrežemo s številnimi encimi, ligiramo in določimo njihovo zaporedje. Iz pogostosti pojavljanja posameznih sekvenc lahko sklepamo na relativno vsebnost posamezne mRNA (Birch in Kamoun, 2000). Metodo SAGE so uporabili pri raziskavah rezistence kasave

(*Manihot esculenta*) na virusno bolezen mozaika kasave (Fregene in sod., 2004). Metoda, ki prav tako temelji na sekveniranju, je MPSS (massively parallel signature sequencing), vendar pa je omejena na vrste, za katere je dostopno nukleotidno zaporedje celotnega genoma, kot sta navadni repnjakovec in riž (*Oryza sativa*) (Rensink in Buell, 2005).

Zanimiv pristop pri identifikaciji različno izraženih genov je uporaba odvzemne hibridizacije (subtractive hybridisation) in priprava odvzemnih knjižnic. Slednje vsebujejo populacijo molekul, katere odgovarjajo tistim mRNA, ki jih je v enem vzorcu več kot v drugem. To metodo so uporabili za izolacijo bolj izraženih genov v HR krompirja na glivo *Phytophthora infestans* (Birch in sod., 1999). Sama metoda ni kvantitativna, odlična pa je v zaporedni povezavi z mikromrežami, saj jo lahko uporabimo za izbor cDNA za nanos na mikromreže (Shi in sod., 2005).

Trenutno najmočnejše orodje za preučevanje izražanja genov je uporaba mikromrež. Te omogočajo analizo izražanja cele populacije genov hkrati in temeljijo na primerjavi populacij mRNA poskusnega in kontrolnega objekta in sicer s hibridizacijo odgovarjajočih populacij cDNA na točke DNA, ki odgovarjajo posameznim genom.

Poleg zgoraj omenjenih metod je za spremljanje izražanja genov izredno pomembna metoda PCR v realnem času. Ta metoda sicer ne omogoča spremljanja izražanja celotnega transkriptoma, vendar zaradi visoke občutljivosti in možnosti avtomatizacije prav tako znatno prispeva k poznavanju odgovora rastline na okužbo. Slednji metodi sta opisani v naslednjih poglavjih (2.2.1 in 2.2.2).

2.2.1 Mikromreže

Mikromreže so zbirka sistematično urejenih molekul (oligonukleotidi, produkti PCR, plazmidi, genomska DNA), pritrjenih na podlago. Metoda temelji na hibridizaciji v kombinaciji z miniaturizacijo in fluorescentnim označevanjem (Aharoni in Vorst, 2002). Na eni mikromreži v velikosti objektnega stekelca je lahko nanosenih do 50000 elementov. Vsak element odgovarja nukleotidnemu zaporedju enega gena in s hibridizacijo cDNA vzorca na mikromreže lahko ugotovljamo količino odgovarjajoče mRNA v vzorcu (Barret in Kawasaki, 2003). Trenutno obstajajo tri platforme mikromrež:

- a) cDNA-mikromreže
- b) mikromreže s kratkimi oligonukleotidi (bio-čipi) in
- c) mikromreže z dolgimi oligonukleotidi.

Pri cDNA mikromrežah so na objektno stekelce v točkah robotsko naneseni s PCR pomnoženi deli cDNA, ki odgovarjajo posameznim genom. Na bio-čipih so oligonukleotidi sintetizirani na podlagi, z metodo fotolitografije. Oligonukleotidi so navadno dolgi 25 nukleotidov, na enem čipu je 11 – 20 oligonukleotidov za vsak gen. Tehnologija, ki se je razvila v zadnjem času, pa so mikromreže s sintetičnimi, 40 – 80 nukleotidov dolgimi oligonukleotidi. Le-ti so na objektnik naneseni z robotom, podobno kot pri cDNA mikromrežah (Barret in Kawasaki, 2003). Vsaka od omenjenih platform ima svoje prednosti in slabosti. V zadnjem času je popularna posebej slednja, saj združuje fleksibilnost cDNA mikromrež ter natančnost in ponovljivost oligonukleotidnih mikromrež (Barret in Kawasaki, 2003). Kljub napredku razvoja metod, pa so podatki o izražanju pridobljeni z različnimi platformami slabo primerljivi. Po tretiranju navadnega repnjakovca

s SA so na treh različnih platformah ugotovili enako izražanje le pri 67 odstotkih opazovanih genov (Pylautik in Fobert, 2005).

Mikromreže so zaenkrat najbolj uporabne v medicini. Z njimi namreč lahko ugotavljamo mehanizme delovanja zdravil, raziskujemo in napovedujemo odziv pacienta na določeno bolezen ali zdravljenje ter spoznavamo in diagnosticiramo bolezni. Pomembne so tudi pri zagotavljanju varnih zdravil, vakcin in hrane (Pietrovski in sod., 2002).

V rastlinski biologiji so poleg študija izražanja genov mikromreže uporabili tudi za detekcijo in prepoznavanje rastlinskih povzročiteljev bolezni (Boonham in sod., 2003; Bystricka in sod., 2005) ter za ugotavljanje sprememb v genomu pri mutantah in gensko sremenjenih rastlinah (Aharoni in Vorst, 2002).

Za študij izražanja genov pri rastlinah so mikromreže prvič uporabili Schena in sodelavci (1995), ki so opazovali izražanje 45 genov pri navadnem repnjakovcu. Pri isti vrsti je bila izvedena tudi večina študij, ki so sledile (pregled v Fiehn in sod., 2001). Kmalu so se raziskave razširile tudi na druge ekonomsko pomembne rastline kot so jagode (*Fragaria* sp.), fižol (*Phaseolus lunatus*), koruza (*Zea mays*), riž (pregled v Aharoni in Vorst, 2002), tobak (Vranova in sod., 2002), krompir (Ros in sod., 2003, Ducreux in sod., 2005), nižinski južnoameriški bor (*Pinus taeda*) (Watkinson in sod., 2003), paradižnik (Gibly in sod., 2004), ječmen (*Horedum vulgare*) (Atienza in sod., 2004), trta (*Vitis vinifera* cv. Shiraz; Waters sod., 2005), če omenimo le nekatere.

Problem uporabe mikromrež cDNA pri rastlinah je nezadostno poznavanje rastlinskega genoma. Do sedaj je poznano celotno nukleotidno zaporedje le za navadni repnjakovec in riž, delno pa za topol (*Populus* sp.), trnato meteljko (*Medicago truncatula*), nokoto (*Lotus* sp.), paradižnik in koruzo (Rensink in Buell, 2005). Prav zato ima vsaj 5% natisnjenih cDNA napačno pripisano funkcijo na osnovi zaporedja (Wan in sod., 2002).

2.2.1.1 Priprava in hibridizacija cDNA mikromrež

Priprava mikromrež vključuje izbiro in pripravo cDNA za nanos ter točkovno nanašanje cDNA. Sonde cDNA, ki so nanesene na mikromreže so lahko naključno izbrane cDNA iz genskih knjižnic ali knjižnic EST. Odvzemne knjižnice so lahko metoda za ciljano izbiro cDNA za nanašanje na mikromreže. Pred nanašanjem cDNA navadno očistijo in koncentrirajo (Aharoni in Vorst, 2002).

Tiskanje na podlago izvedejo roboti z eno iglo ali mrežo igel (do 48 igel). Igle se potopijo v raztopino molekul cDNA in jih nato natisnejo na podlago. Obstajata dva načina tiskanja. Pri kontaktnem načinu se igla dotakne podlage in na ta način pusti kapljico cDNA na podlagi. Pri drugem, nekontaktnem načinu, pa se igla ne dotika podlage, ampak kapljica brizgne iz igle pod vplivom elektromagnetnega valovanja ali nadtlaka. Pri kontaktnem tiskanju je volumen nanesenih kapljic od nekaj nl do nekaj μ l, premer nanesenih točk pa okoli 100 μ m. Pri tem načinu tiskanja je gostota natisnjenih točk največ 2500 točk na cm^2 . Pri nekontaktnem tiskanju je volumen kapljic od nekaj pl do nekaj μ l, gostota nanosa pa od 250 do 1000 točk na cm^2 . V vseh primerih je tiskanje računalniško nadzorovano (Aharoni in Vorst, 2002).

Na cDNA-mikromrežo navadno hibridiziramo hkrati dva vzorca, ki sta označena z

različnimi barvili. Tako primerjamo izražanje genov v obeh vzorcih. Direktno primerjavo med več vzorci pa lahko dosežemo s tem, da vse vzorce primerjamo z referenčnim vzorcem (npr. združen biološki material) (Dobbin in sod., 2003).

Pred hibridizacijo je RNA ali mRNA prepisana v cDNA. Sledi označevanje in hibridizacija pripravljene tarčne cDNA na površino mikromreže. Kvaliteta in čistost RNA vzorca vpliva na vse nadaljnje faze kot so sinteza cDNA, označevanje in hibridizacija (Duggan in sod., 1999).

Označevanje cDNA omogoča zaznavanje relativne količine le-te z optičnim branjem. Poznamo tri glavne načina označevanja. Pri direktnem označevanju se med RT v cDNA verigo vključijo fluorescenčno (najpogosteje cyanine3 - Cy3 in cyanine5 - Cy5) ali radioaktivno (npr. [³²P]dATP) označeni nukleotidi. Pri indirektnem označevanju se RNA najprej prepíše v cDNA, ki je označena z aminoalil-nukleotidi. Na te se kasneje vežejo fluorescentni Cy3 ali Cy5 estri (Duggan in sod., 1999). Ti dve standardni metodi zahtevata za uspešno hibridizacijo kar 50 – 200 µg celokupne RNA, kar je v nekaterih primerih omejujoč dejavnik eksperimenta. Občutljivost metode lahko povečamo s pomnoževanjem bodisi tarče, bodisi signala. Čeprav se je pomnoževanje RNA izkazalo za izredno učinkovito (Hertzberg, 2001), se je v zadnjih letih pojavila nova tehnologija označevanja z dendrimeri. Metoda temelji na sintezi repkov med RT, na katere se med hibridizacijo vežejo fluorescentna barvila. Na vsak repek na molekuli cDNA se veže do 800 molekul barvila, kar omogoča učinkovito ojačanje signala brez pomnoževanja RNA (Stears in sod., 2000). Metoda označevanja z dendrimeri je bila uspešno uporabljena pri navadnem repnjakovcu (Badiee in sod., 2003), in pri vrsti tobaka *Nicotiana benthamiana* (Senthil in sod., 2005).

Pred hibridizacijo združimo oba različno označena vzorca. Hibridizacija poteka navadno pod objektnikom (volumen 5 – 50 µl) v zaprti hibridizacijski komori ali v hibridizacijski aparaturi. Pogoji hibridizacije so odvisni od uporabe in kemije same mikromreže. Temperatura hibridizacije je od 42° (pri uporabi pufrov s formamidom) do 70 °C (s pufri z raztopino natrijevega klorida in natrijevega citrata, SSC). Hibridizacija pa navadno poteka od 4 do 16 ur. Po hibridizaciji mikromreže optično preberemo pri dveh valovnih dolžinah s CCD ali z laserskimi optičnimi čitalniki (Aharoni in Vorst, 2002).

2.2.1.2 Analiza podatkov cDNA-mikromrež

Mikromreže so ena izmed metod, s katerimi v enem eksperimentu dobimo ogromno količino podatkov. Zato v današnjem času ni več glavni izziv razvoj metod za pridobivanje podatkov, temveč njihova obdelava in interpretacija (Fiehn in sod., 2001).

Sliko, dobljeno z optičnim branjem, najprej analiziramo s programi za obdelavo slike. Na sliko postavimo mrežo, točkam pripišemo imena pripadajočih cDNA, izračunamo povprečno vrednost signalov v posamezni točki nanosene DNA pri obeh valovnih dolžinah, odštejemo ozadje ter izločimo točke slabe kvalitete (Aharoni in Vorst, 2002).

Ozadje na rastlinskih mikromrežah lahko določimo iz vrednosti signalov točk s cDNA kvasovk, človeka ali bakterij, signalov mest brez cDNA ali signalov ozadja točk. Globalno ozadje je povprečno ozadje na celi mikromreži, medtem ko lokalno ozadje izračunamo iz okolice (obroč, koti ipd.) posamezne točke (Aharoni in Vorst, 2002). V programu za

obdelavo slike določimo tudi točke slabe kvalitete glede na njihovo obliko, vrednost signala glede na ozadje in druge parametre. Take točke izključimo iz nadaljnjih analiz (Alba in sod., 2003).

Naslednji korak v obdelavi podatkov je normalizacija. Gre za odstranitev lokalnih in sistemskih napak signalov zaradi neenakomernega vključevanja ali emisije fluorescentnih barvil, pa tudi zaradi neenakih količin obeh nanesenih vzorcev. Vrednosti signalov lahko normaliziramo glede na kontrolne točke (eksterna cDNA), ali točke z vzdrževalnimi (housekeeping) geni (npr. 18 S rRNA). Pogosta je normalizacija glede na signale vseh točk, ki temelji na predpostavki, da se izražanje večine genov ne spremeni. Zato taka normalizacija ni primerna pri mikromrežah z majhnim številom točk. Pri linerani normalizaciji normaliziramo razmerje izražanja genov na 1. Nelinearna lowess (locally weighted linear regression) normalizacija (Quackenbush, 2002) je ena najpogosteje uporabljenih metod normalizacije. Izpeljanka slednje je »print-tip-lowess« normalizacija, ko so med sabo normalizirane točke, ki so bile nanešene z eno robotsko iglo.

Iz normaliziranih podatkov nato izračunamo razmerje med vzorcema, katerih izražanje primerjamo na mikromreži. To razmerje navadno pretvorimo v \log_2 vrednosti M in tako dobimo simetrično porazdeljene vrednosti, ki jih uporabimo za statistično evaluacijo rezultatov. Avtorji so v najzgodnejših raziskavah izbirali značilno izražene gene glede na vrednost M (npr. $M \leq -0,7$ za manj izražene in $M \geq 0,7$ za bolj izražene gene). Izpeljanka te metode je kosovna analiza (slice analysis ali z-score filtering), ki identificira gene kot značilno regulirane, če so od lokalne sredine oddaljeni za več kot 1,96-kratnik standardne deviacije (Quackenbush, 2002). Najpreprostejša statistična analiza je t-test, vendar pa moramo zaradi veliko večjega števila meritev kot je vzorcev, dobljene p vrednosti modificirati (Alba in sod., 2004). V primeru, da v poskusu primerjamo več različnih pogojev, lahko uporabimo analizo variance (ANOVA).

Statistični evaluaciji podatkov sledi odkrivalna analiza ter vizualizacija podatkov. Razvrščanje različno izraženih genov v skupine (clustering) nam lahko da podatke o njihovi regulaciji in celo o funkciji. Najpogosteje je uporabljena metoda združevanja (hierarchical clustering), ko gene s podobnim profilom izražanja pri različnih pogojih združimo v skupinice. Zanimiv pogled na rezultate dobimo tudi z metodama analize glavnih komponent (PCA) in samoorganiziranih map (SOM, Aharoni in Vorst, 2002). Pri funkcionalni analizi so rezultati izražanja združeni s podatki o molekularni funkciji, biološkem procesu, v katerega je gen vključen, in celični komponenti, v katerem produkt gena deluje. Ti podatki so dostopni v bazah podatkov kot sta GO (www.geneontology.org, Ashburner in sod., 2000) in MIPS (Munich Information Center for Protein Sequences). Dodatne informacije o regulaciji in funkciji gena nam lahko da tudi analiza promotorskih elementov (Wan in sod., 2002) ali povezava izražanja genov in kromosmskih regij, na katerih se ti geni nahajajo.

Zaradi trenutnih omejitev metode hibridizacije cDNA mikromrež kot so: visoki stroški, nespecifičnost hibridizacije, napak v pripisu genske funkcije ter nestandardiziranosti, tako laboratorijskih kot metod analize podatkov, je potrebno podatke dobljene z mikromrežami validirati (Alba in sod., 2004). Najpogosteje uporabljeni metodi za validacijo sta prenos northern in PCR v realnem času. Alternativno je možno podatke validirati tudi z že prej opisanim »digitalnim prenosom northern«. Naslednji korak pri interpretaciji dobljenih rezultatov je dodatna funkcionalna okarakterizacija izbranih genov. Le-to lahko izvedemo

z utišanjem, čezmernim izražanjem ali izbijanjem genov ali s pripravo gensko spremenjenih rastlin s prehodnim izražanjem (Kazan in sod., 2001).

2.2.1.3 Uporaba mikromrež za študij odgovora rastline na okužbo

Mikromreže so bile za študij interakcije rastlina - povzročitelj bolezni prvič uporabljene za spremljanje izražanja genov koruze po okužbi s patogeno glivo *Cochliobolus carbonum* (Baldwin in sod., 1999). Raziskave, ki so sledile, so poročale o odzivu navadnega repnjakovca na okužbo z različnimi glivami in bakterijami ali na tretiranje z elicitorji (pregled v Wan in sod., 2003). Schenk in sodelavci so s pomočjo cDNA mikromrež opazovali izražanje 2375 genov v navadnem repnjakovcu in sicer po okužbi z glivo *Alternaria brassicicola* in pod vplivom SA, metil jasmonata ali etilena (Schenk in sod., 2000). Maleck in sodelavci (2000) so iskali gene, vpletene v sistemsko pridobljeno rezistenco pri isti vrsti rastline.

Mikromreže imajo pomembno vlogo v raziskavah odgovora rastline na povzročitelje bolezni, saj omogočajo vpogled v dogajanje na nivoju dela ali celo celotnega transkriptoma rastline (Reymond, 2001). Z uporabo mikromrež lahko identificiramo gene, vključene v obrambo rastline, možne regulatorne elemente in prepoznamo povezave med različnimi signalnimi potmi (Wan in sod., 2002).

Uporaba mikromrež za študij interakcije rastlina - virus je bila prvič objavljena leta 2002, kot del študije izražanja genov za različne transkripcijske faktorje pod vplivom staranja, mraza in napada povzročiteljev bolezni pri navadnem repnjakovcu (Chen in sod., 2002). Tudi nadaljne študije so opisovale odziv te vrste na različne viruse (Golem in Curver, 2003; Whitham in sod., 2003; Marathe in sod., 2004; Huang in sod., 2005). V zadnjih raziskavah so raziskovali tudi odgovor drugih rastlin: topola (Smith in sod., 2004), koruze (Shi in sod., 2005) in vrste tobaka *Nicotiana benthamiana* (Senthil in sod., 2005) na okužbo z virusi.

V raziskavi odziva navadnega repnjakovca na virus TMV (Golem in Curver, 2003) sta avtorja identificirala 68 genov, pri katerih se je izražanje znatno spremenilo po okužbi z virusom. Le-ti so nosili zapis za različne proteine od prepisovalnih dejavnikov, antioksidantov, metabolnih encimov, do transportnih molekul.

Whitham in sodelavci (2003) so pri odzivu navadnega repnjakovca na okužbo s 5 različnimi virusi s pozitivno usmerjeno RNA ugotovili povečanje izražanja 114 genov. Le ti so bili vključeni v prenosu signala, prepisovanje in odziv celice na dejavnike iz okolja ter v staranje in celično smrt). Obrambni geni in geni za Hsp so se na okužbo odzivali koordinirano. Analiza promotorjev koreguliranih genov ni našla do sedaj znanih promotorskih elementov, kar nakazuje, da virusi delujejo preko do sedaj neznanih signalnih poti. Na podobnem eksperimentalnem sistemu, so Huang in sodelavci (2005) ugotovili, da so signalne poti, ki vodijo izražanje obrambnih genov, podobne pri kompatibilnih in nekompatibilnih interakcijah, vendar pri prvih izražanje obrambnih genov ne ustavi virusne infekcije. Senthil s sodelavci (2005) so ugotovili, da dva genetsko različna virusa: virus rumene zamreženosti škrbinke (SYNV) in virus nekrotične pegavosti vodenke (INSV), povzročata različen odziv vrste tobaka (*Nicotiana benthamiana*).

Pri študiju interakcije koruze z virusom mozaika sladkornega trsa (Shi in sod., 2004) so

identificirali 302 različno izraženih genov, od katerih je bila večina tako ali drugače povezana s patogenezo. Zaključili so, da ima sprememba izražanja konstitutivno izraženih genov vlogo v indukciji obrambnega odgovora.

V odgovoru hibridnega topola (*Populus trichocarpa* x *Populus deltoides*) na ranitev, kateri je sledila okužba z virusom mozaika topola (PopMV), so ugotovili, da je različno izražanje genov, ki so vključeni v programirano celično smrt in ojačitev celične stene, povezano z odgovorom na ranitev, medtem ko so se na samo virusno okužbo najbolj odzivali geni za metalotioneinu podobne proteine in proteine, ki so vključeni v preoblikovanje celične stene (Smith in sod., 2004).

V zgoraj omenjenih raziskavah so različno izražanje nekaterih gene opazili v več primerih, kar nakazuje na njihovo univerzalno vlogo pri odgovoru na virusno okužbo. Povišanje izražanja gena za β -1,3-glukanazo (Golem in Curver, 2003; Whitham in sod. 2003; Marathe in sod. 2004; Smith in sod., 2004) lahko omejuje širjenje virusa. Različno izražanje genov za Hsp (Whitham in sod., 2003; Marathe in sod. 2004; Smith in sod., 2004; Senthil in sod., 2005) potrjuje njihovo vlogo pri virulenci. Večkrat se je spremenilo tudi izražanje gena PR-protein 1 (Whitham in sod., 2003; Huang in sod. 2005; Smith in sod., 2004; Senthil in sod., 2005) in genov za transkripcijske faktorje WRKY (Golem in Curver, 2003; Whitham in sod. 2003; Marathe in sod. 2004; Senthil in sod., 2005), ki so vključeni v prenos signala v obrambnem odgovoru.

2.2.2 PCR v realnem času

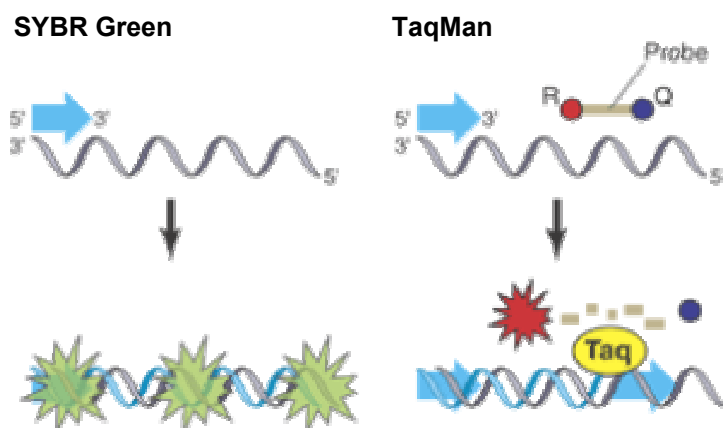
Metoda z manjšo zmogljivostjo, ki pa je zaradi svoje hitrosti in visoke občutljivosti izredno uporabljana, je metoda PCR v realnem času. Princip metode PCR v realnem času temelji na detekciji pomnoževanega dela DNA med samo PCR. Pomembna razlika metode PCR v realnem času od klasične metode PCR je v tem, da je od začetnega števila kopij tarčnega zaporedja nukleinske kisline odvisno, koliko ciklov bo potrebnih, da lahko zaznamo fluorescenco poročevalske molekule (Walker, 2002, Bustin in sod., 2005).

Detekcija pomnožene DNA navadno temelji na fluorescenci. Do sedaj najpogosteje uporabljani kemiji, zlasti pri rastlinah (Gachon in sod., 2004), sta uporaba vrinjevalnih molekul (npr. SYBR Green), ki se vežejo na vsako na novo nastalo dvojno verigo DNA in bolj specifična detekcija z uporabo TaqMan sond. Manj pogosta metoda detekcije je uporaba hibridizacijskih sond, molekularnih svetil (Molecular Beacons) in sond Scorpion. Pri vseh metodah produkte zaznavamo z merjenjem fluorescence, katera je sorazmerna njihovi količini (Gachon in sod., 2004).

Barvilo SYBR Green I se veže na dvoverižno DNA (slika 2, levo) in v kompleksu z le-to fluorescira. Vezava je nespecifična, zato lahko zaznamo tudi nespecifične produkte in dimere oligonukleotidnih začetnikov. Nastanek dimerov lahko preverimo z analizo disociacijske krivulje po zadnjem ciklu PCR v realnem času ali z gelsko elektroforezo (Wong in Medrano, 2005).

TaqMan kemija (slika 2, desno) uporablja sondo TaqMan, specifično za del amplicona med obema začetnima oligonukleotidoma, ki ima na 5'-koncu vezano reportersko (npr. 6-karboksi-fluorescein, FAM; VIC) in na 3'-koncu dušilno barvilo (npr. 6-karboksi-

tetrametilrodamin, TAMRA). Sonda se specifično veže na tarčni ampikon. DNA polimeraza zaradi svoje 5'-nukleazne aktivnosti med podaljševanjem verige razgrajuje sondo, zato se reportersko barvilo loči od dušilnega. Posledica tega je naraščanje fluorescence reporterskega barvila. Ker je sonda specifična za ampikon, zaznamo le specifične produkte. Specifičnost TaqMan kemije je še povečana z uporabo MGB sond, katere imajo na 3'-koncu vezano molekulo MGB (minor groove binder). Le-ta se z visoko afiniteto veže na mali žleb DNA (Kumar in sod., 1998).



Slika 2: Detekcija z uporabo SYBR Green in TaqMan kemije pri PCR v realnem čas (Walker, 2002). Fluorescenca je proizvedena bodisi z vezavo SYBR Green barvila na dvoverižno DNA ali z odcepitvijo dušilnega (Q) od reporterskega (R) barvila.

Figure 2: SYBR Green and TaqMan detection chemistry (Walker, 2002).

Reagenti za PCR v realnem času, poleg termostabilne DNA polimeraze, vsebujejo tudi pasivno fluorescenčno barvilo 6-karboksi-X-rodamin (ROX), ki služi kot notranja referenca za normalizacijo fluorescenčnega signala pri analizi podatkov (Wong in Medrano, 2005), ter uracil-DNA glikozidazo, ki z odstranjevanjem uracilov v enoverižni ali dvoverižni DNA preprečuje ponovno pomnoževanje produktov PCR (Longo in sod., 1990).

Metoda PCR v realnem času je, med drugim, uporabna za ugotavljanje genske stabilnosti, učinkovitosti zdravil, detekcijo povzročiteljev bolezni, za razlikovanje med aleli in analizo izražanja genov, to je za ugotavljanje števila kopij odgovarjajoče mRNA (Klein, 2002).

Pri rastlinah PCR v realnem času uporabljajo za identifikacijo in kvantifikacijo rastlinskih simbiotov in povzročiteljev bolezni, za ugotavljanje prisotnosti tuje DNA v živilih (npr. kontaminacija z drugimi vrstami, gensko spremenjenimi rastlinami), za ugotavljanje števila kopij vključenega transgena in nenazadnje za ugotavljanje izražanja genov. Pri tem ima izredno veliko vlogo razlikovanje med posameznimi pripadniki genskih družin (Gachon in sod., 2004). Z metodo PCR v realnem času so npr. potrdili vključenost encima glutation-S-transferaze v odgovor rastlin navadnega repnjakovca v kompatibilni interakciji s CaMV (Love in sod., 2005).

Kot zelo uspešna se je izkazala naslednja kombinacija: uporaba DNA mikromrež kot presejalne metode in validacija dobljenih rezultatov s PCR v realnem času (Chuaqui in sod., 2002), saj slednja metoda ni tako zmogljiva, vendar pa je veliko bolj občutljiva. Medtem ko gre pri nekaterih študijah zgolj za potrjevanje izražanja izbranih genov, pa lahko pri teh izvedemo še podrobnejše časovne ali druge analize (Gachon in sod., 2002). PCR v realnem času so uporabili tudi za primerjavo različnih metod analize podatkov pridobljenih s cDNA-mikromrežami (Puthoff in sod., 2003). PCR v realnem času lahko rezultate mikromrež popolnoma potrdi, nekateri avtorji pa so ugotovili, da so bile razlike v izražanju, ugotovljene s PCR v realnem času, večje (Wang in sod., 2003) ali manjše (Schenk in sod., 2000), kot je pokazala metoda mikromrež. V nekaterih študijah je bilo izražanje ugotovljeno z obema metodama celo nasprotno (Hammond in sod., 2003).

Za študij izražanja genov z metodo PCR v realnem času je potrebna izolacija RNA, RT in PCR v realnem času dobljene cDNA. Da bi dosegli visoko zmogljivost in zanesljivost reakcije PCR v realnem času, je potreben preudaren razvoj metode, ki vključuje postopek priprave cDNA (izolacija RNA, odstranjevanje genomske DNA, RT) in ustrezno normalizacijo na vzdrževalni (endogeni) ali zunanje dodani gen (Giulietti in sod., 2001).

Za natančnost metode PCR v realnem času je ključna integriteta RNA, saj je učinkovitost RT iz delno razgrajene RNA znatno slabša kot iz intaktne (Swift in sod., 2000). Poleg tega so pri izolaciji RNA iz rastlinskega tkiva lahko problematični številni sekundarni metaboliti, ki motijo samo izolacijo ter inhibirajo PCR reakcijo (Singh in Singh, 1996).

Pri večini metod izolacije RNA v le-tej ostane še nekaj genomske DNA (gDNA). Pred RT je te ostanke potrebno razgraditi, saj se s tem izognemo pomnoževanju gDNA v reakciji PCR v realnem času. Problemu se lahko izognemo z načrtovanjem sonde preko introna, vendar še vedno gDNA lahko moti natančno določitev količine izhodne RNA, ki je nujna za natančno določitev absolutne ali relativne količine mRNA iskanih genov (Bustin, 2002).

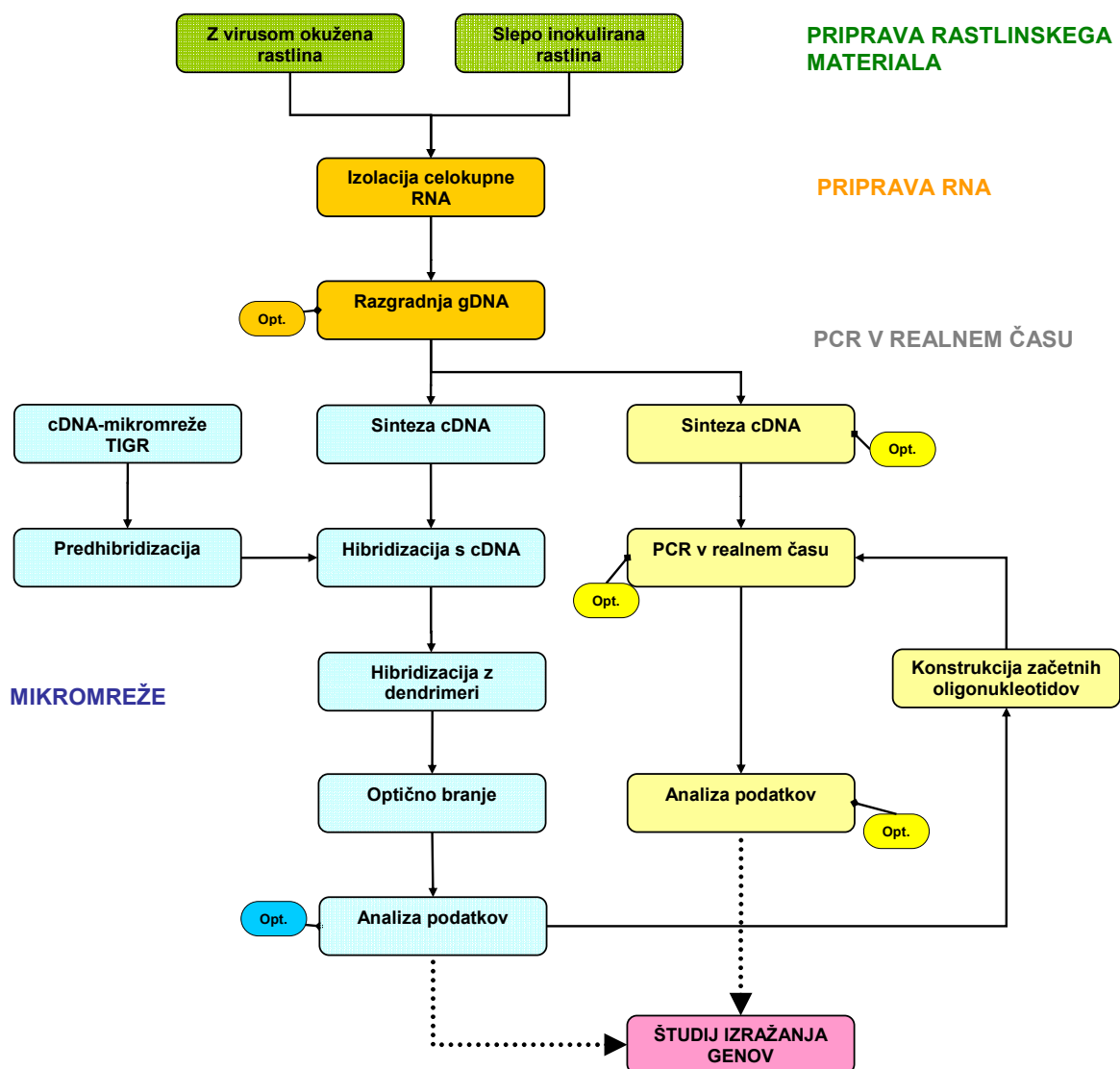
Obratno prepisovanje mRNA v cDNA je prav tako ena izmed ključnih faz v postopku študija izražanja genov s PCR v realnem času. Napake, ki pri tem nastanejo izvirajo iz sekundarne ali terciarne strukture RNA, učinkovitosti začetnih oligonukleotidov in reverzne transkriptaze (Ståhlberg in sod., 2004a). Začetni oligonukleotidi, ki jih uporabljamo za RT so bodisi naključni začetni oligonukleotidi (random primers), oligo-dT ali za gen specifični začetni oligonukleotidi. Naključni začetni oligonukleotidi so najbolj nespecifični, saj nalegajo na različna mesta na RNA, tudi na rRNA, ki predstavlja večino izolirane celokupne RNA. Oligo- dT začetniki nalegajo na poli-A konec mRNA in so zato bolj specifični. Še večjo specifičnost imajo za iskane gene specifični začetni oligonukleotidi (Lekanne Deprez in sod., 2002), vendar zaradi nefleksibilnosti niso tako uporabljani kot prej omenjeni začetni oligonukleotidi (Bustin in sod., 2005). Izkoristek cDNA v reakciji RT lahko zaradi uporabe različnih reverzних transkriptaz niha tudi do 100-krat (Ståhlberg in sod., 2004b).

Za natančno relativno kvantifikacijo (da lahko izkoristimo ves potencial visoke občutljivosti metode) je nujna izbira primerne metode normalizacije. Le-ta popravi vire nespecifične variabilnosti (količina in kvaliteta RNA, učinkovitost reakcij reverzne transkripcije in PCR v realnem času, razlike med tkivi itd.) (Bustin, 2002). Podatke lahko normaliziramo glede na vhodno število celic, kar je večinoma zelo težko izvedljivo, glede na količino RNA ter z uporabo eksternih ali internih (vzdrževalni geni) kontrol.

Normalizacija na količino RNA je problematična, ker navadno merimo količino celokupne RNA, kjer je večina RNA ribosomalnega izvora, razmerje rRNA : mRNA pa lahko niha med fiziološkimi stanji. Pri normalizaciji glede na količino RNA ne upoštevamo učinkovitosti RT. Pri vzorcih iz zelo majhne količine tkiva je problematično tudi natančno ugotavljanje količine RNA (Bustin in sod., 2005). Pri uporabi zunanjih kontrol v eni izmed faz priprave vzorcev dodamo kontrolno mRNA, npr. luciferazno (Toplak in sod., 2004). Slabost metode je, da upoštevamo le učinkovitost RT in PCR v realnem času, ne pa začetnih razlik v količini vzorca. Zato je najboljša metoda normalizacije normalizacija na vzdrževalni gen, saj le tako lahko upoštevamo vse dejavnike variabilnosti. Vzdrževalni gen mora biti izražen enako, ne glede na tkivo in eksperimentalne pogoje (Giulietti in sod., 2001). Izbira normalizatorskega gena je zato odvisna od vrste preučevanega organizma, tkiva in od eksperimentalnih pogojev. V preteklih raziskavah se avtorji niso pretirano ukvarjali z izbiro vzdrževalnega gena, kasneje pa se je izkazalo, da nekateri sploh niso primerni. Vandesompele in sodelavci (2002) so spremljali izražanje 10 pogosto uporabljenih vzdrževalnih genov v 13 človeških tkivih in prišli do zaključka, da nobeden od testiranih genov ni popolnoma ustrezal kriterijem za normalizacijo. Zato so razvili program GeNorm, ki izbere primerne normalizatorje in izražanje tačnih genov normalizira na 2 ali tri normalizatorske gene (Vandesompele in sod., 2002). Vzdrževalni geni, ki so kazali stabilno izražanje pri rastlinah so ribosomska RNA (18S, 25S; Kim in sod., 2003; Brunner in sod., 2004; Iskandar in sod., 2004; Nicot s sod., 2005), ubikvitin (Brunner in sod., 2004), tubulin (Coker in Davies, 2003; Brunner in sod., 2004), aktin (Kim in sod., 2003), elongacijski faktor 1- α (Nicot in sod., 2005), in GAPDH (Coker in Davies, 2003; Kim in sod., 2004).

Dinamični rang kvantifikacije pri PCR v realnem času je 7 redov velikosti. Absolutno količino cDNA v vzorcu lahko izračunamo z uporabo standardne krivulje. Relativno količino cDNA lahko izračunamo iz kalibratorske krivulje, ali iz razlik med vrednostjo Ct med vzorcem in kontrolo ($\Delta\Delta C_t$ metoda, Livak in Schmittgen, 2001). Bolj natančna pa je relativna kvantifikacija, kjer upoštevamo tudi učinkovitost PCR reakcije (Pfaffl, 2001).

3 MATERIALI IN METODE



Slika 3: Shema eksperimentalnega dela: priprava rastlinskega materiala in RNA ter analiza izražanja genov z metodama cDNA-mikromreže in PCR v realnem času
cDNA – komplementarna DNA, gDNA – genska DNA, Opt. – faze v katerih smo optimizirali metode, PCR – verižna reakcija s polimerazo, TIGR - The Institute of Genomic Research (ZDA).

Figure: 3 Scheme of the experimental work: plant material and RNA preparation, and study of differential gene expression by microarray and real-time PCR analysis.

3.1 PRIPRAVA RASTLINSKEGA MATERIALA

3.1.1 Rastlinski material

Zdrave rastline krompirja (*Solanum tuberosum* L.) sort 'Igor' in 'Sante' smo razmnožili z nodijsko kulturo in gojili na modificiranem MS gojišču (10 ml gojišča v epruveh) v rastni komori za tkivne kulture. Izsečke tako vzgojenih rastlin krompirja smo predstavili na gojišče za koreninjenje (40 ml enakega gojišča v plastičnih petrijevkah) in jih gojili v rastni komori. Pogoji v rastni komori so bili: temperatura 19 ± 2 °C v času osvetljevanja in 17 ± 2 °C v času teme, gostota pretoka fotonov $70 - 90 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (žarnica Osram L36/W77) in fotoperioda 16 ur svetlobe in 8 ur teme.

Po 14 dneh smo rastlinice presadili v lončke z zemljo in jih štiri tedne vzgajali v rastni komori z vlago. Pogoji v rastni komori z vlago so bili: relativna zračna vlaga 75 ± 2 %, temperatura 20 ± 2 °C v času osvetljevanja in 18 ± 2 °C v času teme, gostota pretoka fotonov $120 - 150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (žarnica Osram L36/W77) in fotoperioda 16 ur svetlobe in 8 ur teme. Rastline smo zalivali z vodovodno vodo.

3.1.2 Gojišča in raztopine za pripravo rastlinskega materiala

Modificirano MS gojišče (Murashige in Skoog, 1962)

- 136 μM NaFeEDTA
- pH = 5,7 - 5,8
- avtoklaviranje: 15 minut pri 120 °C in 1,1 bar.

Pufer za mehansko inokulacijo

- 2,6 mM NaH₂PO₄
- 15,2 mM Na₂HPO₄
- 0,1% DIECA
- pH = 7,6

3.1.3 Mehanska inokulacija rastlin

Po štirih tednih rasti v zemlji v rastni komori z vlago smo rastline krompirja (vsaj 16 rastlin) razdelili v dve enakovredni skupini:

- slepo inokulirane rastline (inokulirane s sokom zdravih rastlin, 8 rastlin) in
- okužene rastline (inokulirane s sokom rastlin okuženih s PVY^{NTN}, 8 rastlin).

Izolat virusa PVY^{NTN} je bil izoliran iz krompirja sorte 'Igor' gojene v Sloveniji (Kus, 1994). Virus smo množili in vzdrževali v rastlinah krompirja sorte 'Pentland Squire' gojenih v tkivni kulturi, kot je opisano v poglavju 3.1.1. Sok za inokulacijo rastlin za poskuse smo pripravili iz poganjkov zdravih ali okuženih rastlin sorte 'Pentland Squire', ki

smo jih homogenizirali v pufru za mehansko inokulacijo v razmerju 3 ml pufra na 1 g sveže mase rastlinskega materiala. Macerat smo inkubirali 5 minut, da se je virus izločil

Rastlinam smo označili tri ali štiri spodnje liste, jih posuli s karborundom in nato liste premazali z rastlinskim sokom zdravih (slepo inokulirane) ali okuženih (okužene rastline) rastlin. Po 15 minutah smo liste sprali z vodovodno vodo.

3.1.4 Pobiranje rastlinskega materiala

V času 30 minut in 12 ur po inokulaciji smo odrezali slepo in z virusom inokulirane liste. Rastlinski material (vsi inokulirani listi vseh rastlin) smo takoj homogenizirali v tekočem dušiku in ga shranili pri -80°C . Shranili smo tudi rastlinski material intaktnih raslin, vendar smo za nadaljne analize uporabili le rastlinski material slepo inokuliranih in z virusom okuženih rastlin.

Nekaj rastlin obeh sort smo pustili v rastni komori 14 dni in z opazovanjem pojavljanja bolezenskih znakov sorti 'Igor' potrdili infektivnost inokulata. Dodatno smo na vsaj enem listu rastlin obeh sort izvedli test ELISA, kot je opisano v Mehle in sodelavci (2004).

3.1.5 Serije

Rastlinski material smo pobrali v treh bioloških ponovitvah (serijah) zgoraj opisanega poskusa. Dodatno smo rastlinski material sorte 'Igor' v časovni točki 12 ur pobrali še v dveh serijah (4. in 5. serija), vendar v nadaljnjih analizah rastlinskega materiala 4. serije nismo uporabili.

- 1. serija: 03. 04. 2003
- 2. serija: 26. 09. 2003
- 3. serija: 03. 12. 2004
- 4. serija: 03. 03. 2005
- 5. serija: 18. 05. 2005

Rastlinski material, ki smo ga uporabili za optimizacije nekaterih metod (RT, PCR v realnem času), je bil iz nekaterih drugih sort krompirja, vendar gojen in pobran na enak način kot v opisanih bioloških ponovitvah.

3.1.6 Vzorci

Pregled vzorcev rastlinskega materiala, iz katerih smo izolirali RNA, in poimenovanje parov, ki smo jih primerjali z metodo mikromrež ali PCR v realnem času, sta prikazana v preglednici 1.

Preglednica 1: Vzorci rastlinskega materiala, iz katerih smo izolirali RNA, in poimenovanje parov, ki smo jih primerjali z metodama mikromreže in PCR v realnem času.

Table 1: Samples of plant material, used for RNA isolation and pairs for comparisons of expression by microarrays and real-time PCR

Vzorec rastlinskega materiala	Oznaka para	Vzorec rastlinskega materiala	Oznaka para
I/S 30min 1 I/O 30min 1	Igor 30min 1	S/S 30min 1 S/O 30min 1	Sante 30min 1
I/S 30min 2 I/O 30min 2	Igor 30min 2	S/S 30min 2 S/O 30min 2	Sante 30min 2
I/S 30min 3 I/O 30min 3	Igor 30min 3	S/S 30min 3 S/O 30min 3	Sante 30min 3
I/S 12h 1 I/O 12h 1	Igor 12h 1	S/S 12h 1 S/O 12h 1	Sante 12h 1
I/S 12h 2 I/O 12h 2	Igor 12h 2	S/S 12h 2 S/O 12h 2	Sante 12h 2
I/S 12h 3 I/O 12h 3	Igor 12h 3	S/S 12h 3 S/O 12h 3	Sante 12h 3
I/S 12h 5 I/O 12h 5	Igor 12h 5		

Vzorcem smo označili sorto (I – ‘Igor’, S – ‘Sante’), inokuliranost rastline (S – slepo inokulirana rastlina, O – z virusom okužena rastlina), čas po inokulaciji (30 min – 30 minut, 12h – 12 ur) in biološko ponovitev (serijo poskusa; glej 3.1.5).

3.2 PRIPRAVA RNA

3.2.1 Rastopine za pripravo RNA

DEPC voda

- 6 mM dietil pirokarbonat
- 2-krat avtoklavirano

TAE pufer

- 40 mM Tris-acetat
- 1 mM EDTA
- pH = 8,0

Nanašalna rastopina za elektroforezo

- 200 µl 6x Loading Dye (Fermentas)
- 500 µl glicerol
- 500 µl ddH₂O

3.2.2 Izolacija celokupne RNA

Celokupno RNA (totRNA) smo iz rastlinskih tkiv izolirali po postopku RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). Postopek izolacije se začne z inkubacijo homogeniziranega rastlinskega materiala v liznem pufu. Le-ta vsebuje gvanidijev izotiocianat, ki inaktivira Rnaze. Sledi odstranjevanje grobih delcev na QIAshredder kolonah, precipitacija proteinov z 96-odstotnim etanolom, vezava RNA na silikagelno membrano kolone RNeasy mini, spiranje nečistoč in nazadnje elucijo totRNA v vodo. Priporočeni postopek proizvajalca (RNeasy Mini Handbook) smo spremenili v več korakih.

RNA smo izolirali iz 300 mg rastlinskega tkiva, zaradi česar smo povečali količino liznega pufra RLT (brez dodanega β -merkaptto etanola) na 800 μ l. Ker je ta volumen presegal volumen kolon, smo lizat nanegli na kolono QIAshredder v dveh korakih z vmesnim centrifugiranjem. Precedku (cca 800 μ l) smo dodali 400 μ l 96-odstotnega etanola in vzorec spet v dveh korakih nanegli na RNeasy Mini kolono. Po spiranju s pufroma RW1 in RPE smo na kolono nanegli 30 μ l DEPC vode in inkubirali 10 minut pri sobni temperaturi. TotRNA smo nato eluirali z 2-minutnim centrifugiranjem pri 18000 g. Izolirano totRNA smo shranili pri -80 °C.

3.2.3 Razgradnja genomske DNA

Da bi odstranili gDNA, ki je ostala v vzorcih po izolaciji totRNA, smo gDNA razgradili z DNazo I. Preizkusili smo dva načina razgradnje.

Pri prvem smo nastavili 10 μ l DNazno reakcijo: 6 μ l (cca. 8 μ g) totRNA smo dodali 1 μ l pripadajočega pufra in DNazo I (Deoxyribonuclease I, amplification grade, Invitrogen), da smo dosegli naslednje koncentracije encima: 0,25, 0,06 in 0,04 enot na μ g totRNA. Od proizvajalca priporočena koncentracija encima je 1 enota na μ g totRNA. Vzorce smo 15 minut inkubirali pri sobni temperaturi, nato smo DNazo inaktivirali z EDTA v končni koncentraciji 2 mM in inkubirali 10 minut pri 65 °C.

Pri drugem načinu smo, po navodilih proizvajalca, uporabili komplet za razgradnjo DNA na RNeasy Mini koloni med izolacijo RNA (RNase free DNase set, Qiagen, Nemčija). Za razgradnjo cca. 40 μ g totRNA smo uporabili priporočeno količino encima (27 enot) ali 13,5, 54 ali 108 enot DNaze I v 70 μ l pufra (koncentracije 0,68, 0,34, 1,35 ali 2,7 enot / μ g totRNA).

Po določitvi optimalnih pogojev razgradnje smo za razgradnjo gDNA v vzorcu totRNA, izolirane iz 300 mg rastlinskega tkiva, uporabili DNazo in pripadajoče raztopine proizvajalca Invitrogen. Nastavili smo 40 μ l reakcijske mešanice, ki je vsebovala:

- 30 μ l totRNA
- 1,3 μ l DNaze I
- μ l pufra
- 4,7 μ l DEPC vode

Vzorce smo inkubirali in nato inaktivirali DNazo kot je opisano zgoraj. Kvaliteto in količino RNA smo nato preverili z agarozno gelsko elektroforezo in v nekaterih primerih

dotatno še z aparaturo Agilent 2100 Bioanalyzer (glej poglavje 3.2.5.1).

3.2.4 Čiščenje RNA

Da bi iz vzorcev totRNA odstranili preostale encime in pufre ter jo skoncentrirali na manjši volumen, smo jo po tretiranju z DNazo I ponovno očistili. Uporabili smo komplet RNeasy MinElute Cleanup Kit (Qiagen, ZDA).

44 µl vzorca totRNA smo najprej dodali 156 µl DEPC vode in 700 µl pufra RLT. Vse skupaj smo premešali z vrtinčenjem ter nato dodali še 500 µl absolutnega (96 - 100 %) etanola. Celotno mešanico smo premešali s pipetiranjem ter nemudoma nadaljevali z nadaljnim postopkom. Ker je volumen vzorca presegal volumen kolon, smo ga nanegli na kolono RNeasy MinElute Spin Column v dveh korakih z vmesnim 30 sekundnim centrifugiranjem pri 18 000 g. Supernatant smo zavrgli, na kolono pa nanegli 500 µl pufra RPE. Zopet smo centrifugirali 30 sekund pri 18 000 g. Na kolono smo nato dodali 500 µl 80-odstotnega etanola in centrifugirali kot prej. Da bi preprečili prenos etanola v nadaljne korake, smo kolono ponovno centrifugirali 5 minut pri 18 000 g. TotRNA smo eluirali s 14 µl DEPC vode, segrete na 80 °C in vzorec inkubirali na sobni temperaturi 10 minut. S centrifugiranjem (2 minuti pri 18 000 g) smo tako eluirali 12 µl totRNA (mrtvi volumen membrane na koloni je 2 µl).

3.2.5 Merjenje koncentracije in inegritete RNA

3.2.5.1 Določanje koncentracije in kvalitete RNA z aparaturo BioAnalyzer

Za ugotavljanje koncentracije in kvalitete RNA, ki smo jo uporabili za mikromreže (totRNA, tretirana z DNazo, očiščena in koncentrirana) smo uporabili komplet »RNA 6000 Nano LabChip® kit« (Ambion, ZDA) s kvantitativnim obsegom določanja koncentracij 25-500 ng/µl RNA in aparaturo Agilent 2100 BioAnalyzer (Agilent Technologies, ZDA). Metoda temelji na ločevanju molekul RNA na osnovi velikosti s pomočjo kapilarne elektroforeze in analize podatkov. Analizator tako za vsak vzorec izriše elektroferogram, določi faktor, ki meri kvaliteto RNA in izračuna delež molekul rRNA v vzorcih mRNA.

Po 2 µl ustrezno redčenih vzorcev RNA in standarda velikosti RNA 6000 Ladder (Ambion, ZDA) smo denaturirali (2 minuti, 80°C), kratko centrifugirali in shranili na ledu. Nato smo pripravili mešanico gela (RNA 6000 Nano Gel Matrix) in barvila (RNA 6000 NanoDye Concentrate) in jo nanegli na čip (RNA 6000 Nano Chip). V vdolbinice za standard velikosti in vzorce na nano čipu smo najprej nanegli po 5 µl reagenta RNA 6000 Nano Marker in nato v iste vdolbinice nanegli po 1 µl standarda velikosti in vzorcev. Nano čip smo z vrtinčenjem premešali in vstavili v aparaturo Agilent 2100 Bioanalyzer. Podatke smo analizirali s programom 2100 Expert software (Agilent Technologies, ZDA).

3.2.5.2 Agarozna gelska elektroforeza

Za ugotavljanje kvalitete v vseh fazah dela in uravnavanje količine totRNA pred sintezo cDNA smo uporabili agarozno gelsko elektroforezo.

Pred delom z RNA smo kadičko za gel, nosilec gela in glavniček temeljito sprali z 0,1 M NaOH, vodo, 3% H₂O₂ in bidestilirano vodo. Pripravili smo 1,5-odstotni gel, tako da smo agarozo (0,6 g) segrevali v TAE pufru (40 ml). Ko se je agaroz popolnoma stopila, smo raztopino nekoliko ohladili in dodali še etidijev bromid (1,5 µl). Raztopino smo razlili na nosilec za gel in pustili 30 minut, da se je gel strdil.

Celokupno RNA (koncentrirano ali redčeno z DEPC vodo v razmerju 1:10 ali 1:20) smo pred nanosom na gel zmešali z nanašalno raztopino v razmerju 2 µl RNA, 5 µl nanašalne raztopine in 5 µl DEPC vode. 12 µl tako pripravljene mešanice smo nanесли v vdolbinice gela. Kot kontrolo smo v eno progo na gelu nanесли 0,7 µl označevalca velikosti DNA 100 bp (MBI Fermentas, Litva) zmešanega z enako količino nanašalne raztopine in vode kot pri vzorcih RNA.

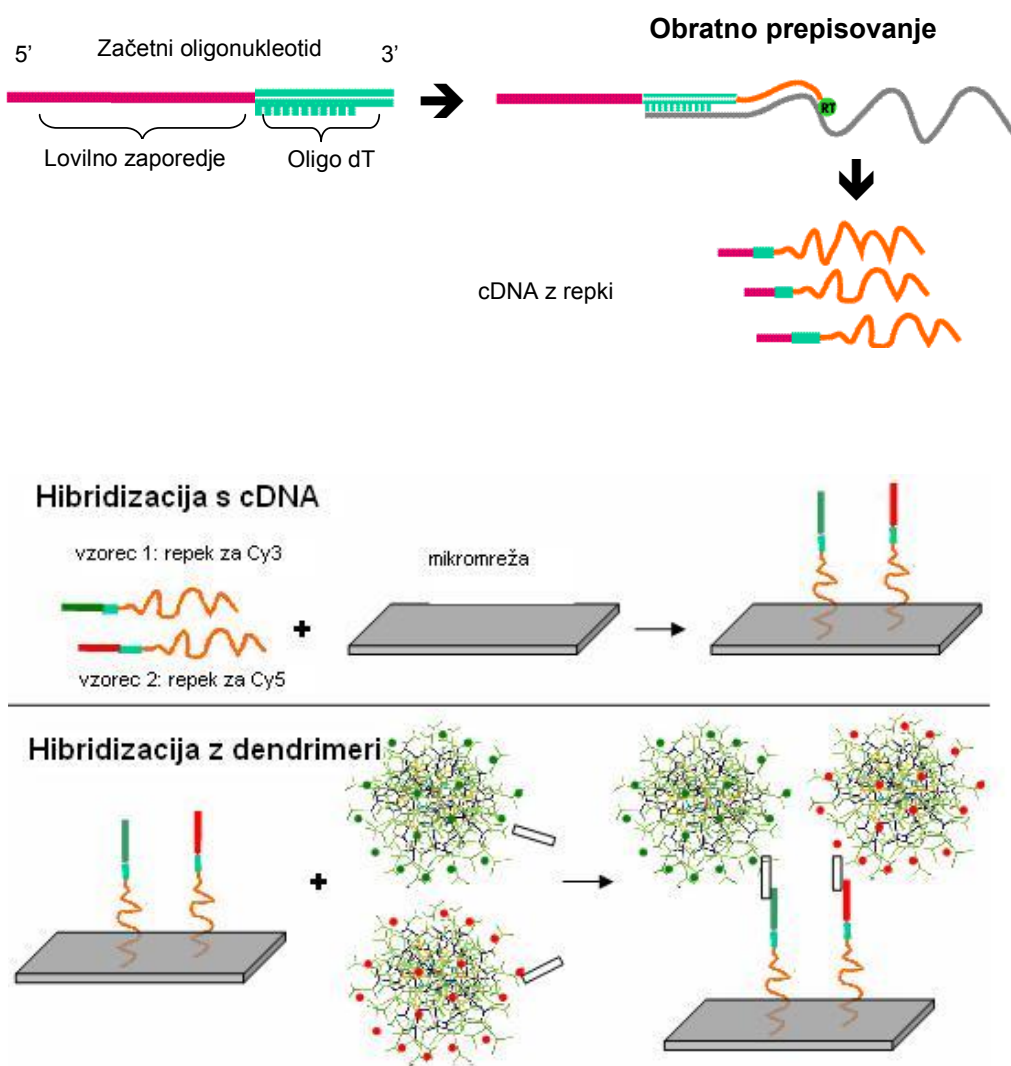
RNA smo ločevali 20 minut pri napetosti 80 V. Uporabljali smo napajalnik POWER / PAC 1000 (BIO-RAD). Po koncu elektroforeze smo gel slikali s sistemom GelDoc Mega (s programom UVI Photo MW, Biosystematica, ZDA).

Relativno koncentracijo RNA smo ocenili na osnovi primerjave fluorescence, ki jo v svetlobi UV oddaja kompleks etidijev bromid - DNA. Tako smo določili količine totRNA, ki smo jih uporabili za RT, da bi dosegli enako koncentracijo RNA v vsakem paru slepo inokulirana – okužena rastlina.

3.3 cDNA MIKROMREŽE

cDNA mikromreže smo hibridizirali s pari vzorcev slepo inokuliranih in z virusom okuženih rastlin. Pri vsaki hibridizaciji smo en vzorec v paru označili s fluorescentnim barvilom Cy3, drugega pa s fluorescentnim barvilom Cy5. Med pari smo naključno menjavali barvila med slepo inokuliranimi in z virusom inokuliranimi vzorci (dye swap). Par vzorcev 'Igor' 12h 1 smo hibridizirali 2-krat, in sicer z obrnjenima barviloma.

Za hibridizacijo cDNA mrež smo (kjer ni drugače navedeno) uporabili komplet 3DNA Array 900™ Kit (3DNA komplet, Genisphere, ZDA). Pri delu smo razen nekaterih manjših sprememb, sledili navodilom proizvajalca. Metoda temelji na označevanju z dendrimeri (slika 4). Med sintezo cDNA smo sintetizirali repke, na katere se med hibridizacijo vežejo fluorescentna barvila. Na mikromreže smo najprej hibridizirali cDNA, nato pa dendrimere (do 900 molekul) fluorescentnih barvil Cy3 in Cy5 (3DNA »capture reagent«) in tako dosegli ojačanje signala (Stears in sod., 2000).



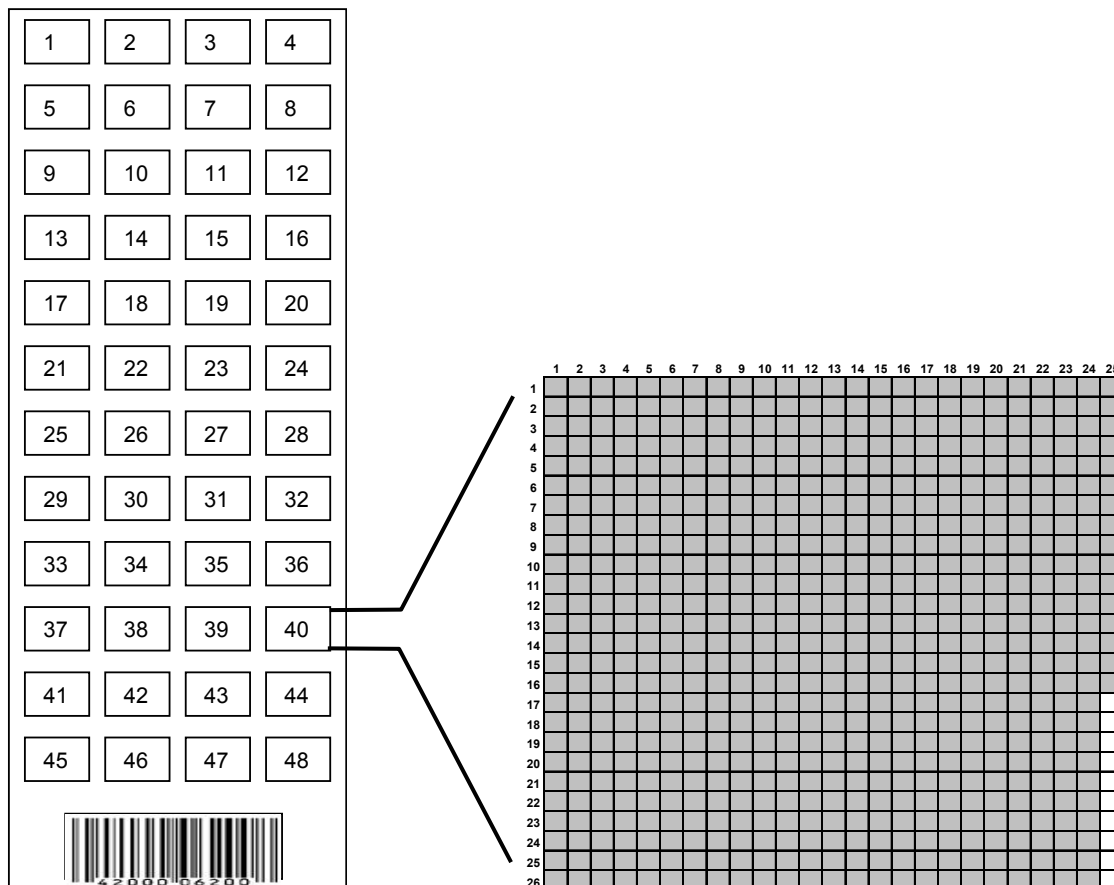
Slika 4: Shema hibridizacije z označevanjem z dendrimeri.

Figure 4: Scheme of the dendimer-labeling based hybridization.

3.3.1 Mikromreže

cDNA-mikromreže, ki smo jih uporabili pri eksperimentalnem delu, smo kupili pri The Institute of Genomic Research (TIGR, ZDA). Na mikromrežah je bila točkovno nanesena cDNA, ki so jih pridobili iz različnih organov krompirja ter iz odvzemnih knjižnic cDNA krompirja po interakciji z glivo *Phytophthora infestans*. Skupaj s kontrolnimi cDNA so na mikromreže točkovno nanesli 15 264 različnih cDNA, vsak klon v dveh prostorsko ločenih ponovitvah. Samo 12 091 klonov cDNA so uspeli validirati (preveriti s ponovnim sekveniranjem in z agarozno elektroforezo). Na mikromrežah je zato od skupno 32 448 samo 24 182 točk validiranih.

Mikromreža je natisnjena na standardnem objektnem stekelcu. cDNA je bila nanesena s 48 iglami v 48 blokih (slika 5), v vsakem je 25 stolpcev in 26 vrstic nanesene cDNA.



Slika 5: Shema TIGR krompirjevih cDNA-mikromrež: cDNA je natisnjena v 48 blokih (levo), v vsakem (desno) je 25 stolpcev in 26 vrstic točk cDNA.

Figure 5: Scheme of TIGR potato cDNA microarrays. cDNA is spotted in 48 blocks, with the 25 columns and 26 rows of cDNA spots in each block.

Za vsak klon nanesene cDNA (npr. STMCE08), smo lahko v bazi podatkov StGI (TIGR potato gene index database, www.tigr.org/tigr-scripts/tgi/T_index.cgi?species=potato) poiskali naslednje informacije:

- oznaka v bazi GenBank: za vsak klon je dostopna oznaka za 5' in 3' konec zaporedja (npr. BQ111934, BQ111935)
- skupno zaporedje (TC, tentative consensus sequence, npr. TC92773): celotno zaporedje vseh klonov cDNA, ki naj bi predstavljali en gen.
- Verjetna določitev (putative annotation) TC (npr. cysteine proteinase inhibitor – potato (PCPI 8.3))

Za vsako točko nanese cDNA smo od proizvajalca prejeli informacije, združene v datoteko GAL (Genepix Allocation List), ki vsebuje poleg zgoraj omenjenih informacij (ime klona, TC, določitev, oznaka v genski banki) še podatke o lokaciji točke na mikromreži (npr. 3. blok, 12. vrstica, 2. stolpec) in vrednost parametra ID. Mesta na mreži, kjer cDNA ni bila nanese, so imela vrednost ID = null (npr. spodnje vrstice 25. stolpca, slika 5), točke, kjer nanese cDNA ni bila validirana, pa vrednost ID = 0. Ostale točke so imele vrednost ID = 1.

Na mikromrežah je tudi precej točk s kontrolno cDNA. Pozitivne cDNA kontrole so: cDNA in gDNA krompirja in paradižnika (za gene, ki so vključeni v vzdrževalne funkcije, fotosintezo in obrambni odgovor) in luciferazna cDNA. Kot negativne kontrole so na mikromrežah nanese cDNA človeka in bakterij ter cDNA patogene glive *P. infestans*. Slednja lahko služi kot kontrola okužbe s to glivo.

3.3.2 Rastopine za hibridizacijo mikromrež

20 x SSC

- 3 M NaCl
- 0,3 M natrijev citrat
- pH 7,0

TE

- 10 mM Tris-HCl
- 1 mM EDTA
- pH = 8,0

Pufer za predhibridizacijo

- 5 x SSC
- 0,1 % SDS
- 1 % BSA
- filtrska sterilizacija

Pufer za posthibridizacijsko spiranje 1

- 1 x SSC
- 0,1 % SDS

Pufer za posthibridizacijsko spiranje 2

- 0,1 x SSC
- 0,1 % SDS

Pufer za posthibridizacijsko spiranje 3

- 0,1 x SSC

DTT

- 0,1 M ditioneitol
- 3M Na-acetat
- filtrsko sterilizirano, hranimo alikvotirano pri -20 °C

3.3.3 Priprava cDNA

3.3.3.1 Obratno prepisovanje

Na ledu smo pripravili RNA-RT mešanico, ki je vsebovala:

- 8 µl totRNA (očiščene in skoncentrirane, glej 3.2.4)
- 1 µl RT-začetnih nukleotidov (ločeni za slepe in z virusom inokulirane vzorce)
- 2 µl luciferazne mRNA (kontrola; 0,5 ng / µl, Promega, ZDA)

Mešanico smo premešali z vrtinčenjem, jo kratko centrifugirali ter inkubirali 10 minut pri 80 °C in nato še 2 - 3 minute na ledu.

V naslednjem koraku smo pripravili reakcijsko mešanico, ki je vsebovala:

- 4 µl 5x SuperScript II Buffer (Invitrogen, ZDA),
- 2 µl 0,1M DTT (Invitrogen, ZDA),
- 1 µl dNTP mix (3DNA komplet),
- 1 µl Superscript II RNase inhibitor (3DNA komplet) in
- 1 µl Superscript II RNase H⁻ Reverse Transcriptase (Invitrogen, ZDA).

Pripravljeno reakcijsko mešanico smo premešali in kratko centrifugirali. 8,8 µl te mešanice smo nato dodali k vsakemu vzorcu RNA-RT mešanice, vse skupaj zopet premešali in kratko centrifugirali, ter nato vse skupaj inkubirali 2 uri pri 42 °C.

Reakcijo smo ustavili z dodatkom 3,5 µl 0,5M NaOH / 50mM EDTA. Vzorec nato inkubirali 10 minut pri 65 °C in tako denaturirali DNA/RNA hibride ter razgradili preostalo RNA. Reakcijo smo nevtralizirali s 5 µl 1M TRIS-HCl (pH 7,5) in tako dobili 28,5 µl vzorca.

Vzorca slepo inokulirane in okužene rastline krompirja smo nato združili, izpraznjeno mikrocentrifugirko pa sprali s 73 µl pufru TE. Končni volumen združenega vzorca cDNA je bil tako 130 µl.

3.3.3.2 Koncentriranje cDNA

Združene vzorce parov slepo inokulirane in z virusom okužene rastline smo pred hibridizacijo ponovno očistili in skoncentrirali s kolonami Microcon YM-30 (Millipore, ZDA).

Kolono smo najprej sprali s 100 µl pufru TE in jo centrifugirali 3 minute pri 13 000 g. Nato smo nanjo naložili 130 µl of cDNA in vse skupaj centrifugirali 9 minut pri 13 000 g. Odstranili smo jo z nosilca, nanjo dodali 5 µl pufru TE, jo nežno potresli in jo pazljivo namestili v nov nosilec, tokrat obrnjeno navzdol. Z 2-minutnim centrifugiranjem pri 13 000 g smo v nosilec eluirali 3 - 10 µl skoncentrirane in očiščene cDNA, ki smo ji dodali ddH₂O do končnega volumna 8 µl in jo do hibridizacije na cDNA-mikromreže shranili pri -20 °C.

3.3.4 Hibridizacija

Naenkrat smo izvajali hibridizacijo 2 ali 3 mikromrež, to je 2 ali 3 parov vzorcev cDNA.

3.3.4.1 Predhibridizacija

Postopek za predhibridizacijo mikromrež smo priredili po metodi, ki so jo objavili Hedge in sodelavci (2000). Ključna sestavina predhibridizacijskega pufru je goveji serumski albumin (BSA), ki zapolni nespecifična vezavna mesta na mikromreži in tako prepreči nespecifično vezavo cDNA in barvil, kar je lahko vzrok za visoko ozadje. Mikromreže smo postavili v čašo Coplin s predhibridizacijskim pufrom (glej poglavje 3.3.2), ki smo ga predhodno segreli na 42 °C in jih nato inkubirali pri tej temperaturi 45 minut.

Mikromreže smo dvakrat sprali v ddH₂O in enkrat v izopropanolu ter pazili, da se med posameznimi koraki spiranja mikromreža ni posušila, kar bi lahko imelo za posledico visoko ozadje.

Takoj po spiranju smo mikromreže posušili s centrifugiranjem (1 minuta pri 1000 g). Če smo po centrifugiranju na mikromreži opazili ostanke predhibridizacijskega pufru, smo postopek spiranja in sušenja ponovili. Posušene mikromreže smo do nanosa hibridizacijske mešanice inkubirali pri 50 °C.

3.3.4.2 Hibridizacija s cDNA

Za cDNA hibridizacijo ene mikromreže smo pripravili 80 µl hibridizacijske mešanice, ki je vsebovala:

- 9 µl cDNA, predhodno denaturirana (10 minut pri 65 °C)
- 40 µl hibridizacijskega pufru na formamidni osnovi (3DNA komplet), pripravljen z 10-minutno inkubacijo pri 65-70 °C, mešanjem z vrtinčenjem in centrifugiranjem
- 2 µl blokatorja LNA (3DNA komplet),
- 1 µl DNA lososovih testisov (Salmon testis DNA, 1 µg / µl, Sigma, ZDA), predhodno denaturirana (10 minut pri 98 °C)
- 28 µl DEPC vode (3DNA komplet).

Hibridizacijsko mešanico smo kratko centrifugirali pri 15 000 g, jo inkubirali 3 minute pri 95 °C ter jo do nanosa na mikromrežo hranili pri 45 °C.

Na mikromrežo, ki smo jo predhodno segreli na 50 °C, smo postavil krovnik LifterSlip (Erie Scientific Company, ZDA) tako, da sta bila stranska gumijasta pasova obrnjena na mikromrežo. Na spodnji rob mikromreže smo nanесли približno 70 µl hibridizacijske mešanice enakomerno po celotni širini krovnika tako, da se niso tvorili zračni mehurčki, ki bi lahko onemogočili hibridizacijo cDNA na komplemnetarno sekvenco na mikromreži. Kapilarna sila je potegnila mešanico pod krovnik. Tako pripravljeno mikromrežo smo namestili v hibridizacijsko komoro (GeneMachines, ZDA). Da bi preprečili izhlapevanje vode iz hibridizacijske mešanice izpod krovnika, smo v kanalčke hibridizacijske komore nakapljali približno 50 µl pufru 0,1 x SSC ter komoro dobro zaprli. Inkubirali smo jo v vodni kopeli 16 - 20 ur (čez noč) pri 45 °C.

3.3.4.3 Spiranje mikromrež po cDNA hibridizaciji

Mikromrežo, katere se je še vedno držal krovnik, smo potopili v čašo s pufrom za posthibridizacijsko spiranje 1 (glej 3.2) in tako dosegli, da je krovnik odstopil od mikromreže. Nato smo mikromreže namestili v nosilec za objektna stekelca. Tega smo postavili v čašo s pufrom 1 in vse skupaj stresali 5 minut (stresalnik VXR, IKA, Nemčija) pri nizkih obratih stresanja pri sobni temperaturi. Nato smo nosilec prenesli v čašo s pufrom za posthibridizacijsko spiranje 2 (glej 3.2) in vse skupaj stresali kot je opisano zgoraj. Postopek spiranja smo ponovili še s pufrom za posthibridizacijsko spiranje 3 (glej 3.2). Volumen uporabljenih pufrov za spiranje je bil 600 ml. Med postopkom spiranja smo pazili, da se mikromreže niso posušile, saj bi se na zasušene pufre lahko nespecifično vezala barvila, kar bi povišalo vrednost ozadja.

Mikromreže smo posušili kot je opisano v poglavju 3.3.4.1.

3.3.4.4 Hibridizacija z dendrimeri

Zaradi svetlobne občutljivosti barvil smo postopke izvajali v temi.

Za 3DNA hibridizacijo ene mikromreže smo pripravili 75 µl hibridizacijske mešanice, ki je vsebovala:

- 2,5 µl dendrimerov Cy3 (3DNA komplet),
- 2,5 µl dendrimerov Cy5 (3DNA komplet),
- 37 µl hibridizacijskega pufru na formamidni osnovi (3DNA komplet),
- 1 µl denaturirane DNA lososovih testisov (1 µg / µl)
- 34 µl vode (3DNA komplet).

Raztopine dendrimerov smo pripravili tako, da smo jih talili 20 minut v temi, pri sobni temperaturi, jih premešali z vrtinčenjem in kratko centrifugirali. Sledila je 10 minutna inkubacija pri 55 °C, mešanje z vrtinčenjem in kratko centrifugiranje. DNA lososovih testisov in predhibridizacijski pufer smo pripravili kot je opisano v poglavju 3.3.4.2.

Hibridizacijsko mešanico smo kratko centrifugirali pri 15 000 g in inkubirali 10 minut pri 80 °C. Do nanosa na mikromrežo smo jo hranili pri 45 °C.

3DNA hibridizacijsko mešanico smo nanесли na mikromrežo po enakem postopku kot cDNA hibridizacijsko mešanico (glej 3.3.4.2). Mikromrežo smo inkubirali v hibridizacijski komori v vodni kopeli 4 ure pri temperaturi 45 °C.

3.3.4.5 Spiranje mikromrež po hibridizaciji z dendrimeri

Vse korake tega spiranja smo izvajali v temi. V ta namen smo čaše, v katerih smo spirali mikromreže, ovili v aluminijasto folijo.

Postopek spiranja in sušenja mikromrež po 3DNA hibridizaciji je bil enak kot postopek po hibridizaciji s cDNA, le da sta pufru za posthibridizacijsko spiranje 1 in 2 vsebovala še DTT (0,1 M ditiotreitrol, Sigma, ZDA), ki deluje kot antioksidant in tako prepreči svetlobno bledenje fluorescenčnih barvil. Po zadnjem sušenju smo mikromrežo do optičnega branja hranili temi pri sobni temperaturi v.

3.3.5 Optično branje mikromrež

Z optičnim čitalnikom (LS200 scanner, TECAN, ZDA v kombinaciji s programom ArrayPro Analyzer[®], Media Cybernetics, ZDA) smo zaznali jakost svetlobe, ki sta jo po vzpodbujanju z lasersko svetlobo oddajali barvila Cy3 (573 – 613 nm, zeleni del vidnega spektra) in Cy5 (672 - 712 nm, rdeči del vidnega spektra). Večja jakost svetlobe je odražala večje število molekul barvila v posamezni točki, kar je nadalje pomenilo večjo količino vezane cDNA in večje število molekul mRNA v vzorcu, označenim s tem barvilom. Postopek optičnega branja mikromrež smo izvedli še isti dan, takoj po zadnjem spiranju in sušenju mikromrež, saj barvila (še zlasti barvilo Cy5) postopno razpadajo.

Mikromreže smo vstavili v nosilec tako, da so bile točke nanesene cDNA obrnjene navzdol. S potiskom mikromrež v zgornji levi kot smo zagotovili enak položaj pri optičnem branju. Nosilec smo vstavili v optični čitalnik.

V optičnem čitalniku smo nastavili geometrijske parametre mikromreže: območje optičnega branja, debelino stekelca in avtomatsko ostrenje. Na kanalu 1 smo zaznavali svetlobo, ki jo je oddajalo barvilo Cy5 (vzpodbujevalna svetloba = 633 nm, filter = 670 nm). Na kanalu 2 smo zaznavali svetlobo, ki jo je oddajalo barvilo Cy3 (vzpodbujevalna svetloba = 543 nm, filter = 590 nm). Ločljivost optičnega branja je bila 10 µm, frekvenca optičnega branja 1 točke cDNA (oversampling) pa 2.

Pred optičnim branjem smo vedno izvedli predpregled, da smo točno določili območje optičnega branja in avtomatskega ostrenja ter nastavili jakost spodbujevalne laserske svetlobe (gain).

Za vsako mikromrežo smo najprej optično prebrali jakost svetlobe, ki jo je po spodbujanju z lasersko svetlobo oddajalo barvilo Cy5 (kanal 1), in nato še jakost svetlobe, ki jo je po spodbujanju z lasersko svetlobo oddajalo barvilo Cy3 (kanal 2). Jakost spodbujevalne laserske svetlobe smo prilagodili jakosti dobljenega signala. Ker je imelo barvilo Cy 5 navadno višji signal kot Cy3, smo navadno na kanalu 1 nastavili jakost 180, na kanalu 2 pa 200. Preverili smo tudi, da pri uporabljeni jakosti ni bilo preveč točk saturiranih.

Rezultat smo dobili v obliki dveh slik (eno za Cy5 in drugo za Cy3) v formatu TIFF.

3.3.6 Obdelava podatkov

3.3.6.1 Analiza slike

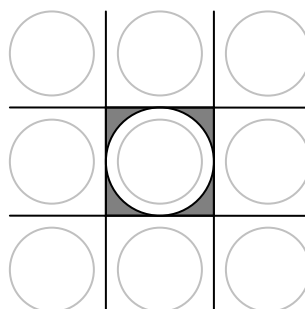
Slike, dobljene z optičnim branjem, smo analizirali s programom ArrayPro Analyzer[®] (Media Cybernetics, ZDA). V tem programu smo slike obrnili, nastavili mrežo, točkam pripisali podatke o nanešeni cDNA (datoteka GAL), ocenili kvaliteto posameznih točk ter izvozili podatke o signalu točk in ozadju na obeh kanalih.

S postavitvijo mreže smo definirali območje, kjer je bila nanesena cDNA. Pri nastavitvi za mrežo smo upoštevali podatke o razporeditvi točk nanesene cDNA v bloke, stolpce in vrstice (datoteka GAL) ter dejstvo, da so bile točke nanešene cDNA neenakomerne velikosti. Nato smo približno mrežo smo naložili na slike ter jo z ukazom »Auto align« in

vizuelnim pregledovanjem natančno nastavili.

Po postavitvi mreže smo nastavili izračun naslednjih parametrov (za oba kanala):

- Intenziteta v točki: Rf (red foreground) - za barvilo Cy3 in Gf (green foreground) - za barvilo Cy5 (izražena v arbitrarnih enotah), je bila izračunana kot modificirana aritmetična sredina signala slikovnih elementov (pixel) na celotni površini točke nanešene cDNA.
- Ozadje posamezne točke (Gb – green background in Rb – red background) je bilo izračunano kot modificirana aritmetična sredina signala v lokalnih kotih posamezne točke (slika 6).



Slika 6: Shema položaja lokalnih kotov (pobarvani temno sivo) točk nanešene cDNA na mikromreži, iz signala katerih smo izračunali ozadje za posamezno točko.

Figure 6: Scheme the position of the local corners of the spots on microarray which were used to extract background signal for each spot.

Za bolj zanesljivo nadaljno analizo smo že med analizo slike izvedli kontrolo kvalitete in izločili točke po naslednjih kriterijih:

- Mesta na mreži, kjer cDNA ni bila nanesena (ID = null) in točke cDNA, ki niso bile validirane (ID = 0) (glej poglavje 3.3.1 in sliko 5)
- Točke nepravilnih oblik (artefakti prahu, oblika obroča ipd.), kjer povprečna vrednost signala ne odraža pravega stanja:

$$\frac{Gf}{SD(Gf)} < 1 \quad \text{ali} \quad \frac{Rf}{SD(Rf)} < 1 \quad \dots(1)$$

kjer je SD standardna deviacija signala točke.

- Točke z nizkim razmerjem med signalom in šumom (SNR, povzročijo ga lahko prašni delci, premaknjena sosednja točka ipd.), kjer bi lahko napačen izračun ozadja pomenil napačen izračun signala te točke cDNA

$$\frac{Gf}{SD(Gb)} < 3 \quad \text{ali} \quad \frac{Rf}{SD(Rb)} < 3 \quad \dots(2)$$

kjer je SD standardna deviacija signala ozadja.

- Točke z nizkim signalom glede na ozadje na obeh kanalih:

$$\frac{Gf}{Gb} < 3 \quad \text{in} \quad \frac{Rf}{Rb} < 3 \quad \dots(3)$$

Za nadaljne analize smo za vsako točko cDNA določili vrednost parametra »Ignore Filter«. Točke, izločene po zgoraj navedenih kriterijih so imele vrednost 0, ostale pa vrednost 1. Parameter smo v nadaljnih analizah uporabili kot utež.

Po končani analizi smo v .txt datoteko izvozili naslednje vrednosti za vsako točko:

- Name (verjetna določitev, putative annotation, iz datoteke GAL)
- Clone_name (oznaka klona, iz datoteke GAL)
- Gf
- Rf
- Gb
- Rb
- Ignore Filter

3.3.6.2 Predpriprava podatkov

Naslednje faze predpriprave podatkov (normalizacija, kontrola kvalitete, priprava matric za statistično testiranje) smo izvedli v odprtokodnem statističnem programu R (R Development Core Team, 2005). Uporabili smo pakete »marray«, »convert« in »limma« (Smyth in sod., 2005). Postopek analize smo priredili po Baebler in sodelavci (2005).

Pred uvozom podatkov signala točk in ozadja na obeh kanalih smo pripravili datoteko »phenodata«, ki je vsebovala podatke o vseh mikromrežah: vzorci, označevanje in imena datotek s podatki. Z ukazi paketa »limma« smo nato povezali podatke o signalih in utežeh ter datoteko GAL v objekt tipa RG.

S funkcijo »imageplot« smo pregledali vrednosti in razporeditev signalov točk in ozadja na vseh mikromrežah (glej tudi sliko 10). Nato smo z ukazom »normalizeWithinArrays« od signala točk odšteli ozadje in signal normalizirali (normalizacija lowess). Nastali objekt MA je tako vseboval vrednosti:

$$M = \log_2\left(\frac{R}{G}\right) \quad \text{in} \quad A = \log_2\left(\frac{R * G}{2}\right) \quad \dots(4)$$

kjer sta R in G vrednosti signala Cy3 in Cy5, z odštetim ozadjem. Za kontrolo normalizacije smo izdelali tudi objekt MA, ki ni bil normaliziran. Nato smo za vsako posamezno mikromrežo primerjali razporeditev M vrednosti v odvisnosti od A z MA grafikonom pred in po normalizaciji (slika 12). Razporeditev vrednosti M pred in po normalizaciji smo med mikromrežami primerjali z grafikonom kvantilov (slika 11).

Sledilo je povprečenje vrednosti A in M za obe točki istega klona cDNA. V primeru, da smo zaradi slabe kvalitete eno izmed paralelk za posamezen klon v predhodni analizi izključili, smo upoštevali le vrednost dobre paralelke.

Pri tako pripravljenih podatkih smo upoštevali še označevanje. Prednastavljeno računanje vrednosti M (enačba 4) predvideva, da je tretiran vzorec označen z barvilom Cy3 (G), kontrola pa s Cy5 (R). Ker smo v naših eksperimentih med biološkimi ponovitvami izvedli zamenjavo barvil, smo vrednosti M tistih mikromrež, pri katerih je bila kontrola označena z barvilom Cy5 (R), pomnožili z -1. Tako vrednost M, predstavljena v rezultatih, vedno predstavlja relativno izražanje v okuženih rastlinah, glede na slepo inokulirane rastline.

Da bi zmanjšali število genov za statistična testiranja in tako povečali statistično zanesljivost, smo odfiltrirali tiste gene, ki niso kazali različnega izražanja med vzorcema. Odstranili smo tiste klone, ki so imeli na vseh mikromrežah vrednost M med -0,2 in 0,2.

Nato smo izvozili vrednosti A in M, ter jih združili s podatki o nanieseni cDNA. Tako pripravljeno tabelo smo uporabili za statistično analizo podatkov.

3.3.6.3 Analiza podatkov

Pripravljen podatke o cDNA in izražanju pri vseh parih vzorcev smo uvozili v odprtokodni program MeV v3.1 (Saeed in sod., 2003; www.tm4.org/mev.html) in izvedli statistični analizi t-test in dvofaktorsko analizo variance (ANOVA).

S t-testom smo testirali, ali je izražanje genov v okviru ene skupine bioloških ponovitev statistično značilno različno od vrednosti 0, glede na t-porazdelitev. Mejo statistične značilnosti smo določili pri $p = 0,1$ nato pa izbrali le tiste gene, ki so imeli absolutno povprečno vrednost M med biološkimi ponovitvami večjo od 0,3.

Pri testu ANOVA smo uporabili dvofaktorsko analizo s faktorjema sorta in čas, ki sta vsaka vsebovala 2 nivoja. Tako smo iskali gene, ki se statistično različno izražajo med sortama, časovnim točkama in v interakciji obeh faktorjev, glede na F-porazdelitev. Mejo statistične značilnosti smo določili pri $p = 0,01$.

3.4 PCR V REALNEM ČASU

Metodo PCR v realnem času smo uporabili za:

- Optimizacijo postopkov priprave cDNA in reakcije PCR v realnem času
 - razgradnja gDNA z DNazo
 - uporaba različnih reverzних transkriptaz in začetnih oligonukleotidov za sintezo cDNA
 - ponovljivost reakcij RT in PCR v realnem času
 - optimizacija koncentracije začetnih oligonukleotidov in cDNA za reakcijo PCR v realnem času
- Študij izražanja izbranih genov v zgodnjem odgovoru na okužbo s PVY^{NTN} pri sortah krompirja 'Igor' in 'Sante' (preglednica 2).

Preglednica 2: Tarčni geni pri analizi PCR v realnem času, sistem detekcije, uporaba in vir.

Table 2: Target genes, detected with real-time PCR

Tarčni gen	Okrajšava	Detekcija	Uporaba	Vir
Plaščni protein PVY ^{NTN}	CP PVY ^{NTN}	TaqMan	kontrola inokulacije	Toplak in sod., 2004
Katalaza 1	cat1	TaqMan, MGB	optimizacije	Pompe Novak in sod., oddano
Protein z neznano vlogo [24/76]	puf	TaqMan, MGB	optimizacije	Pompe Novak in sod., 2006
Aminociklopropan oksidaza	ACCOx	TaqMan, MGB	optimizacije	Baebler in sod., 2003
Luciferaza	luc	TaqMan	normalizacija	Toplak in sod., 2004
Elongacijski faktor 1	ef-1	TaqMan	normalizacija	Krečič Stres, 2006
18 S rRNA	18S	TaqMan	normalizacija	Applied Biosystems, ZDA
Krompirjev cisteinski proteinazni inhibitor	PCPI	SYBR Green I	izražanje genov	Krečič Stres, 2006
Proteinazni inhibitor TR8	PI TR8	SYBR Green I	izražanje genov	Krečič Stres, 2006
Protein vročinskega šoka 70_1	Hsp70_1	SYBR Green I	izražanje genov	*
Protein vročinskega šoka 70_2	Hsp70_2	SYBR Green I	izražanje genov	*
Protein vročinskega šoka 40	Hsp40	SYBR Green I	izražanje genov	*
Protein vročinskega šoka 90	Hsp90	SYBR Green I	izražanje genov	Pompe Novak in sod., oddano
Mali protein vročinskega šoka	sHsp	SYBR Green I	izražanje genov	*
S patogenezo povezan protein 1	PR-1	SYBR Green I	izražanje genov	Krečič Stres, 2006
S patogenezo povezan protein 10a (STH2)	PR-10	SYBR Green I	izražanje genov	Krečič Stres, 2006

* izdelava začetnih oligonukleotidov je predmet pričujoče doktorske disertacije

Razen v primeru ugotavljanja uspešnosti razgradnje gDNA, smo pred analizo PCR v realnem času totRNA prepisali v cDNA. Za analizo PCR v realnem času smo uporabili 2 metodi zaznavanja pomnoženih produktov: TaqMan in SYBR Green I. Skupno smo tako zaznavali 16 tarčnih genov (preglednica 2), bodisi za kontrolo inokulacije rastlin z virusom, bodisi za optimizacijo postopkov, za normalizacijo ali za ugotavljanje izražanja genov. Gene, katerih izražanje smo spremljali z metodo PCR v realnem času smo izbrali glede na preliminarne rezultate pridobljene z mikromrežami, ter glede na verjetno vlogo pri odzivu rastline na okužbo. Izbrali smo gene za proteinazna inhibitorja (PI TR8 in PCPI), proteine vročinskega šoka (Hsp70_1, Hsp70_2, Hsp40, Hsp90 in sHsp) ter PR-proteina (PR-1 in PR-10).

3.4.1 Sonde in začetni oligonukleotidi

V preglednici 3 so prikazani začetni oligonukleotidi in sonde, ki smo jih uporabili za metodo PCR v realnem času. Začetni oligonukleotidi so bili proizvedeni pri MWG Biotech AG (Nemčija) ali Applied Biosystems (ZDA). Sonda in začetni oligonukleotidi za 18S so bili sestavni del kompleta 18S rRNA (Applied Biosystems, ZDA), zato njihovo nukleotidno zaporednje ni poznano.

Preglednica 3: Sonde in začetni oligonukleotidi za PCR v realnem času: tarčni gen, nukleotidno zaporedje za smiselni (F) in protismiselni (R) začetni oligonukleotid ter sondo (S). Pri sondah so označena tudi reporterska in dušilna barvila.

Table 3: Primers and probes used for real-time PCR.

Tarčni gen	Nukleotidno zaporedje
CP PVY ^{NTN}	F: 5'-AATCTGCGCGATGGAAGTTT-3'
	R: 5'-ACCGTCCAACCCGAAAAGTC-3'
	S: 5'-FAM-CTCGCTATGCTTTTGACTTTTATGAGGTCACATC-TAMRA-3'
cat1	F: 5'-ANCAAATGGGTTGAGTCTCTATCC-3'
	R: 5'-AGGACTTGTCAGCCTGAGACAAGTAT-3'
	S: 5'-FAM-CTCATGAGATTGCGAGCAT-3'-MGB
puf	F: 5'-ACGCTCTCTGGAGCTTCAGA-3'
	R: 5'-AACATCCCCACAGGCTTAACA-3'
	S: 5'-FAM-ACTATTCAATTCCATTGCTT-3'-MGB
ACCOx	F: 5'-AAGGGACTCCGCGCTCATA-3'
	R: 5'-CAAGTTGGTCACCAAGTTAACC-3'
	S: 5'-FAM-TCGATGTTCCCTCCCATGCGCC-3'-MGB
luc	F: 5'-CTGATTTTCTTGCCTCGAGTTT-3'
	R: 5'-TCAAGTAACAACCGCGAAAAAG-3'
	S: 5'-VIC-AGACCTTTCGGTACTTCGTCCACAAACACAA-TAMRA-3'
ef-1	F: 5'-GGAAGCTGCTGAGATGAACAAGA-3'
	R: 5'-CTCACGTTTCAGCCTTAAGTTTGTG-3'
	S: 5'-FAM-TCATTCAAGTATGCCTGGGTGCT-TAMRA-3'
PCPI	F: 5'-GGATATCCTCGTCTGGTGACTGT-3'
	R: 5'-ATTAGCATTCTACGCTTGATGAA-3'
PI TR8	F: 5'-TGGATTTTGCATATGTAGAAACT-3'
	R: 5'-CATCCTTTTTTACCTGCAGAACAG-3'
Hsp70_1	F: 5'-CCCTAGGGCACTTAGAAGTTGA-3'
	R: 5'-GTGGTCTGAGCAGTGGATGAAA-3'
Hsp70_2	F: 5'-GAAGTTGATTAAGCTTCAGATTATGATGA-3'
	R: 5'-AACTGGAAAAGACTAGACTGGATGAAA-3'
Hsp40	F: 5'-ACCCAGACGTATGCAGAGGAA-3'
	R: 5'-ACATCGTAAGCTTCATTGATTTGG-3'
Hsp90	F: 5'-GAACGTAGGCTCAAGGACCTATTAA-3'
	R: 5'-AAATTCCTTCTCTATGGTCTTCTCAA-3'
sHsp	F: 5'-TGTGCAATTTGAGTCTGATGTTGT-3'
	R: 5'-TTATTTTCCAGAGACCAACCTAGCTT-3'
PR-1	F: 5'-TATGAATAATTCACGTACCATATGTTT-3'
	R: 5'-GTGGAAACAAGAAGATGCAATACTTAGT-3'
PR-10	F: 5'-CACATGAAGCCACAAGCACAGT-3'
	R: 5'-TGTCAGCATCAACAACCAAAGC-3'

3.4.2 Obratno prepisovanje

Da bi ugotovili značilnosti in optimizirali pogoje RT smo v preliminarnih poskusih preizkusili 2 različna kompleta za RT in tri različne kombinacije oligonukleotidnih začetnikov.

Reakcijo smo izvedli v aparaturi GeneAmp® PCR System 9700HT (Applied Biosystems, ZDA). Količine z DNAzo tretirane totRNA (približno 0,5 µg) smo z agarozno gelsko elektroforezo uravnali med vzorci, ki smo jih primerjali. Vsem vzorcem totRNA smo kot zunanjo kontrolo dodali luciferazno (luc) mRNA (2 ng, Promega, ZDA). TotRNA in luc mRNA smo denaturirali s 5-minutno inkubacijo pri 80 °C. Kot pozitivno kontrolo za reakcije smo nastavili tudi reakcije RT brez totRNA, samo z luc mRNA.

Primerjali smo 4 načine RT:

- a) Komplet za RT GeneAmp® RNA PCR Kit (GeneAmp, Applied Biosystems, ZDA) s 50 enotami reverzne transkriptaze MuLV, 20 enotami inhibitorja RNaz, 5 µM naključnih začetnih oligonukleotidov (Random Hexamers), 0,75 mM dNTP, 2,5 mM MgCl₂ in pufrom PCR Buffer II) v 40 µl-reakciji. Reakcija RT je potekala 10 minut pri 23 °C in nato 60 minut pri 42 °C;
- b) Komplet za RT High-Capacity cDNA Archive Kit (Archive, Applied Biosystems, ZDA) s 125 enotami reverzne transkriptaze MultiScribe™, 5 µM oligo-d(T)₁₆ začetnih oligonukleotidov (Applied Biosystems), dNTP mešanico in pufrom za RT v 40 µl-reakciji. Reakcija RT je potekala 10 minut pri 25 °C in nato 120 minut pri 37 °C;
- c) Komplet za RT Archive Kit, kot je opisano v točki 2, le da smo namesto oligo-d(T)₁₆ uporabili naključne začetne oligonukleotide (5 µM).
- d) Komplet za RT Archive Kit, kot je opisano v točki 2, le da smo uporabili kombinacijo naključnih (2,5 µM) in oligo-d(T)₁₆ (2,5 µM) začetnih oligonukleotidov.

Pripravljeno cDNA smo shranili pri -20 °C. Za študij variabilnosti RT reakcije smo nastavili 4 vzporedne reakcije, kot je opisano v točki b), iz iste izolacije totRNA.

Za študij izražanja genov smo priredili način RT, opisan v točki c) (količina totRNA, uporaba inhibitorja RNaz). V 0,5 ml-mikrocentrifugirki smo razredčili približno 2 µg totRNA (uravnano po parih slepo inokuliran – okužen vzorec) v 25 µl ddH₂O. RNA smo denaturirali kot je opisano zgoraj. Pripravili smo reakcijsko mešanico, ki je vsebovala:

- 5 µl 10 × RT puffer
- 5 µl 10 × RT naključni začetni oligonukleotidi
- 2 µl 25 × dNTP
- 7,5 µl ddH₂O
- 2,5 µl reverzna transkriptaza MultiScribe™ (50 U/ µl)
- 2 µl RNazin (Applied Biosystems, ZDA)
- 1 µl luc mRNA

Nato smo reakcijsko mešanico (25 µl) dodali totRNA (25 µl) in začeli RT kot je opisano v točki b).

3.4.3 Načrtovanje začetnih oligonukleotidov

Poleg uporabe že znanih začetnih oligonukleotidov in sond (navedeni v preglednici 2) smo sami skonstruirali oligonukleotidne začetnike za določanje relativne vsebnosti cDNA genov za proteine vročinskega šoka Hsp70_1, Hsp70_2, Hsp40 in sHsp.

Začetne oligonukleotide smo izdelali na podlagi nukleotidnega zaporedja cDNA, ki je bila nanesena na mikromrežah, katere smo uporabili v naših eksperimentih (glej 3.3.1). V bazi podatkov StGI smo naprej pregledali zaporedja vseh klonov za gene za Hsp, ki so bili naneseni na mikromrežo, in ugotovili, katerim zaporedjem TC odgovarjajo. Izbrali smo tisto zaporedje TC, pri katerih so preliminarni rezultati analize mikromrež kazali na različno izražanje. Nato smo v omenjeni bazi izbrali regijo Unique Oligomer izbranega zaporedja TC (za gen specifična regija, navadno na 5-koncu). Nato smo s programom AlignX (iz paketa VectorNTI; Informax, ZDA), primerjali zaporedja za isti gen iz baz StGI in GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov). Tako smo preverili v kolikšni meri je regija Unique Oligomer res specifična za izbrani gen ter jo uporabili v nadaljnjih postopkih.

Za konstruiranje začetnih nukleotidov in sond smo uporabili program PrimerExpress™ 2.0 (Applied Biosystems, ZDA). Ker je bila regija Unique Oligomer navadno dolga le 70 bp, kar je bilo premalo za konstrukcijo začetnih oligonukleotidov s pomočjo tega programa, smo k regiji Unique Oligomer dodali še približno 70 bp proti 3-koncu. Celotna dolžina zaporedja je tako znašala približno 150 bp. Pri načrtovanju smo upoštevali prednastavljene pogoje programa, ki so se nanašali na delež nukleotidov G in C (30-80%), T_m (58 - 60 °C), dolžino amplikona (50-150 bp) in optimalno dolžino oligonukleotidnih začetnikov (20 nukleotidov). Dodatno smo preverili, kateri kandidatni začetni oligonukleotidi po vsej verjetnosti ne bodo tvorili sekundarnih struktur in dimerov. Za konstrukcijo protismiselnih oligonukleotidov smo izbrano zaporedje prevedli v obratno komplementarno zaporedje.

Specifičnost določenih začetnih oligonukleotidov smo preverili s primerjavo z znanimi zaporedji v bazah podatkov StBI in GenBank s pomočjo programa Basic Local Alignment Tool - BLAST (Altschul in sod., 1990; www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST). Uporabili smo možnost iskanja kratkih, skoraj identičnih zadetkov (search for short, nearly exact matches), pri rastlinah (*Viridiplantae*).

3.4.4 PCR v realnem času

Reakcijo PCR v realnem času smo izvedli v aparaturi ABI PRISM® 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems, ZDA), ki je v osnovi sestavljena iz aparature za PCR in sistema za zaznavanje nastajajočih produktov PCR.

Seznam vseh uporabljenih sond in oligonukleotidnih začetnikov je prikazan v preglednici 3. Razen v nekaterih optimizacijskih poskusih, smo za vsak vzorec vzporedno izvedli reakcijo za določanje količine cDNA izbranih (izražanje genov) in referenčnih genov

(normalizacija: 18S, luc, ef-1).

Pripravili smo 10 μ l reakcijske mešanice, ki je vsebovala 5 μ l 2 \times TaqMan Universal PCR Master Mix ali SYBR Green PCR Master Mix (UMM, Applied Biosystems, ZDA), optimalne koncentracije sond (250 nM) in začetnih oligonukleotidov (300 – 900 nM) in 2 μ l ustrezno redčene cDNA (glej prilogo A). V nekaterih preliminarnih poskusih (študij RT) smo uporabili 20 μ l reakcijske mešanice, ki je vsebovala 10 μ l UMM in enake koncentracije začetnih oligonukleotidov, sond in cDNA, kot je opisano za 10 μ l-reakcijo.

V eni mikrocentrifugirki smo pripravili mešanico reagenta UMM, začetnih oligonukleotidov, sonde (kjer je bilo to potrebno) in ddH₂O, in sicer v volumnu, ki je zadostoval za vse reakcije. Pripravljeno mešanico smo premešali z vrtinčenjem in kratko centrifugirali. Po 8 μ l tako pripravljene mešanice smo nanесли v vdolbinice na ploščici (384 Well Clear Optical Reaction Plates, Applied Biosystems, ZDA) in dodali 2 μ l ustrezno redčene cDNA. Za vsak vzorec smo pripravili dve paralelki v dveh redčenjih. Tako smo lahko opazili morebitno inhibicijo pomnoževanja. V prvi in zadnji vdolbinici istega amplikona smo izvedli reakcijo brez produkta RT (NTC, non-template control). V ti vdolbinici smo, namesto cDNA, dodali ddH₂O.

Pri ugotavljanju izražanja genov smo za pipetiranje uporabili robot MultiPROBE® II HT s 4 konicami za pipetiranje (Perkin Elmer, ZDA). Program je bil nastavljen tako, da je bila na ploščico najprej nanešena cDNA, po kratkem centrifugiranju pa še pripravljena mešanica UMM, začetnikov in sonde.

Ploščico smo pokrili z lepljivo folijo (ABI PRISM® Optical Adhesive Covers, Applied Biosystems, ZDA). Ploščico smo centrifugirali 1 minuto pri 1000 g in jo vstavili v PCR aparaturu.

PCR reakcijo smo izvedli pri naslednjih pogojih:

- Aktivacija polimeraze: 2 minuti pri 50°C, 10 minut pri 95°C
- PCR: 40 ciklov: 10 sekund pri 95 °C, 1 minuta pri 60°C
- Disociacijska krivulja: 15 sekund pri 95°C, 15 sekund 60 °C, 15 sekund pri 95°C

Specifičnost nastalih produktov smo pri uporabi SYBR Green kemije preverili z analizo disociacijske krivulje.

3.4.4.1 Optimizacija koncentracije začetnih oligonukleotidov in tarčne cDNA

Za novo konstruirane oligonukleotidne začetnike s SYBR Green kemijo smo določili njihove optimalne koncentracije, učinkovitost pomnoževanja tarčnih aplikonov, ter optimalne koncentracije tarčne cDNA. Za optimizacije smo uporabili cDNA združeno iz 8 vzorcev, kjer so bili enakomerno zastopani slepi in okuženi vzorci obeh sort.

Vsak začetni oligonukleotid smo pripravili v 2 koncentracijah (300 nM, 900 nM) in tako preizkusili 4 različne kombinacije smiselnega in protismiselnega začetnika za vsak amplikon. Reakcije smo izvedli kot je opisano zgoraj. Uporabili smo koncentrirano in 100-krat redčeno cDNA (pribl. 80 ng in 0,8 ng RNA), da bi zajeli čim širši razpon koncentracije produkta. Z analizo krivulje pomnoževanja smo ugotovili minimalne koncentracije, ki dajo najnižji Ct in maksimalen Δ Rn (glej 3.4.5). Z analizo disociacijske

krivulje smo določili specifičnost nastalih produktov.

Z optimalnimi koncentracijami začetnih oligonukleotidov smo za vse uporabljene amplikone pomnoževali združeno cDNA v seriji štirih desetkratnih redčin. Iz dobljenih vrednosti smo izračunali učinkovitost pomnoževanja (opisano v 3.4.5) ter določili rang kvantifikacije, to je koncentracijo vzorčne cDNA, ki jo pomnožujemo, da dobimo vrednosti Ct med 20 in 30, pri katerih so rezultati relativne kvantifikacije najbolj natančni.

3.4.5 Obdelava podatkov

Podatke PCR v realnem času smo analizirali s programom SDS 2.2 (Applied Biosystems, ZDA). Flurescnečni signal je bil izračunan kot:

$$\Delta Rn = Rn^+ - Rn^- \quad \dots(5)$$

kjer je Rn^+ emisija fluorescence produkta v določenem času in Rn^- emisija pasivnega referenčnega barvila ROX. Program je izrisal graf pomnoževanja produkta PCR, na katerem je bilo na x-os nanešeno število ciklov PCR in na y-os vrednosti ΔRn . Med začetnimi cikli pomnoževanja vrednosti ΔRn niso presegle fluorescence ozadja. Za vsak amplikon smo nastavili bazno linijo (vrednost cikla pred dvigom fluorescenca nad vrednost ozadja) in prag (v eksponentnem območju pomnoževanja). Na podlagi tega je za vsako reakcijo program izračunal vrednosti Ct (treshold cycle), to je cikel, pri katerem ΔRn preseže nastavljeni prag. Vrednost Ct je obratno sorazmerna začetni količini tarčne cDNA, zato jo lahko uporabljamo za izračun absolutne ali relativne količine cDNA določenega amplikona.

Pri optimizacijskih študijah smo vrednosti Ct prenesli v program Microsoft Excel, v katerem smo izračunali povprečne vrednosti Ct. Kjer je bilo potrebno, smo izračunali tudi učinkovitost pomnoževanja posameznega amplikona ter določili relativni nivo izražanja v vzorcih po metodi $\Delta\Delta C_T$ (Livak in Schmittgen, 2001) in luc kot normalizatorjem.

Učinkovitost pomnoževanja posameznega amplikona (E) je odvisna od naklona (S) linearne regresijske krivulje v grafu odvisnosti vrednosti Ct od \log_{10} koncentracije tarčnega zaporedja:

$$E = 10^{(1-S)} \quad \dots(6)$$

Stoodstotna učinkovitost ($E = 2$) ustreza naklonu $S = -3,33$ in pomeni, da se v vsakem ciklu PCR ena kopija tarčnega zaporedja pomnoži v dve novi kopiji. E smo lahko izračunali za vsak vzorec, saj smo vedno analizirali dve redčitvi vzorca.

Pri ugotavljanju različnega izražanja genov smo podatke vseh analiz združili s programom Qbase (Qbase, 2005). Program smo uporabili tudi za kontrolo kvalitete (odstopanja v vrednosti Ct med replikati) ter izračun povprečne vrednosti Ct med replikati iste redčitve vzorca.

Tako dobljene podatke smo prenesli v program Microsoft Excel. Za vsak vzorec in vsak gen smo izračunali relativno izražanje gena glede na učinkovitost pomnoževanja (Pfaffl,

2002):

$$R = \frac{(E_{gen})^{\Delta Ct(gen)}}{(E_{norm})^{\Delta Ct(norm)}} \quad \dots(7)$$

kjer je R: razmerje izražanja preučevanega gena med kontrolnim (slepo inokuliranim) in okuženim vzorcem, E: učinkovitost pomnoževanja preučevanega gena (E_{gen}) ali normalizatorskega gena (E_{norm}), ΔCt : razlika vrednosti Ct med kontrolnim in okuženim vzorcem.

Izražanje genov smo normalizirali glede na 3 gene za normalizacijo: luc, 18S in ef-1 (Preglednica 2 in 3). Izračunali smo povprečno vrednost Ct treh normalizatorskih genov in jo uporabili za izračun vrednosti E_{norm} in $\Delta Ct(norm)$.

Dobljene vrednosti R smo \log_2 transformirali in pripravili matrico za statistično testiranje. Matrico smo uvozili v odprtokodni program MeV v3.1 (Saeed in sod., 2003; www.tm4.org/mev.html). S programom smo in izvedli t-test (za vsako skupino bioloških ponovitev) in dvofaktorsko analizo ANOVA (s spremenljivkami čas in sorta). Gene in vzorce smo združevali z metodo združevanja genov ter izračunali razdalje med profili izražanja genov in vzorcev. Za izdelavo grafov smo uporabili program Microsoft Excel.

4 REZULTATI

4.1 PRIPRAVA RASTLINSKEGA MATERIALA

Za poskuse izražanja genov smo slepo ali z virusom inokulirali rastline sort 'Igor' in 'Sante' (poglavje 3.1.3). Rastlinski material smo pobirali (poglavje 3.1.4) 30 minut in 12 ur po inokulaciji. Za kontrolo bolezenskih znamenj smo ob pobiranju rastlinskega materiala nekaj slepo in z virusom inokuliranih rastlin obeh sort pustili rasti v rastni komori (opisano v poglavju 3.1.1).

Na okuženih rastlinah sorte 'Igor' so se 4 - 5 dni po inokulaciji pojavila prva bolezenska znamenja. Na spodnjem inokuliranem listu so se pojavile točkaste nekroze, ki so se v naslednjih dneh razširile tudi na druge inokulirane liste. 10 dni po inokulaciji so se pojavila sistemska bolezenska znamenja (slika 7, levo), ki so se kazala v obliki kloroz in nagubanja listov. Ob tem času so inokulirani listi že odpadli. Na okuženih rastlinah sorte 'Sante' nismo opazili nobenih bolezenskih znamenj (slika 7, desno).



Slika 7: Rastline (zgoraj) in listi (spodaj) sort krompirja 'Igor' (levo) in 'Sante' (desno) 14 dni po inokulaciji z virusom PVY^{NTN}.

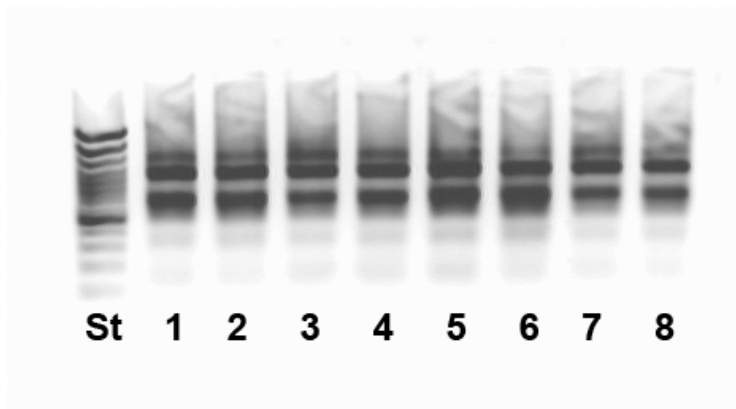
Figure 7: Virus infected plants (upper panel) and leaves (lower panel) of cultivars Igor (left) and Sante (right) 14 days after inoculation.

Uspešnost inokulacije smo ugotavljali z dvema testoma. Rezultati testa ELISA so pokazali, da je bilo okuževanje uspešno. V pripravljene cDNA vzorcev smo z metodo PCR v realnem času ugotavljali prisotnost gena za CP PVY^{NTN}. V vseh okuženih vzorcih smo zaznali prisotnost le-tega, vendar pa s to metodo nismo mogli ugotoviti, ali je šlo za inokulat ali virus, ki je že vstopil v rastlinsko celico.

4.2 PRIPRAVA RNA

4.2.1 Izolacija celokupne RNA

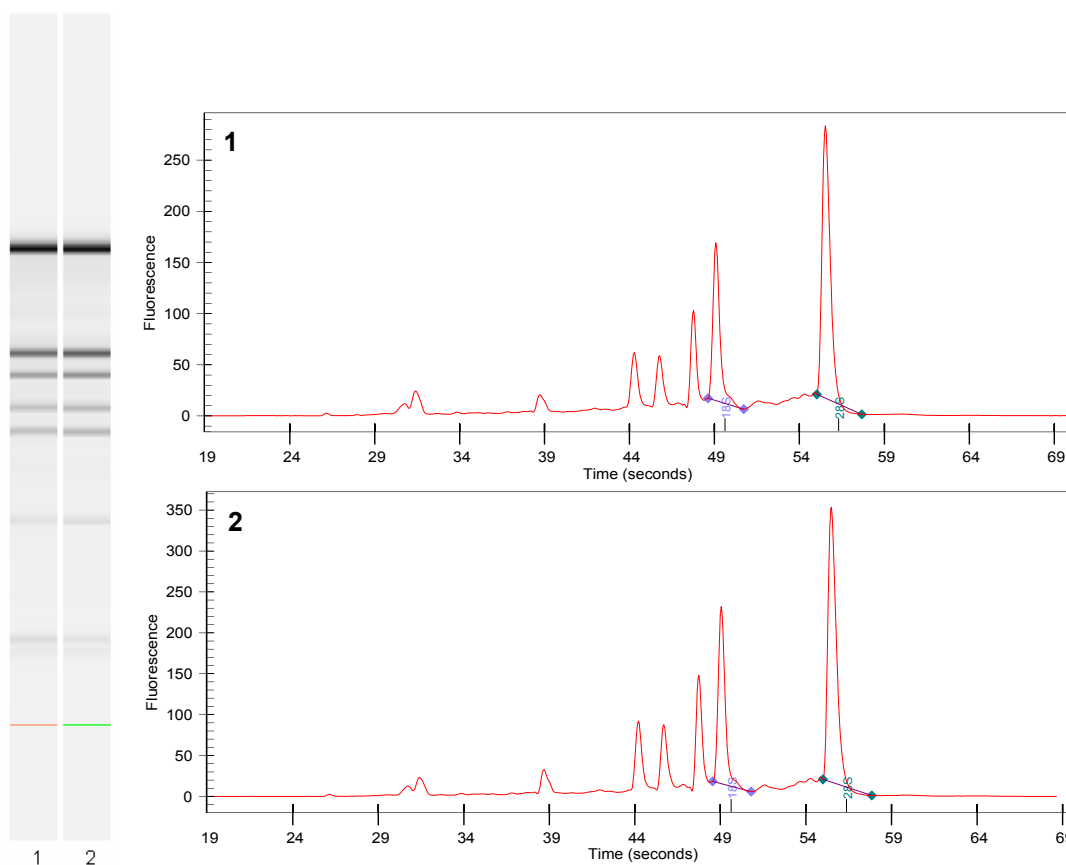
Pri vseh vzorcih smo z agarozno gelsko elektroforezo in kapilarno elektroforezo (aparatura BioAnalyzer) preverili kvaliteto izolirane totRNA. Na elektroferogramih (sliki 8 in 9), so bile rRNA različnih velikosti lepo vidne, kar je pomenilo, da je kvaliteta izolirane RNA dobra. Iz 300 mg rastlinskega materiala smo navadno izolirali približno 100 µg totRNA. Z gelsko elektroforezo po tretiranju z DNazo, smo določili relativne vsebnosti totRNA in tako določili volumen RNA, ki smo ga uporabili za reakcijo RT.



Slika 8: Primer elektroferograma agarozne gelske elektroforeze (negativ) celokupne RNA izolirane iz listov krompirja.

ST - označevalec velikosti DNA, ostalo vzorci RNA iz slepo inokuliranih (1, 3, 5, 7) in z virusom inokuliranih (2, 4, 6, 8) rastlin sorte 'Igor'.

Figure 8: Example of agarose gel electrophoresis electropherogram (negative image) of total RNA isolated from potato leaves (ST – DNA ladder, RNA samples from mock (1, 3, 5, 7) or virus (2, 4, 6, 8) inoculated potato cv. Igor plants).



Slika 9: Primer elektroferograma kapilarne elektroforeze (BioAnalyzer) celokupne RNA izolirane iz listov krompirja sorte 'Sante' 30 minut po slepi (1) ali virusni inokulaciji (2)

Figure 9 Example capillary electrophoresis electropherogram (BioAnalyzer) of total RNA isolated from potato leaves cv. Sante, 30 minutes after mock (1) or virus (2) inoculation.

4.2.2 Razgradnja genomske DNA

Preostalo gDNA v vzorcih totRNA smo razgrajevali z DNAzo I v reakciji v mikrocentrifugirki ali na koloni (opisano v poglavju 3.2.3). Učinkovitost razgradnje smo preverili s pomnoževanjem gDNA za katalazo 1 (cat1) v reakciji PCR v realnem času pred sintezo cDNA. Rezultati (preglednica 4) kažejo, da so netretirani vzorci totRNA vsebovali ostanke gDNA. Z reakcijo z DNAzo I proizvajalca Invitrogen smo uspešno razgradili gDNA že z uporabo 25-krat manjše koncentracije encima kot so priporočila proizvajalca. Po drugi strani pa na koloni (Qiagen) nismo uspeli popolnoma razgraditi gDNA z uporabo priporočene koncentracije encima.

V nadaljnih poskusih smo zato uporabili DNAzo I proizvajalca Invitrogen, v 40 µl-reakciji.

Preglednica 4: Uspešnost razgradnje genomske DNA v vzorcih celokupne RNA (totRNA).

Table 4: Efficiency of DNase treatment of total RNA samples. Residual genomic DNA in isolated total RNA from potato leaf tissue was amplified by quantitative PCR with catalase 1 primers and probe.

Proizvajalec	Konc. DNaze I (U / µg totRNA)	Ct ± SD
Invitrogen	0,04	NA
	0,06	NA
	0,25	NA
Qiagen	0,34	35,4 ± 0,052
	0,68	36,9 ± 0,064
	1,35	NA
	2,7	NA
Pozitivna kontrola		26,5 ± 0,054
Netretirana totRNA		30,0 ± 0,007

Genomsko DNA v vzorcih celokupne RNA, izolirane iz listov krompirja smo pomnožili s PCR v realnem času in začetnimi oligonukleotidi in sondo za gen za katalazo 1. V reakciji smo 8 µg (za reakcijo z DNazo I proizvajalca Invitrogen) ali 40 µg (za razgradnjo na koloni, proizvajalca Quiagen) totRNA razgradili z različnimi koncentracijami encima. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili 5 ng cDNA, pridobljena iz iste totRNA, kot je bila uporabljena za tretiranje (Ct – povprečna vrednost Ct, NA – pod mejo detekcije v PCR v realnem času).

4.3 MIKROMREŽE

4.3.1 Priprava cDNA, hibridizacija in spiranje

cDNA mikromreže smo hibridizirali s 13 pari vzorcev slepo inokuliranih in z virusom okuženih rastlin. Da bi se izognili morebitnim efektom vezave barvila, smo izmenjavali barvila med slepo inokuliranimi in z virusom inokuliranimi vzorci (dye swap). Par vzorcev 'Igor' 12h 1 smo hibridizirali 2-krat z obrnjenima barviloma in tako preverili ponovljivost hibridizacije.

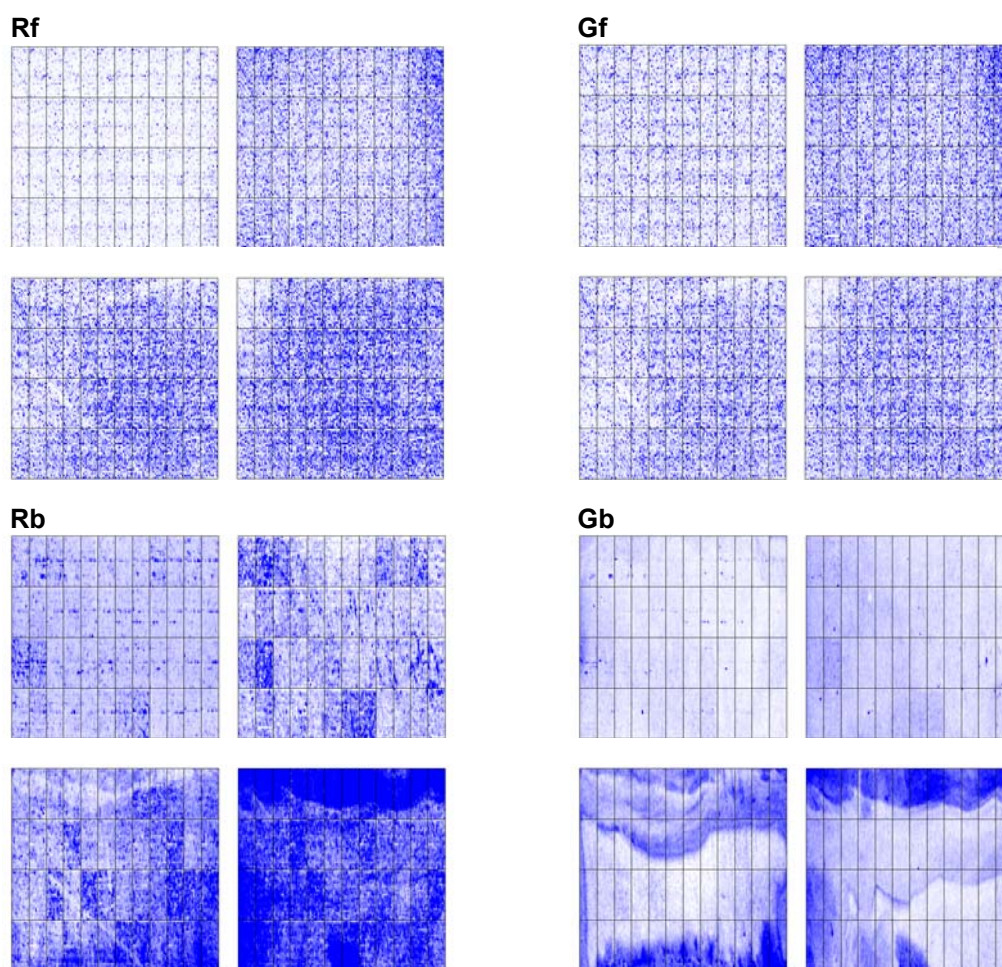
Pri parih S 30 min 1 in 2 ter I 12h 3 hibridizacija v prvem poskusu ni uspela: zaradi nezadostnega signala na celotni ali delu mikromreže smo morali hibridizacije ponoviti. Zaradi nezadostne količine rastlinskega materiala para I 12h 3 nismo mogli ponoviti. Manjkajočo biološko ponovitev smo zato nadomestili s parom I 12h 5. Skupno smo tako izvedli 13 uspešnih hibridizacij.

4.3.2 Analiza podatkov

Po optičnem branju smo podatke o signalih obdelali s programom za obdelavo slike: na sliko smo nastavili mrežo (območje nanese cDNA), točkam pripisali podatke o nanese cDNA, ocenili kvaliteto točk in izračunali vrednosti signala (Rf, Gf) in ozadja (Rb, Gb). Vrednosti signala in ozadja ter utež za kvaliteto točke (1 – dobra kvaliteta, 0 - slaba

kvaliteta) smo izvozili. Na ta način smo pred nadaljno analizo izločili vse točke, za katere je bila verjetnost, da izračunane vrednosti signala niso sorazmerne s količino hibridizirane cDNA, povečana. To so bile točke nepravilnih oblik, premaknjene točke, madeži in delci prahu na točki ali njenem ozadju, ter točke, kjer vrednost signala ni bila dovolj različna od ozadja na obeh kanalih (poglavje 3.3.6.1).

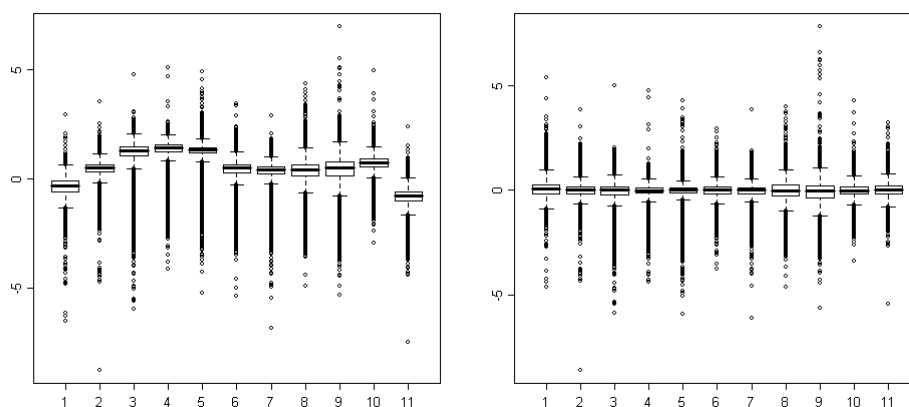
Nato smo v okolju R pregledali slike signala in ozadja obeh barvil (Cy3 in Cy5) na vseh mikromrežah (slika 10). Posamezne mikromreže so se med sabo razlikovale v jakosti signalov. Lise na slikah ozadja nekaterih mikromrež so bile verjetno posledica ostankov pufrov za spiranje, na katere so se nespecifično vezala fluorescentna barvila.



Slika 10: Slike signala barvila Cy5 (G), Cy3 (R) ter ozadja Cy5 (Rb) in Cy3 (Gb) na 4 cDNA mikromrežah. Intenzivnejša barva predstavlja močnejši signal.

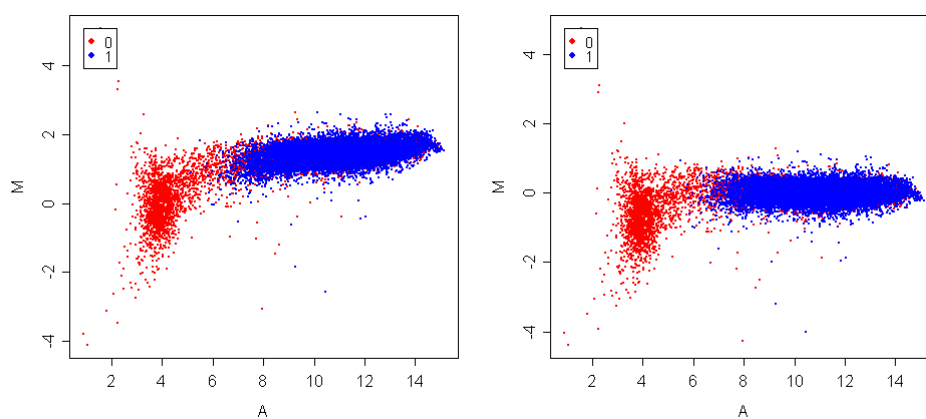
Figure 10: Images of signal intensities for Cy5 (G), Cy3 (R) and background intensities for Cy5 (Rb) and Cy3 (Gb) on 4 cDNA microarrays. Color intensity is proportional to signal intensity.

Vrednostim Rf in Gf smo odšteli ozadje ter tako dobljene podatke normalizirali. Iz dobljenih vrednosti R in G smo nato izračunali razmerje med jakostjo signala obeh barvil M in jakost signala A (opisano v poglavju 3.3.6.2). Uspešnost normalizacije (razporeditev vrednosti M okoli vrednosti 0 in neodvisnost vrednosti M od vrednosti A) je prikazana na slikah 11 in 12. Na sliki 12 so prikazane tudi točke slabe kvalitete, izločene iz analize (poglavje 3.3.6.1).



Slika 11: Grafikon kvantilov vrednosti M na 11 mikromrežah pred (levo) in po normalizaciji loess (desno).

Figure 11: Box-plot of M values on 11 microarrays before (left) and after loess normalization (right).



Slika 12: MA grafikon ene mikromreže pred (levo) in po loess normalizaciji (desno). 0 – točke slabe kvalitete, izločene pri analizi slike, 1 – točke dobre kvalitete.

Figure 12: MA plot of one microarray before (left) and after normalization (right). 0 – bad quality spots, excuded in image analysis, 1 – good quality spots.

Ker sta bili na mikromrežah, ki smo jih uporabili, po dve točki istega klona cDNA, smo po normalizaciji izračunali povprečne vrednosti A in M obeh točk. Vrednosti paralelk sta bili navadno zelo podobni, zato smo lahko v primeru, ko smo eno izmed paralelk pri kontroli kvalitete izločili iz analize, upoštevali le vrednosti A in M paralelke dobre kvalitete. Hkrati

smo shranili podatek o tem, ali je dobljena vrednost, vrednost ene ali povprečje dveh paralelk, saj je bilo to tudi merilo zanesljivosti podatka.

V okviru predpriprave podatkov smo izvedli tudi filtriranje genov: iz analiz smo izločili tiste gene, ki niso kazali različnega izražanja. Tako smo odfiltrirali 359 klonov. Od skupno 15264 klonov, kolikor jih je bilo na mikromreži, nam je tako ostalo za nadaljne analize 11153 klonov, saj smo predhodno izločili skupno 3752 klonov.

Glede na variabilnost vrednosti med biološkimi ponovitvami smo pri statističnem testiranju nastavili mejo statistične značilnosti 0,1 za t-test in oz. 0,01 za ANOVA.

4.4 PCR V REALNEM ČASU

4.4.1 Obratno prepisovanje

Preizkusili smo 4 načine sinteze cDNA (2 kompleta z različnimi reverznimi transkriptazami in 3 načini začenja) ter ugotavljali variabilnost RT reakcije. Vsebnost cDNA smo ugotavljali s pomnoževanjem cDNA za 4 gene: luc, puf, ACCOx in cat1 v reakciji PCR v realnem času.

Komplet Archive je bil za prepis opazovanih cDNA bolj uspešen kot komplet GeneAmp (preglednica 5). Zato smo za nadaljne analize uporabili komplet archive.

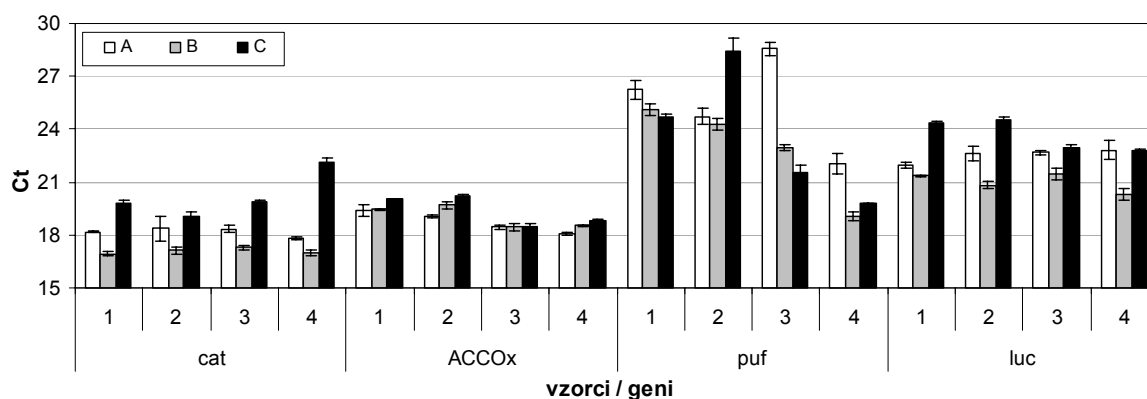
Preglednica 5: Primerjava učinkovitosti sinteze cDNA s kompletoma GeneAmp® RNA PCR Kit (GeneAmp) in High-Capacity cDNA Archive Kit (Archive)

Table 5: Comparison of reverse transcription systems. Average Ct values (\pm SD) for protein with unknown function (puf) and aminocyclopropanecarboxylate oxidase (ACCOx) genes potato cDNAs and luciferase (luc) cDNA in quantitative PCR after synthesis with GeneAmp® RNA PCR Kit (GeneAmp) or High-Capacity cDNA Archive Kit (Archive), respectively using 5 μ M random hexamers.

Gen / Komplet	Ct \pm SD	
	GeneAmp	Archive
ACCOx	NA	25,2 \pm 0,025
Puf	NA	36,4 \pm 0,454
luc	29,3 \pm 0,007	23,9 \pm 0,024

Prikazana je povprečna vrednost Ct (\pm SD) za cDNA genov za protein z neznano vlogo (puf), aminociklopropankarboksilat oksidazo (ACCOx) in luciferazo (luc) v reakciji PCR v realnem času (NA – pod mejo detekcije v PCR v realnem času).

Pri primerjavi začetnih oligonukleotidov za sintezo cDNA (naključni, oligo-dT ali kombinacija) (slika 13), se je izkazalo, da smo z uporabo oligo-d(T)₁₆ prepisali največ cDNA za cat1 in luc, medtem ko pri genu za ACCOx ni bilo vpliva začetnih oligonukleotidov na količino dobljene cDNA. Zaradi večje unioverzalnosti smo se pri analizi izražanja izbranih genov odločili za uporabo naključnih oligonukleotidov (način c).



Slika 13: Primerjava učinkovitosti sinteze cDNA z različnimi kombinacijami začetnih oligonukleotidov v 4 vzorcih listov krompirja.

Prikazane so povprečne vrednosti Ct, dobljene s PCR v realnem času, za cDNA za katalazo 1 (*cat1*), protein z neznan vlogo (*puf*), aminociklopropankarboksilat oksidazo (*ACCOx*) in luciferazo (*luc*) po sintezi z A) naključnimi začetnimi oligonukleotidi (5 μ M), B) oligo-d(T)₁₆ (5 μ M) ali C) kombinacijo naključnih (2,5 μ M) in oligo-d(T)₁₆ (2,5 μ M) začetnih oligonukleotidov.

Figure 13: Comparison of priming conditions in 4 potato representative leaf samples (No.1 - 4) as estimated by qPCR. Average Ct values (\pm SD) for catalase 1 (*cat*), aminocyclopropanecarboxylate oxidase (*ACCOx*), protein with unknown function (*puf*) of potato cDNAs and luciferase (*luc*) cDNA after synthesis with different primers: A) 5 μ M of Random Hexamers, B) 5 μ M oligo d(T)₁₆ primers and C) 2.5 μ M of Random Hexamers and 2.5 μ M oligo d(T)₁₆ primers.

Ugotavljali smo tudi variabilnost v reakciji RT, ko smo nastavili 4 vzporedne reakcije RT in uporabili totRNA, ki je bila izolirana iz enega vzorca krompirjevih listov. Učinkovitost RT smo preverili z ugotavljanjem relativne količine (normalizirano na *luc*) cDNA za gene za *cat1*, *ACCOx* in *puf* po pomnoževanju v PCR v realnem času (preglednica 6). Ugotovili smo precejšnjo razliko v učinkovitosti med reakcijami. Precejšnjo variabilnost (do 2-kratne razlike v količini cDNA) smo opazili tudi za reakcije s samo *luc* mRNA, brez krompirjeve totRNA.

Preglednica 6: Ponovljivost sinteze cDNA (RT) iz istega vzorca celokupne RNA.

Table 6: Repeatability of 4 separate reverse transcription reactions (RT) efficiencies of the same total RNA sample determined by qPCR.

Št. reakcije RT / Gen	<i>cat1</i>	<i>ACCOx</i>	<i>puf</i>
1	0	0	0
2	0,87	1,87	0,9
3	0,64	1,21	0,3
4	0,26	0,68	-0,2

Prikazan je log₂ relativne vsebnosti cDNA za gene za katalazo 1 (*cat1*), protein z neznan vlogo (*puf*), aminociklopropankarboksilat oksidazo (*ACCOx*) v 4 reakcijah (glede na reakcijo 1) izračunan kot $\Delta\Delta Ct$, dobljene po analizi s PCR v realnem času iz 4 vzporedno nastavljenih RT reakcij istega vzorca celokupne RNA.

4.4.2 Ponovljivost reakcij PCR v realnem času

Ugotavljali smo ponovljivost rezultatov relativnega izražanja genov za ACCOx in katalazo 1 v dveh ločenih reakcijah PCR v realnem času (1. reakcija in 2. reakcija) za štiri neodvisne vzorce cDNA iz listov krompirja. Razmerja v izražanju genov med posameznimi vzorci (izračunano glede na vzorec 1) so za posamezen ampikon ostala enaka, čeprav so se vrednosti $\Delta\Delta Ct$ nekoliko spremenile (preglednica 7).

Preglednica 7: Ponovljivost reakcije PCR v realnem času.

Table 7: Repeatability of 2 separate quantitative PCR runs of 4 potato representative leaf samples.

Gen Vzorec	cat1		ACCOx	
	1. reakcija	2. reakcija	1. reakcija	2. reakcija
1	0,0	0,0	0,0	0,0
2	3,2	3,9	2,4	3,1
3	2,9	3,9	1,4	2,0
4	3,5	6,4	1,6	5,3

Prikazan je \log_2 relativne vsebnosti cDNA za gene za katalazo 1 (cat1) in aminociklopropankarboksilat oksidazo (ACCOx) pri 4 reprezentativnih vzorcih listov krompirja, izračunane kot $\Delta\Delta Ct$ (glede na vzorec 1), v dveh ločenih reakcijah PCR v realnem času.

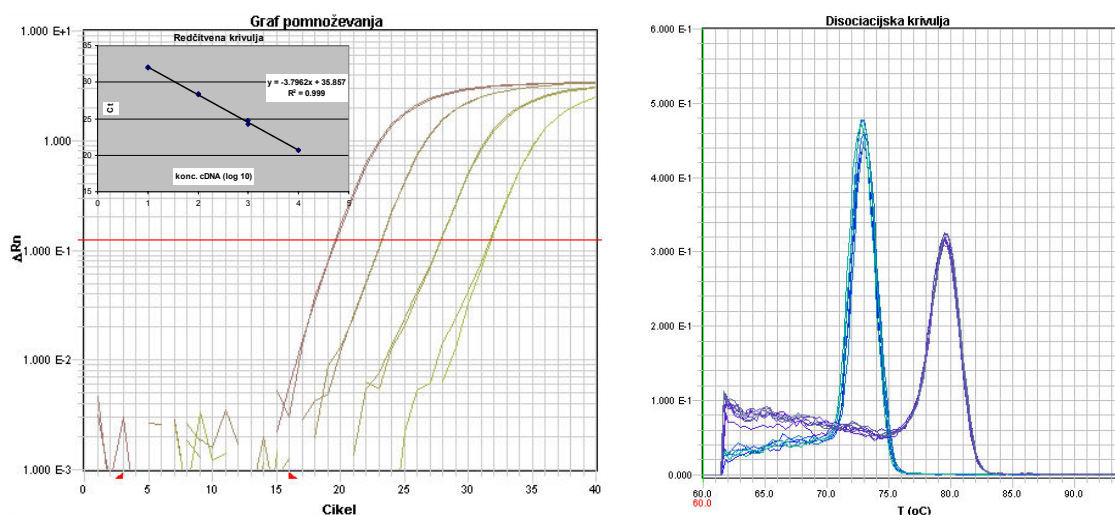
\log_2 ratios of differences were calculated as $\Delta\Delta Ct$ (regarding to sample 1) for catalase 1 (cat1) and aminocyclopropanecarboxylate oxidase (ACCOx) potato cDNAs.

4.4.3 Načrtovanje začetnih oligonukleotidov

Na osnovi preliminarnih podatkov, dobljenih z analizo mikromrež, in nukleotidnih zaporedij v bazah smo skonstruirali oligonukleotidne začetnike za pomnoževanje ampikonov genov za proteine vročinskega šoka: Hsp70_1, Hsp70_2, Hsp40 in sHsp s PCR v realnem času. Vse ampikone smo v realnem času zaznavali s pomočjo SYBR Green kemije. Nukleotidno zaporedje začetnih oligonukleotidov je prikazano v preglednici 3. Določitev in oznaka tarčnega skupnega nukleotidnega zaporedja v bazi StGI (TC) so prikazani v preglednici 8. Nove začetne oligonukleotide smo preizkusili kot je opisano v poglavju 4.4.4.

4.4.4 Določanje pomnoževanja ter optimalnih koncentracij cDNA, in začetnih oligonukleotidov

Za na novo skonstruirane amplikone smo preizkusili 4 kombinacije različnih koncentracij začetnih nukleotidov. Izbrali smo tisto koncentracijo začetnih oligonukleotidov (preglednica 8), pri kateri smo na grafu pomnoževanja (slika 14, levo) ugotovili manjšo vrednost Ct in višjo vrednost ΔRn . Hkrati smo na disociacijski krivulji (slika 14, desno) preverili, da gre res za specifično pomnoževanje in da ne prihaja do tvorbe dimerov oligonukleotidnih začetnikov (slika 14, desno). Disociacijska krivulja predstavlja spremembo fluorescenčnega signala v odvisnosti od temperature taljenja (T_m). Med počasnim dviganjem temperature (60 °C do 95 °C) pri T_m dvoverižnega produkta PCR disociira. Posledica je hiter padec fluorescenčnega signala. Če je v reakcijski mešanici prisotnih več produktov PCR, lahko na grafu disociacijske krivulje opazimo več vrhov z različnimi T_m . Ker gre pri kemiji SYBR za nespecifično detekcijo, lahko dodaten vrh na disociacijski krivulji predstavljajo tudi dimeri začetnih oligonukleotidov.



Slika 14: Graf pomnoževanja Hsp70_1 in redčitvena krivulja 4 koncentracij cDNA (levo) in disociacijska krivulja cDNA Hsp70_1 in Hsp70_2 (desno) v PCR v realnem času.

Figure 14: Amplification plot of Hsp70_1 in four cDNA concentrations and dissociation curve of Hsp70_1 and Hsp70_2 cDNA in real-time PCR.

Določili smo tudi učinkovitost pomnoževanja in optimalno redčitev cDNA za pravilno kvantifikacijo ($Ct = 20 - 30$) (preglednica 8).

Preglednica 8: Novo konstruirani začetni oligonukleotidi za PCR v realnem času

Table 8: Newly constructed primers for real-time PCR.

Tarčni gen	TC	Oznaka	konc. F, R (mM)	Redčenje cDNA / ng RNA		Učinkovitost
Hsp70_1	TC111714	Hsp70 (riž)	F: 900	100x	0,80	1,85
			R: 900	1000x	0,08	
Hsp70_2	TC119462	Hsc70 (paradižnik)	F: 300	2x	40,00	1,93
			R: 300	10x	8,00	
Hsp40	TC121103	verjetni DnaJ protein (jablana)	F: 300	100x	0,80	1,95
			R: 300	1000x	0,08	
sHsp	TC120233	Mitohondrijski sHsp (paradižnik)	F: 300	2x	40,00	2,07
			R: 900	10x	8,00	

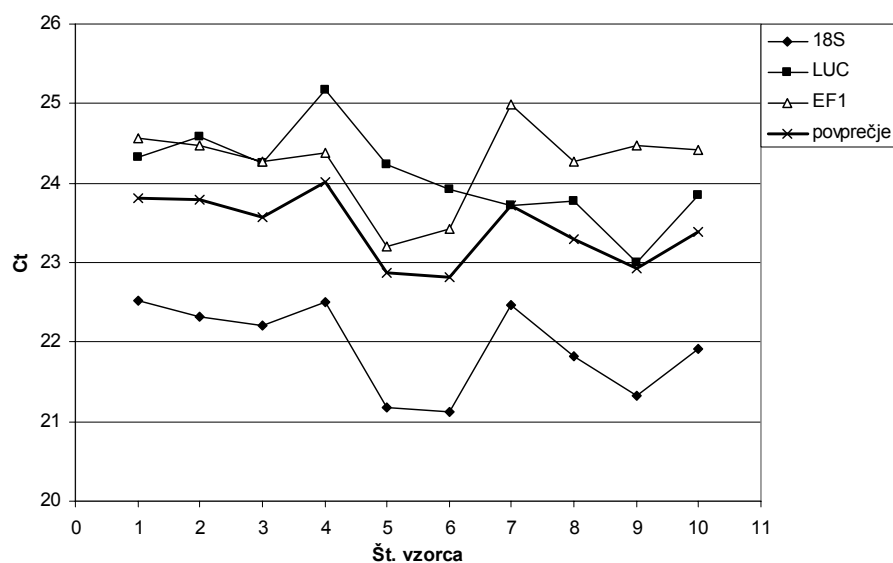
Prikazan je tarčni gen, oznaka skupnega zaporedja v bazi StGI (TC), optimalna koncentracija smiselnih (F) in protismiselnih (R) začetnih oligonukleotidov in optimalno redčenje cDNA (glede na RNA) ter učinkovitost pomnoževanja v reakciji PCR v realnem času.

Target gene, consensus sequence in StGI database (TC), optimized forward (F) and reverse (R) primer concentrations and cDNA dilution (regarding to totRNA) and efficiency in real-time PCR are shown.

4.4.5 Obdelava podatkov

Po analizi PCR v realnem času smo relativno izražanje genov (R) izračunali kot je opisano v enačbi 7 (poglavje 3.4.5). Upoštevali smo povprečne vrednosti Ct med paralelkama in učinkovitost pomnoževanja (E) vsakega amplikona (enačba 6, poglavje 3.4.5). Ker smo vsak vzorec analizirali v 4 ponovitvah (dve redčitvi, vsaka v dveh paralelkah) smo lahko za vsak vzorec izračunali E. Izkazalo se je namreč, da je bila učinkovitost različna tako med uporabljenimi amplikoni, kot tudi med analiziranimi vzorci, kar bi lahko vodilo v napačen izračun relativne količine cDNA določenega gena. Pri tistih parih vzorcev, pri katerih je bila učinkovitost manjša od 1,8 ali večja od 2,2, smo analizo ponovili.

Za normalizacijo smo uporabili geometrično vrednost treh normalizatorskih genov. Na sliki 15 vidimo, da sta krivulji za vzdrževalna gena 18S in ef-1 vzporedni, medtem, ko krivulja za luc v nekaterih točkah odstopa od drugih dveh krivulj.



Slika 15: Vrednosti Ct treh normalizatorskih genov in povprečna vrednost Ct pri 10 vzorcih listov krompirja.

Figure 15: Ct values of three normalizer genes and their average in 10 potato leaf samples.

4.5 IZRAŽANJE GENOV PO OKUŽBI S PVY^{NTN}

Izražanje genov v zgodnjem odgovoru (30 minut in 12 ur po inokulaciji) dveh sort krompirja smo izrazili kot \log_2 razmerja med izražanjem v z virusom okuženi rastlini in slepo inokulirani rastlini (M). Dobljene pozitivne vrednosti (označene z rdečo na toplotnih grafih) pomenijo večje, negativne (na toplotnih grafih označene z zeleno) pa manjše izražanje gena v vzorcu okužene rastline glede na izražanje v vzorcu slepo inokulirane rastline. V preglednici 9 je prikazan seznam parov vzorcev in metode, s katerimi smo dobili rezultat o izražanju genov.

Preglednica 9: Analiza izražanja genov z metodama mikromreže in PCR v realnem času: vzorci.

Table 9: Analysis of gene expression by microarrays and real-time PCR: samples

Par	Mikromreže	PCR v realnem času
Igor 30min 1	X	X
Igor 30min 2	X	X
Igor 30min 3	X	X
Sante 30min 1	X	X
Sante 30min 2	X	X
Sante 30min 3	X	X
Igor 12h 1	X*	X
Igor 12h 2	X	X
Igor 12h 3		X
Igor 12h 5	X	X
Sante 12h 1	X	X
Sante 12h 2	X	X
Sante 12h 3	X	X

Označena je sorta krompirja, čas po inokulaciji (30 min – 30 minut, 12h - 12 ur) in biološka ponovitev (serija poskusa; glej poglavje 3.1.5). X označuje uspešno izvedeno analizo, * - pri vzorcu 'Igor' 12h 1 sta bili izvedeni 2 hibridizaciji, z zamenjanima barviloma

4.5.1 Profil izražanja genov po okužbi v virusom PVY^{NTN}

Z uporabo cDNA-mikromrež z naneseo cDNA klonov krompirja, smo ugotavljali profil izražanja približno 9000 genov (TC, iz 11153 klonov cDNA) po okužbi.

T-test smo uporabili za iskanje genov, ki so bili statistično značilno bolj ali manj izraženi po okužbi pri sorti 'Igor' 30 minut ali 12 ur po inokulaciji ter pri sorti 'Sante' 30 minut ali 12 ur po inokulaciji. Za odkrivanje statistično značilno različno izraženih genov smo uporabili mejo statistične značilnosti $p = 0,1$ nato pa izbrali tiste klone, pri katerih je bila absolutna povprečna vrednost $M > 0,3$. To so bili tisti kloni, pri katerih je bilo izražanje v vzorcu okuženih rastlin vsaj 1,3-krat večje ali manjše kot v vzorcu slepo inokuliranih rastlin.

V preglednici 10 je prikazano skupno število statistično značilno različno izraženih genov (pri $p = 0,1$) ter število značilno različno izraženih genov, ki imajo absolutno povprečno vrednost $M > 0,3$. Največ statistično značilno različno izraženih genov smo ugotovili pri sorti 'Sante' 30 minut po inokulaciji. Pri sorti 'Igor' 30 minut po inokulaciji smo ugotovili najmanjše število statistično značilno različno izraženih genov z večjo M vrednostjo. Pri obeh sortah 12 ur po inokulaciji smo ugotovili približno enako število značilno različno izraženih genov. Pri obeh sortah je bilo večje število značilno različno izraženih genov manj izraženih.

Preglednica 10: Število značilno različno izraženih genov v okuženih rastlinah pri sortah 'Igor' in 'Sante' 30 minut in 12 ur po inokulaciji.

Table 10: Number of significantly differentially expressed genes in potato plants cv. 'Igor' and 'Sante', 30 minutes and 12 hours after inoculation.

	Skupaj		M > 0,3		skupaj
	število	%	-	+	
I 30min	801	7	31	32	63
S 30min	1129	10	187	178	365
I 12h	675	6	67	48	115
S 12h	662	6	77	46	123

Prikazano je skupno število značilno različno izraženih klonov in delež od celotnega števila klonov na mikromreži (%). Poleg tega je prikazano število klonov z absolutno povprečno vrednostjo M, večjo od 0,3, skupno, ter število klonov, ki so bolj (+) ali manj (-) izraženi v okuženih rastlinah.

V spodnjih preglednicah (11 - 18) so prikazani značilno različno izraženi geni z najvišjimi povprečnimi vrednostmi M v posameznih skupinah.

Preglednica 11: Seznam bolj izraženih genov v okuženih rastlinah krompirja sorte 'Igor' 30 minut po inokulaciji.

Table 11: List of significantly upregulated genes in infected potato plants cv. 'Igor', 30 min after inoculation.

Igor 30 min – bolj izraženi					
Ime klona	TC	M	P	protein	vloga
STMCV72	TC118942	0,84	0,07	Gen za 26S rRNA	sinteza proteinov
STMEP27	TC122162	0,47	0,06	neznani protein	neznana
STMCV28	TC118401	0,44	0,08	glutaredoksin	transport
STMGU90	TC125075 TC129866	0,44	0,04	neznani protein	neznana
STMCI72	TC130042	0,43	0,01	protein z domeno forkhead	regulacija izražanja genov
STMFA24	TC115982	0,40	0,01	neznani protein	neznana
STMEV77	TC118243	0,40	0,06	fosfataza	razvoj
STMEC44	TC114461	0,39	0,07	neznani protein	neznana
STMGN48	TC128507	0,39	0,05	na etilen odzivni faktor	rastni regulatorji

Prikazani sta oznaki klona cDNA in skupnega zaporedja (TC) v bazi StGI, povprečna vrednost M (log₂ razmerja izražanja med okuženimi in slepo inokuliranimi rastlinami), vrednost p ter verjetna oznaka in vloga proteina, ki ga nukleotidno zaporedje kodira.

Preglednica 12: Seznam manj izraženih genov v okuženih rastlinah krompirja sorte 'Igor' 30 minut po inokulaciji.

Table 12: List of significantly upregulated genes in infected potato plants cv. 'Igor', 30 min after inoculation.

Igor 30 min – manj izraženi					
Ime klona	TC	M	P	protein	vloga
STMBB55		-0,82	0,06	neznani protein	neznana
STMIY73	TC125160 TC120619	-0,61	0,09	Na TMV odziven TF WRKY	stres in obramba
STMIT15	TC117028	-0,56	0,08	neznani protein	neznana
STMIV45	TC116729	-0,54	0,04	neznani protein	neznana
STMIQ55	TC117630	-0,50	0,05	kopija poliprotein	stres in obramba
STMIN04	TC126356	-0,48	0,01	PR-protein 1b	stres in obramba
STMIT91	TC124933	-0,48	0,09	Na TMV odziven TF WRKY	stres in obramba
STMIW73	TC123480	-0,43	0,06	kisla 1,3-β-glukanaza	stres in obramba
STMEL78	TC114843 TC117902	-0,43	0,00	od ciklina odvisen inhibitor proteinskih kinaz	celični cikel
STMJF13	TC124047	-0,41	0,08	citokrom p450	sekundarni metabolizem
STMEV07	TC115457	-0,40	0,08	TF Myb	regulacija izražanja genov

Prikazani sta oznaki klona cDNA in skupnega zaporedja (TC) v bazi StGI, povprečna vrednost M (log₂ razmerja izražanja med okuženimi in slepo inokuliranimi rastlinami), vrednost p, ter verjetna oznaka in vloga proteina, ki ga nukleotidno zaporedje kodira. PR - s patogenostjo povezan, TF - transkripcijski faktor, TMV - virus mozaika tobaka

Preglednica 13: Seznam bolj izraženih genov v okuženih rastlinah krompirja sorte 'Sante' 30 minut po inokulaciji.

Table 13: List of significantly upregulated genes in infected potato plants cv. 'Sante', 30 min after inoculation.

Sante 30 min – bolj izraženi					
Ime klona	TC	M	p	protein	vloga
STMDQ29	TC130150	0,78	0,04	alkohol dehidrogenaza	stres in obramba
STMCG17	TC126453	0,73	0,09	s prolinom bogat protein	neznana
STMJB54	TC122057	0,66	0,09	ankirin-kinaza	sinteza proteinov, stres in obramba
STMFB14	TC120856	0,65	0,05	protein ABP19a, ki se veže na avksin	stres in obramba, rastni regulatorji
STMFB16	TC125880	0,64	0,04	protein z motivom Kelch	regulacija izražanja genov
STMIU83	TC125081 TC114657	0,58	0,02	Plastidna cistein-sintaza 1	sinteza AK
STMJA27	TC128041	0,58	0,02	protein ABP19a, ki se veže na avksin	stres in obramba, rastni regulatorji
STMEQ27	TC112929	0,55	0,02	50S ribosomski protein L3	sinteza proteinov
STMEA78	TC112737	0,54	0,10	fotoliza	metabolizem NK, zaznavanje svetlobe
STM CN87	TC127969	0,53	0,07	neznani protein	neznana
STMCO25	TC119241	0,48	0,01	tioredoksin peroksidaza	stres in obramba
STMJA50	TC119243	0,48	0,02	tioredoksin peroksidaza	stres in obramba

Prikazani sta oznaki klona cDNA in skupnega zaporedja (TC) v bazi StGI, povprečna vrednost M (\log_2 razmerja izražanja med okuženimi in slepo inokuliranimi rastlinami), vrednost p ter verjetna oznaka in vloga proteina, ki ga nukleotidno zaporedje kodira. AK – aminokislina, NK – nukleinska kislina.

Preglednica 14: Seznam manj izraženih genov v okuženih rastlinah krompirja sorte 'Sante' 30 minut po inokulaciji.

Table 14: List of significantly upregulated genes in infected potato plants cv. 'Igor', 30 min after inoculation.

Sante 30 min – manj izraženi					
Ime klona	TC	M	p	protein	vloga
STMED03	TC129764	-0,96	0,03	neznani protein	neznana
STMEA72	TC119839	-0,81	0,01	protein FRIGIDA	razvoj
STMDO41	TC119393	-0,77	0,04	polifenol oksidaza	metabolizem
STMCJ42	TC128255	-0,72	0,08	protein s cinkovim prstom	regulacija izražanja genov
STMEF90	TC121046	-0,68	0,02	signalna peptidaza	sinteza proteinov
STMCH21	TC116304	-0,66	0,07	neznani protein	neznana
STMCS66	TC119182	-0,66	0,08	neznani protein	neznana
STMEA08	TC126292	-0,64	0,09	protein, ki se veže na MAR	regulacija izražanja genov
STMDU24	TC126785	-0,64	0,08	UDP-glukoze dehidrogenaza	metabolizem ogljikovih hidratov, transport elektronov
STMEJ66	TC127624 TC127625	-0,63	0,04	neznani protein	neznana
STM CZ55	TC121274 TC124688	-0,61	0,07	s patogeni inducirana α -deoksigenaza	oksidacija maščobnih kislin, stres in obramba
STMCF73	TC111717 TC111885	-0,59	0,06	protein TSI-1	stres in obramba
STMEB67	TC112458	-0,58	0,09	polifenol oksidaza	stres in obramba
STMIH91	TC120213	-0,54	0,07	ACCOx	rastni regulatorji
STMHW02	TC112409	-0,45	0,03	anionska peroksidaza, povezana s suberinizacijo	razvoj
STMEQ90	TC119213	-0,38	0,05	fosfolipid-hidroperoksid-glutation peroksidaza	stres in obramba
STMDC64	TC119213	-0,35	0,02	fosfolipid-hidroperoksid-glutation peroksidaza	stres in obramba

Prikazani sta oznaki klona cDNA in skupnega zaporedja (TC) v bazi StGI, povprečna vrednost M (\log_2 razmerja izražanja med okuženimi in slepo inokuliranimi rastlinami), vrednost p ter verjetna oznaka in vloga proteina, ki ga nukleotidno zaporedje kodira. ACCOx – aminociklopropano oksidaza.

Preglednica 15: Seznam bolj izraženih genov v okuženih rastlinah krompirja sorte 'Igor' 12 ur po inokulaciji.

Table 15: List of significantly upregulated genes in infected potato plants cv. 'Igor', 30 min after inoculation.

Igor 12 h – bolj izraženi					
Ime klona	TC	M	p	protein	vloga
STMJD60	TC123784	0,51	0,07	neznani protein	neznana
STMII86	TC114774	0,49	0,03	protein T14P4,10	metabolizem proteinov
STMJE94	TC130394 TC124769	0,46	0,02	TF PCF6	regulacija izražanja genov
STMJM41	TC130047	0,45	0,05	ribosomski protein S6	sinteza proteinov
STMEF66	TC130625	0,45	0,02	protein Cf-2,1	obramba in stres
STMJJ25	TC125689	0,43	0,09	mitohondrijski transportni protein	transport
STMEO59	TC119130	0,42	0,01	nukleolin	sinteza proteinov
STMHP53	TC131551	0,42	0,00	protein z WD ponovitvami	obramba in stres
STMIL60	TC115558	0,40	0,03	neznani protein	neznana
STMHT62	TC126815	0,39	0,07	prenašalec biotin karboksilaze	metabolizem AK
STMEI68	TC120233	0,36	0,01	mitohondrijski sHsp	obramba in stres

Prikazani sta oznaki klona cDNA in skupnega zaporedja (TC) v bazi StGI, povprečna vrednost M (log₂ razmerja izražanja med okuženimi in slepo inokuliranimi rastlinami), vrednost p ter verjetna oznaka in vloga proteina, ki ga nukleotidno zaporedje kodira. sHsp – mali protein vročinskega šoka, TF – transkripcijski faktor.

Preglednica 16: Seznam manj izraženih genov v okuženih rastlinah krompirja sorte 'Igor' 12 ur po inokulaciji.

Table 16: List of significantly upregulated genes in infected potato plants cv. 'Igor', 30 min after inoculation.

Igor 12 h – manj izraženi					
Ime klona	TC	M	p	protein	vloga
STMGN42	TC120512	-0,62	0,06	neznani protein	neznana
STMEQ95	TC128082	-0,58	0,02	z brasinosteroidi reguliran protein	stres in obramba
STMEO70	TC116213 TC132533	-0,58	0,09	protein s cinkovim prstom	neznana
STMCG30	TC123038	-0,55	0,07	z mrazom inducirana glikozil transferaza	metabolizem glukoze
STMHW46	TC113974	-0,53	0,02	neznani protein	neznana
STMGA88	TC114092	-0,53	0,00	neznani protein	neznana
STMHZ63	TC120977	-0,52	0,03	neznani protein	neznana
STMCA24	TC126440	-0,51	0,03	transporter fosfatidil inozitola	transport
STMJD35	TC125025	-0,50	0,06	neznani protein	neznana
STMCM22	TC112454	-0,50	0,09	neznani protein	neznana
STMHE19	TC113215	-0,50	0,00	saharoze-sintaza 2	metabolizem sladkorjev
STMEP06	TC128082	-0,47	0,03	z brasinosteroidi reguliran protein	stres in obramba
STMDH88	TC113082	-0,44	0,08	protein, povezan s stresom povzročnim z visoko koncentracijo železa	stres in obramba
STMEH13	TC126210	-0,42	0,04	1,3-β glukozidaza	stres in obramba
STMEV23	TC126691	-0,40	0,00	na nizke temperature in slani stres odziven protein	stres in obramba
STMEB78	TC126210	-0,36	0,00	1,3-β glukozidaza	stres in obramba
STMIG88	TC126942	-0,34	0,02	cistein-proteinaza	razgradnja proteinov
STMEQ90	TC119213	-0,31	0,02	fosfolipid-hidroperoksid-glutation peroksidaza	stres in obramba

Prikazani sta oznaki klona cDNA in skupnega zaporedja (TC) v bazi StGI, povprečna vrednost M (log₂ razmerja izražanja med okuženimi in slepo inokuliranimi rastlinami), vrednost p ter verjetna oznaka in vloga proteina, ki ga nukleotidno zaporedje kodira.

Preglednica 17: Seznam bolj izraženih genov v okuženih rastlinah krompirja sorte 'Sante' 12 ur po inokulaciji.

Table 17: List of significantly upregulated genes in infected potato plants cv. 'Igor', 30 min after inoculation.

Sante 12 h – bolj izraženi					
Ime klona	TC	M	p	protein	vloga
STMER79	TC127210	0,80	0,08	protein povezan s staranjem	razvoj
STMEJ12	TC126200 TC126201	0,67	0,04	asparagin sintaza	metabolizem AK
STMER74	TC118743 TC127844	0,57	0,05	železova kelatna reduktaza	metabolizem
STMGW82	TC121678	0,55	0,01	neznani protein	neznana
STMJL29	TC123423	0,53	0,08	Protein LEUNIG	razvoj, regulacija izražanja
STMEY55	TC111717	0,53	0,05	protein TSI-1	stres in obramba
STMEC35	TC124547	0,49	0,05	neznani protein	neznana
STMCF73	TC111717 TC111885	0,49	0,03	protein TSI-1	stres in obramba
STMGB09	TC112305	0,47	0,02	citokrom p450	sekundarni metabolizem
STMGW87	TC117514 TC119045	0,44	0,02	SAM dekarboksilaza	sinteza AK
STMHF56	TC125918 TC125913	0,43	0,07	kloroplastna fosfoserin aminotferaza	metabolizem AK
STMDI40	TC112431	0,41	0,03	evkatrionski translacijski iniciacijski faktor 5 (eIF5)	sinteza proteinov
STMGT37	TC116871	0,39	0,01	protein z DnaJ domeno	metabolizem proteinov, stres in obramba
STMIN52	TC119045	0,38	0,03	SAM dekarboksilaza	sinteza AK
STMGO24	TC129576	0,34	0,04	protein TSI-1	stres in obramba
STMIN76	TC116159	0,31	0,08	evkatrionski translacijski iniciacijski faktor 2B	sinteza proteinov

Prikazani sta oznaki klona cDNA in skupnega zaporedja (TC) v bazi StGI, povprečna vrednost M (log₂ razmerja izražanja med okuženimi in slepo inokuliranimi rastlinami), vrednost p ter verjetna oznaka in vloga proteina, ki ga nukleotidno zaporedje kodira. AK- aminokislina

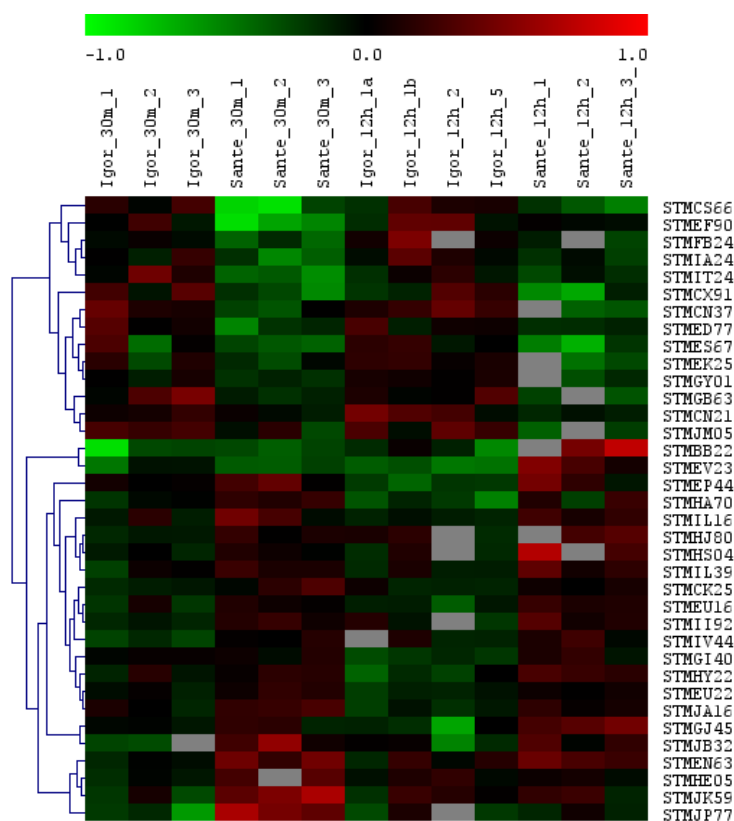
Preglednica 18: Seznam manj izraženih genov v okuženih rastlinah krompirja sorte 'Sante' 12 ur po inokulaciji.

Table 18: List of significantly upregulated genes in infected potato plants cv. 'Igor', 30 min after inoculation.

Sante 12 h – manj izraženi					
Ime klona	TC	M	p	protein	vloga
STMCO85	TC114442	-0,56	0,03	neznani protein	neznana
STMCL15	TC113719	-0,55	0,08	formamidaza	metabolizem
STMDV13	TC126082	-0,55	0,01	neznani protein	neznana
STMEG48	TC119159 TC119158	-0,53	0,10	ATPaza	transport
STMGP81	TC116956	-0,50	0,04	protein s cinkovim prstom C3HC4	razgradnja proteinov (ubikvinitacija)
STMCC85	TC130612 TC132414	-0,50	0,02	protein s cinkovim prstom C3HC4	razgradnja proteinov (ubikvinitacija)
STMEY61	TC119407	-0,49	0,02	ATPsintaza, γ -veriga, kloroplastna	fotosinteza
STMJM18	TC131864	-0,49	0,08	neznani protein	neznana
STMJC61	TC120286	-0,47	0,04	neznani protein	neznana
STMCB85	TC115342	-0,47	0,06	glukozil transferaza	metabolizem citokininov
STMES67	TC112438	-0,47	0,08	dehidrin	stres in obramba
STMCR44	TC127121	-0,46	0,04	protein, ki se veže na mRNA	regulacija izražanja genov
STMCC31	TC127120 TC127121	-0,46	0,02	protein, ki se veže na mRNA	regulacija izražanja genov
STMHU47	TC120866	-0,45	0,03	citolsolna fruktoze-1, 6- bisfosfataza	metabolizem sladkorjev
STMCN43	TC127369	-0,45	0,05	glutation peroksidaza	stres in obramba
STMHN38	TC120866	-0,42	0,03	citolsolna fruktoze-1, 6- bisfosfataza	metabolizem sladkorjev
STMJO12	TC122739	-0,40	0,00	protein s cinkovim prstom C3HC4	razgradnja proteinov (ubikvinitacija)
STMIM38	TC126964	-0,38	0,05	protein CTV,15	stres in obramba
STMET72	TC125812	-0,37	0,06	Rubisco, mala podenota	fotosinteza
STMCL01	TC112042 TC112043	-0,37	0,10	ogljikova anhidraza	stres in obramba, cikel citronske kisline
STMGL06	TC126083	-0,36	0,09	inhibitor proteinaz	razgradnja proteinov
STMCO48	TC112498	-0,36	0,03	podenota IX fotosistema I	fotosinteza
STMIV36	TC126079	-0,36	0,04	reakcijski center fotosistema II	fotosinteza
STMGB34	TC112521	-0,35	0,10	sHsp 17KDa, tip I	stres in obramba

Prikazani sta oznaki klona cDNA in skupnega zaporedja (TC) v bazi StGI, povprečna vrednost M (\log_2 razmerja izražanja med okuženimi in slepo inokuliranimi rastlinami), vrednost p, ter verjetna oznaka in vloga proteina, ki ga nukleotidno zaporedje kodira. sHsp – mali protein vročinskega šoka,

S statističnim testom ANOVA smo iskali gene, ki so se izražali specifično glede na sorto, čas ali interakcijo (slike 16-18). Za kultivar specifično izražanje smo ugotovili pri 36 genih in za čas specifično izražanje pri 77 genih. 32 genov se je izražalo specifično glede na interakcijo sorta in čas.



Slika 16: Toplotna mapa genov, ki se na okužbo z virusom odzivajo različno glede na sorto krompirja. Prikazano je ime klona v bazi StGI in log₂ razmerja med izražanjem v vzorcu okuženih in slepo inokuliranih rastlin. Pozitivne vrednosti (rdeča) pomenijo večje, negativne (zelena) pa manjše izražanje gena v vzorcu okužene rastline. Geni so združeni z metodo združevanja z Evklidsko razdaljo.

Figure 16: Heatmap of genes expressed differentially after virus infection in two potato cultivars. Clone name (in StGI database) and log ratio between expression in virus and mock inoculated samples. Positive values (red) mean upregulation and negative (green) downregulation in virus infected samples. Genes are clustered with Euclidean distance metric.

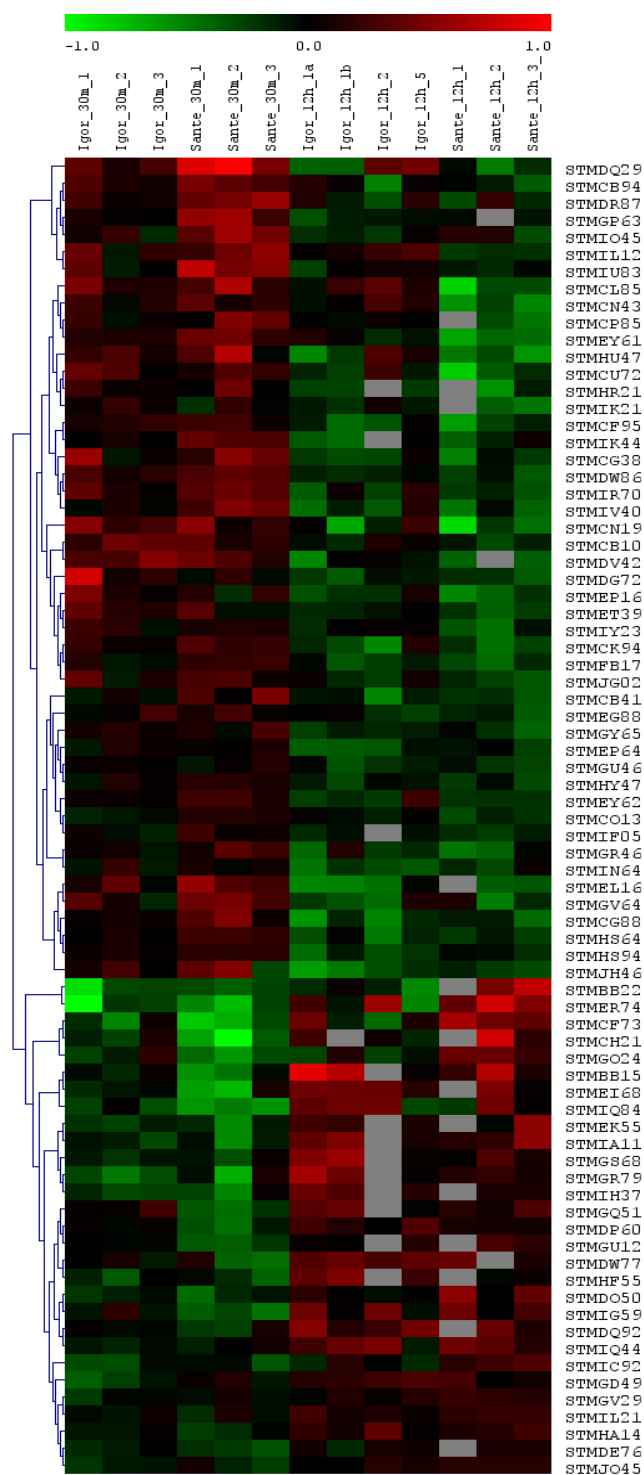
Na sliki 16 so prikazani geni, ki se odzivajo različno glede na sorto krompirja. Bolj izraženi pri sorti 'Igor' in manj izraženi pri sorti 'Sante' so bili geni za neznane proteine (STMCS66, STMG63), za protein s cinkovim prstom (STMCN21), za membranski transportni protein MATE (STMJM05) in gen za NADH dehidrogenazo (STMCN37). Pri sorti 'Sante' smo ugotovili zmanjšano izražanje gena za malo podenoto Rubisco (STMFB24), medtem ko je bilo izražanje pri sorti 'Igor' nespremenjeno.

Zanimiv vzorec izražanja smo ugotovili za gena za β-glukanazo (STMBB22) in na nizke temperature in slanost odziven protein (STMEV23), katerih izražanje je bilo povišano 12

ur po okužbi pri sorti 'Sante', medtem, ko je bilo pri tej sorti 30 minut po inokulaciji in pri sorti 'Igor' izražanje zmanjšano. Gen, za katerega smo ugotovili višje izražanje pri sorti 'Sante' je bil npr. gen za miozin (STMEN63).

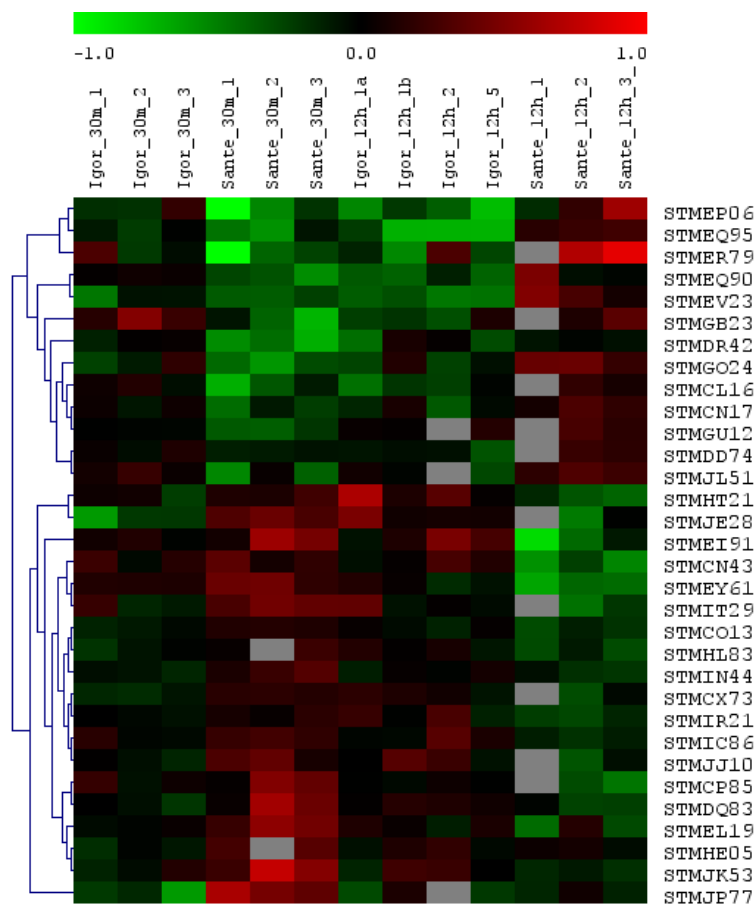
Na sliki 17 so prikazani geni, ki se odzivajo specifično glede na čas po inokulaciji. 30 minut po inokulaciji se je povečalo izražanje genov za alanil-tRNA sintazo (STMGP63), cistein sintazo (STMIU83), glukoze-1-fosfat-transferazo (STMDW86), glicaraldehid-3-fosfat dehidrogenazo (STMDV42). Povečano izražanje 30 minut po inokulaciji smo ugotovili tudi za nekatere genov, vključene v fotosintezo (sinteza klorofila, STMCG38; protein reakcijskega centra fotosistema II, STMET39; mala pordonota Rubisco, STMCK94 in STMFB17). Pri vseh omenjenih genih je bila indukcija močnejša pri sorti 'Sante'.

30 minut po inokulaciji je bilo izražanje genov za protein TSI-1 (STMCF73 in STMGO24), Hsp90 (STMBB15) in mitohondrijski sHsp (STMEI68) v okuženih rastlinah nižje kot v slepo inokuliranih rastlinah (slika 17).



Slika 17: Toplotna mapa genov, ki se na okužbo z virusom odzivajo različno glede na čas po inokulaciji. Prikazano je ime klonov v bazi StGI in log₂ razmerja med izražanjem v vzorcu okuženih in slepo inokuliranih rastlin. Pozitivne vrednosti (rdeča) pomenijo večje, negativne (zelena) pa manjše izražanje gena v vzorcu okužene rastline. Geni so združeni z metodo združevanja z Evklidsko razdaljo.

Figure 17: Heatmap of genes expressed differentially after virus infection in two time points after inoculation. Clone name (in StGI database) and log ratio between expression in virus and mock inoculated samples. Positive values (red) mean upregulation and negative (green) downregulation in virus infected samples. Genes are clustered with Euclidean distance metric.



Slika 18: Toplotna mapa genov, ki se na okužbo z virusom odzivajo različno v interakciji sorta in čas po inokulaciji.

Prikazano je ime kлона v bazi StGI in \log_2 razmerja med izražanjem v vzorcu okuženih in slepo inokuliranih rastlin. Pozitivne vrednosti (rdeča) pomenijo večje, negativne (zelena) pa manjše izražanje gena v vzorcu okužene rastline. Geni so združeni z metodo združevanja z Evklidsko razdaljo.

Figure 18: Heatmap of genes expressed differentially after virus infection in interaction of cultivar and time after inoculation. Clone name (in StGI database) and \log_2 ratio between expression in virus and mock inoculated samples. Positive values (red) mean upregulation and negative (green) downregulation in virus infected samples. Genes are clustered with Euclidean distance metric.

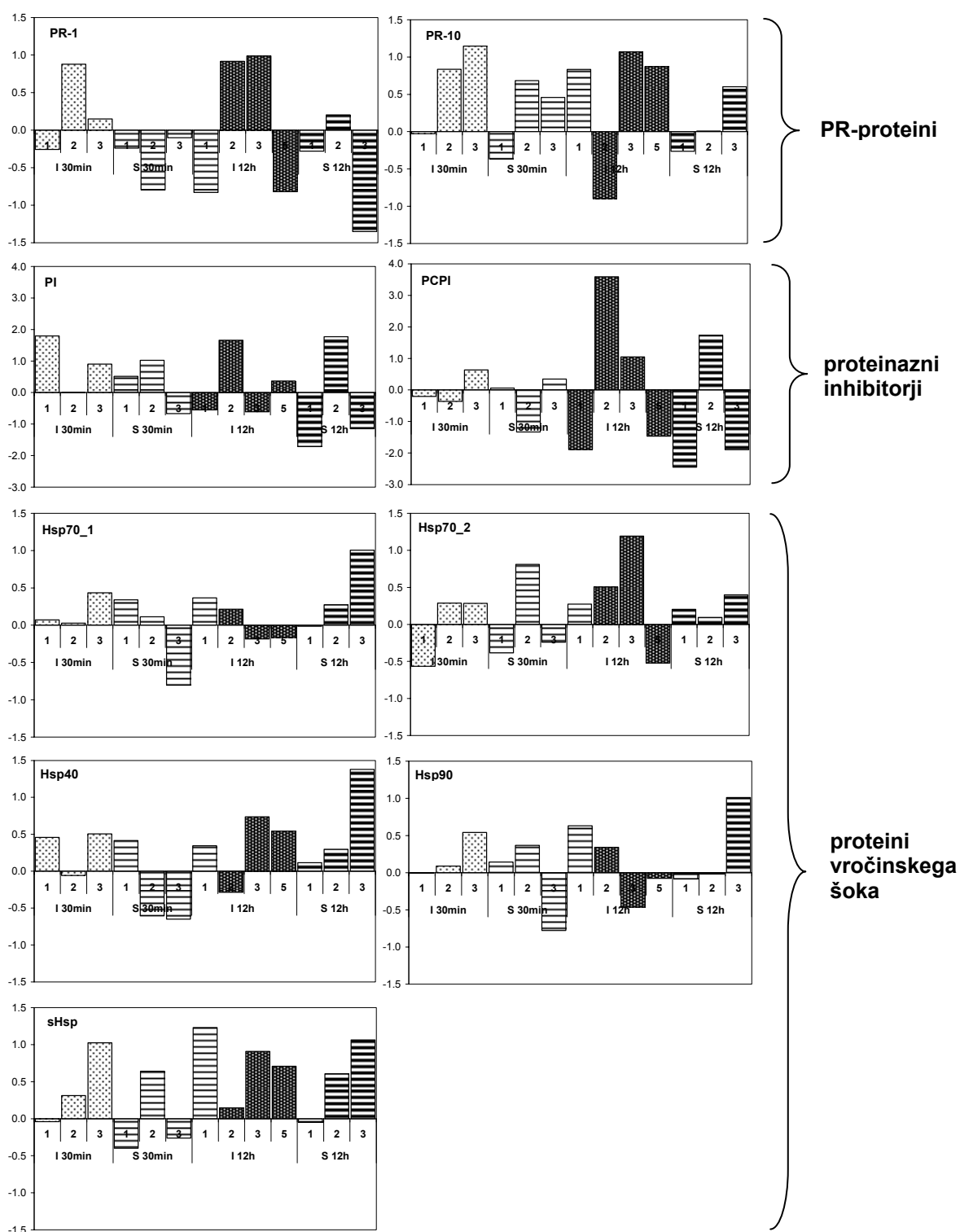
Na sliki 18 so prikazani geni, katerih izražanje je specifično v interakciji sorta in čas. Enako nižje izražanje, pri sorti 'Sante' 30 minut po inokulaciji in pri sorti 'Igor' 12 ur po inokulaciji, smo opazili pri genih za protein, reguliran z brasinosteroidi (STMEP06 in STMEQ95) in fosfolipid-hidroperoksid glutation peroksidazo (STMEV23). Enako višje izražanje, pri omenjenih pogojih, smo ugotovili za gen za Fe-superoksid dismutazo (STMEI91).

4.5.2 Izražanje izbranih genov po okužbi v virusom PVY^{NTN}

Z metodo PCR v realnem času smo opazovali izražanje 9 genov, ki smo jih izbrali na osnovi preliminarnih rezultatov, dobljenih z metodo mikromrež.

Osredotočili smo se na gene, ki bi lahko bili zanimivi v odgovoru rastline na virus. Opazovali smo izražanje 5 genov za Hsp: Hsp70_1 (homologen *Hsp70* riža), Hsp70_20 (homologen *Hsc70* paradižnika), Hsp40 (homologen *DnaJ* jablane) in Hsp90 (homologen *Hsp80* paradižnika). Spremljali smo tudi izražanje 2 genov za PR proteine: PR-1 (homologen genu za PR-1 krompirja) in PR-10 (homologen genu za PR-10a ali STH-2 krompirja). Poleg tega smo lahko spremljali izražanje gena za PI TR-8 (serinski PI iz skupine krompirjevega inhibitorja II) in družino PCPI.

Izražanje vseh genov je prikazano na sliki 19 in v prilogi B.

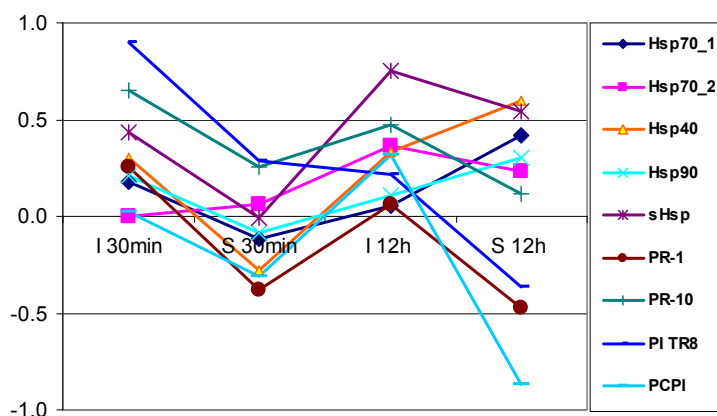


Slika 19: Izražanje 9 genov v 13 parih vzorcev krompirja po okužbi s PVY^{NTN}.

Prikazan je log₂ razmerja med izražanjem v vzorcu okužene in slepo inokulirane rastline. Pozitivne vrednosti pomenijo večje, negativne pa manjše izražanje gena v vzorcu okužene rastline.

Figure 19: Expression of 9 genes in 13 pairs of samples of potato leaves after PVY^{NTN} infection. Log₂ ratio between expression in virus and mock inoculated samples. Positive values mean upregulation and negative downregulation in virus infected samples.

Na sliki 20 je prikazana je povprečna vrednost \log_2 razmerja med izražanjem v vzorcu okužene in slepo inokulirane rastline v bioloških ponovitvah, kar pokaže na splošen trend izražanja genov: pri sorti 'Sante' je izražanje opazovanih genov večinoma manjše kot pri sorti 'Igor'. Pri slednji sorti so bili vsi opazovani geni v okuženih rastlinah bolj izraženi kot v neokuženih.



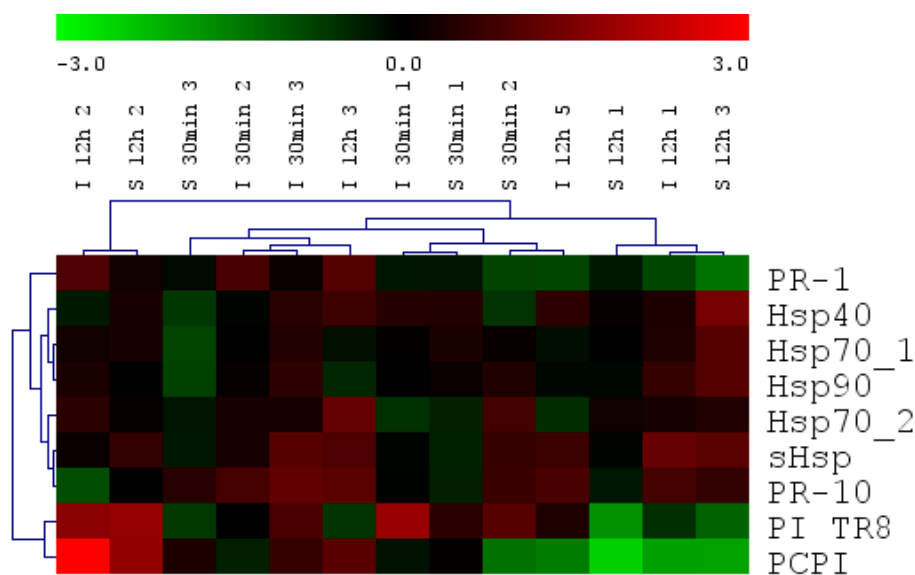
Slika 20: Izražanje 9 genov v dveh sortah in krompirja po okužbi s PVY^{NTN}.

Prikazana je povprečna vrednost \log_2 razmerja med izražanjem v vzorcu okužene in slepo inokulirane rastline med biološkimi ponovitvami. Pozitivne vrednosti pomenijo večje, negativne pa manjše izražanje gena v vzorcu okužene rastline.

Figure 20: Expression of 9 genes in 2 cultivars and 2 time points in potato leaves after PVY^{NTN} infection. Average \log_2 ratio between expression in virus and mock inoculated samples in biological replicates. Positive values mean upregulation and negative downregulation in virus infected samples.

Zaradi velikih razlik v odzivu posameznih bioloških ponovitev, razlike v izražanju med posameznimi sortami in časovnimi točkami niso bile statistično značilne. Pri genu sHsp smo z metodo ANOVA ugotovili statistično značilno ($F = 4$) večje izražanje v času 12 ur po inokulaciji. Pri istem genu smo s t-testom pokazali, da je višje izražanje pri z virusom okuženih rastlinah sorte 'Igor' 12 ur po inokulaciji statistično značilno ($p = 0,02$). Statistično značilno ($p = 0,09$) je bilo tudi višje izražanje gena PR-10 pri sorti 'Igor' 30 minut po inokulaciji.

Združevanje genov in vzorcev z metodo združevanja (hierarchical clustering, slika 21) je pokazalo, da primerjava profilov izražanja med posameznimi vzorci ni pričakovana. Po drugi strani pa smo ugotovili zelo zanimivo primerjavo profilov izražanja posameznih genov: izkazalo se je, da imajo funkcionalno podobni geni (geni za Hsp in inhibitorje proteinaz) podoben profil izražanja. Izražanje gena za PR-protein 10 je bilo zelo podobno profilu izražanja gena za sHsp, medtem ko je bilo izražanje gena za PR-1 različno od vseh omenjenih skupin.



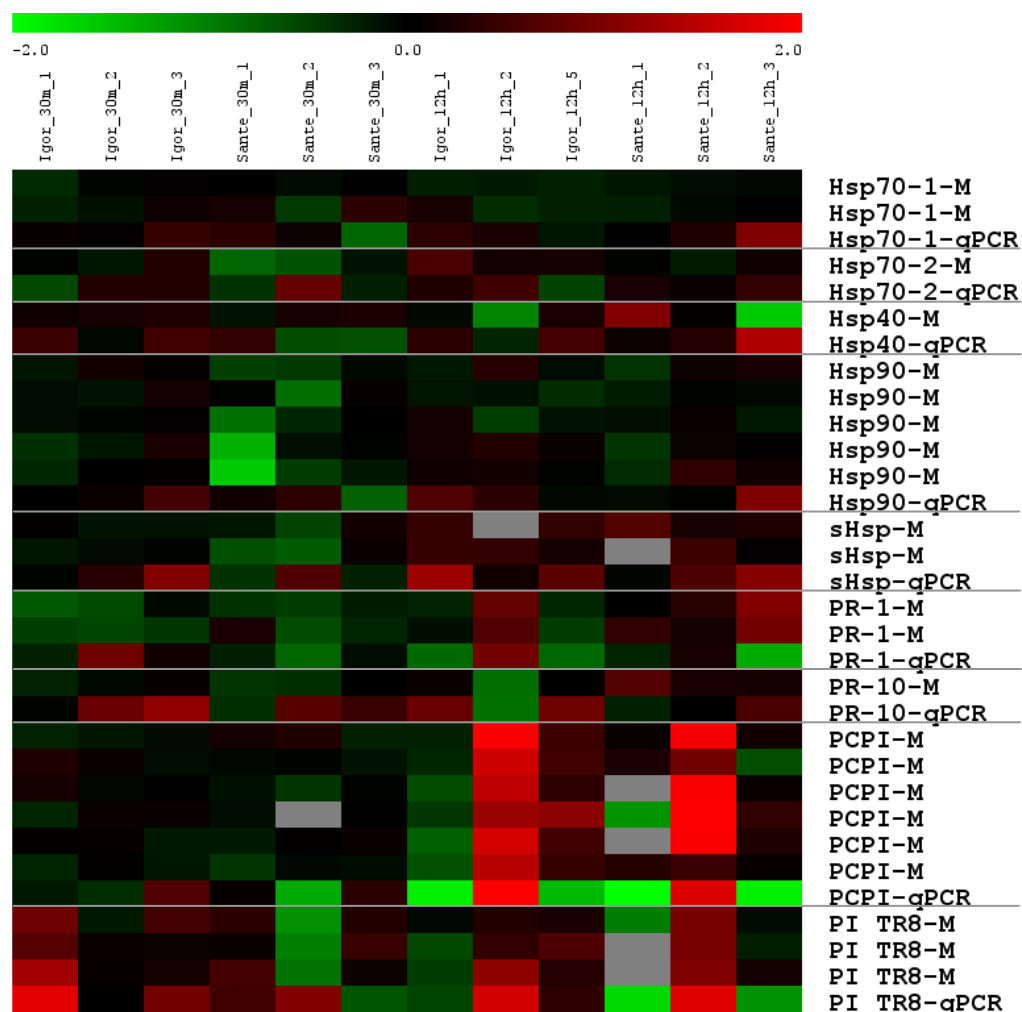
Slika 21: Združevanje genov in vzorcev po metodi združevanja z evklidsko razdaljo in maksimalno metodo pri 9 genih v 13 parih vzorcev krompirja po okužbi s PVY^{NTN}.

Figure 21: Hierarchical clustering (Euclidean distance, complete linkage method) of genes and samples in expression of 9 genes in 13 pairs of samples of potato leaves after PVY^{NTN} infection.

4.5.3 Primerjava rezultatov, pridobljenih z metodama mikromreže in PCR v realnem času

Z metodama c-DNA mikromreže in PCR v realnem času smo ugotavljali izražanje genov v 13ih parih vzorcev. Parov, pri katerih imamo rezultate obeh metod, je bilo 12 (preglednica 9). Za primerjavo podatkov, pridobljenih z obema metodama, smo na mikromrežah poiskali tiste klone, ki naj bi ustrezali tarčnemu genu, katerega smo pomnoževali z metodo PCR v realnem času. Pri genih, pri katerih smo ugotovili različno izražanje genov, smo te razlike tudi potrdili, kljub veliki variabilnosti rezultatov med serijami (slika 22).

Večinoma smo z metodo PCR v realnem času ugotovili večje razlike v izražanju genov kot z metodo mikromrež. Najboljše ujemanje rezultatov smo ugotovili pri genu za PCPI (slika 22 in 23). Z metodo PCR v realnem času smo ugotovili precej večje razlike v izražanju kot z metodo mikromrež. Čeprav v nekaterih primerih absolutne vrednosti M niso bile enake, so bila ohranjena relativna razmerja med izražanjem v posameznih parih (slika 23).

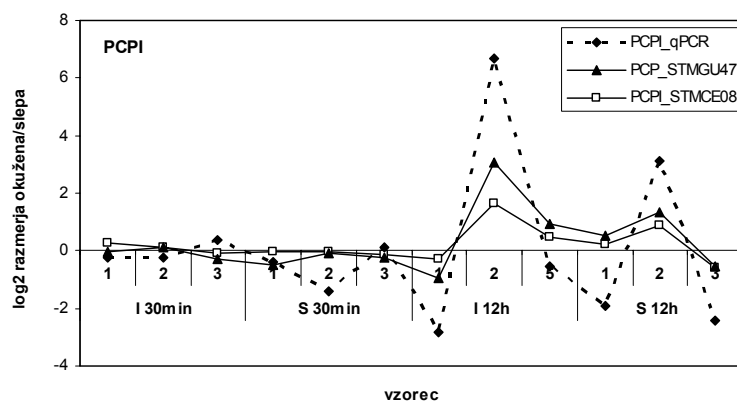


Slika 22: Ujemanje podatkov o izražanju genov, pridobljenih z mikromrežami (M) in PCR v realnem času (qPCR).

Prikazan je \log_2 razmerja med izražanjem v vzorcu okužene in slepo inokulirane rastline. Pozitivne vrednosti pomenijo večje, negativne pa manjše izražanje gena v vzorcu okužene rastline.

Figure 22: Accordance of relative expression data, obtained by microarrays (M) and real-time PCR (qPCR).

Precej dobro ujemanje rezultatov obeh metod smo ugotovili tudi pri genih za PR-1 in PI TR8 (slika 22). Prav pri teh genih smo z obema metodama ugotovili največje razlike v izražanju.



Slika 23: Ujemanje rezultatov relativnega izražanja pridobljenih z mikromrežami (klona STMGU47 in STMCE08) in PCR v realnem času (qPCR) za gen za PCPI.

Prikazan je \log_2 razmerja med izražanjem v vzorcu okužene in slepo inokulirane rastline. Pozitivne vrednosti pomenijo večje, negativne pa manjše izražanje gena v vzorcu okužene rastline.

Figure 23: Accordance of relative expression data, obtained by microarrays and real-time PCR for PCPI gene.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Priprava rastlinskega materiala

Z opravljenimi eksperimenti smo želeli ugotoviti različno izražanje genov v zgodnjem odgovoru krompirja (*Solanum tuberosum* L.) na okužbo s krompirjevim virusom Y^{NTN} pri sorti krompirja 'Igor', ki je virus občutljiva in sorti 'Sante', ki je na virus odporna. Izražanje genov smo primerjali med slepo inokuliranimi in okuženimi rastlinami, 30 minut in 12 ur po inokulaciji, v treh bioloških ponovitvah.

Večina do sedaj objavljenih raziskav interakcije krompirja z virusom PVY^{NTN} (pregled v poglavju 2.1.3.2) je bila opravljena v času pojava primarnih ali sekundarnih bolezenskih znakov, to je 3 - 14 dni po inokulaciji. Predmet teh raziskav so bile torej posledice okužbe ne pa aktivna obramba rastlin. Tudi druge raziskave interakcije virus-rastlina z mikromrežami so bile večinoma narejene v času pojava primarnih ali sekundarnih bolezenskih znakov (Golem in Curver, 2003) ali tik pred pojavom le-teh (1-5 dni po inokulaciji, Whitham in sod. 2003). Edina raziskava zgodnjega odziva rastlin na okužbo z virusom (3, 5 in 18 ur po inokulaciji) je študija Marathe in sodelavcev (2004), ki so ugotavljali spremembe v izražanju genov navadnega repnjakovca po okužbi s CMV. Zanimivo je, da so Whitham in sodelavci (2003) ugotovili zelo majhen odziv navadnega repnjakovca na okužbo s petimi različnimi virusi na nivoju izražanja genov en ali dva dni po inokulaciji, medtem ko je bil odziv precej večji 3 in 5 dni po inokulaciji.

Zaradi potreb po smotrni izrabi energije je odgovor rastline na samo okužbo časovno omejen. Scheideler in sodelavci (2002) so ugotovili povišano izražanje genov, ki so vključeni v HR rastlin navadnega repnjakovca na infiltracijo z bakterijo *Pseudomonas syringae* le 24 ur po infiltraciji. Zato je izredno pomembna izbira časovnih točk, v katerih ugotavljamo morebitne razlike v izražanju genov. Še večji problem predstavlja virusna okužba, pri kateri ne moremo niti spremljati niti vplivati na dinamiko vstopa virusa v rastline in širjenje po rastlini.

Kljub temu, da smo preverili prisotnost cDNA za CP PVY^{NTN} v vzorcih za nadaljne analize in tako ugotovili pravilnost analize, ne moremo z gotovostjo trditi, da je virus res vstopil v celice. Preliminarne raziskave so namreč pokazale, da je virusno mRNA iz inokulata možno zaznati tudi do 14 dni po inokulaciji.

V zgodnjem odgovoru rastline na virus je pomembno tudi dejstvo, da so v odgovor rastline vključene le tiste celice, kamor je virus vstopil. Glede na to, da smo v poskusu pobirali rastlinski material celotnega lista, je delež celic, ki se odzivajo na okužbo, razmeroma majhen. Za bolj natančne študije poznga odgovora na okužbo bi lahko izražanje genov pri sorti 'Igor' ugotavljali v nastalih klorozah, ali pa morda v območjih, ki bi jih kot okužena identificirali s pomočjo termokamere ali drugih metod za vizualizacijo okužbe.

5.1.2 Priprava RNA

Celokupno RNA smo izolirali iz rastlinskega materiala večih (vsaj 8) enako tretiranih rastlin in tako izničili morebitno individualno variabilnost. Glede na to, da so bile rastline razmnožene v tkivni kulturi pa večjih razlik med individuumi nismo pričakovali.

Razgradnja ostankov gDNA v vzorcih totRNA z DNazo je pomembna, tako pri pripravi RNA za mikromreže, kot tudi za PCR v realnem času. Prav zaradi velike občutljivosti slednje metode je razgradnja gDNA nujna pri pripravi RNA, saj le tako lahko preprečimo hkratno pomnoževanje gDNA in cDNA s PCR v realnem času. Če se amplikon razprostira preko dveh zaporednih eksonov, se gDNA v PCR ne pomnožuje, še vedno pa lahko prisotnost gDNA vpliva na oceno količine totRNA, kar povzroči napake pri kvantifikaciji (Bustin, 2002). V okviru doktorskega dela smo v preliminarnih poskusih preizkusili 2 sistema za razgradnjo gDNA (preglednica 4). Ugotovili smo, da koncentracije DNaze I proizvajalca Invitrogen, do 25-krat manjše od priporočenih, lahko uspešno razgradijo gDNA, ki je ostala v vzorcih po izolaciji RNA. Po drugi strani pa razgradnja na koloni s kompletom prizvajalca Qiagen niti s priporočenimi koncentracijami DNaze ni bila popolna. Do podobnih ugotovitev so prišli tudi Naderi s sodelavci (2004) pri študiju pomnoževanja RNA celic raka dojke, vendar pa avtorji niso uspeli znižati koncentracije DNaze I proizvajalca Invitrogen. Optimiranje koncentracije DNaze ima velik pomen, tako pri stroških eksperimenta, kot tudi dejstvu, da DNaza lahko v preveliki koncentraciji ali ob predolgi inkubaciji razgrajuje tudi RNA v vzorcih.

5.1.3 Mikromreže

Na eni mikromreži smo primerjali izražanje genov v okuženih in v slepo inokuliranih rastlinah. Na drugačen način bi se eksperimentalnega problema lahko lotili tudi tako, da bi na eni mikromreži primerjali izražanje v okuženih rastlinah sort 'Igor' in 'Sante'. Pri tem bi lahko prišli do nekaterih napačnih zaključkov, saj natančne genetske razlike med kultivarjema niso poznane. Klub temu pa so prav na primeru nukleotidnih zaporedij v TIGR bazi EST ugotovili, da obstaja velika homologija med nukleotidnimi zaporedji vrst družine razhudnikovk (*Solanaceae*): krompir, paradižnik, petunija (*Petunia* sp.), tobak in vrsta tobaka *N. benthamiana* (Rensink in sod., 2005). Tudi mikromreže TIGR s cDNA krompirja so uporabili za hibridizacijo z cDNA drugih vrst razhudnikovk: vrste tobaka *N. attenuata* in pasjega zelišča (*Solanum nigrum*) za študij odgovora teh vrst na herbivore (Shmidt in sod., 2005) in vrste tobaka *N. benthamiana* za študij odgovora na viruse (Senthil in sod., 2005).

Analizo podatkov smo optimizirali tako, da smo dobili statistično relevantne rezultate. Rezultati, ki smo jih podali v preglednicah poglavja 4.5.1, predstavljajo povprečje izražanja genov v treh bioloških ponovitvah. Pri vsaki biološki ponovitvi je rezultat povprečje hibridizacije cDNA osmih rastlin na dveh točkah cDNA na mikromreži.

S filtriranjem smo zmanjšali število genov za statistična testiranja in tako dosegli manjše število lažno pozitivnih genov po statističnem testiranju in bolj ponovljivo združevanje

genov (Leung in Cavalieri, 2003). Odfiltrirali smo tiste klone, pri katerih na nobeni mikromreži absolutna vrednost M ni preseгла praga $M = 0,2$. Če bi želeli izvesti bolj strogo filtriranje, bi lahko nastavili prag za absolutno vrednost M pri 0,5. Filtriranje bi lahko izvedli tudi glede na variabilnost vrednosti M med eksperimenti ali glede na vrednost A (jakost signala). Predpostavljamo, da bi zaradi velike variabilnosti med biološkimi ponovitvami in relativno majhnih vrednosti M ob uporabi bistveno strožjih pogojev, lahko izgubili veliko podatkov.

Po drugi strani bi lahko bili geni, katerih izražanje se ni spreminjalo, uporabni kot kontrole. Če bi bili njihovi transkripti prisotni v zadostnem številu, kopij, da bi bil signal na mikromrežah dovolj velik, bi jih lahko v nadaljnih poskusih uporabili za normalizacijo, ali le za kontrolo le-te. Na ta način bi lahko tudi našli potencialne normalizatorske gene za PCR v realnem času.

Velika opažena variabilnosti med biološkimi ponovitvami in majhne razlike v izražanju genov med z virusom okuženimi in slepo inokuliranimi rastlinami (vrednosti M) je znatno otežila ugotavljanje biološko in statistično pomembnih genov. Zato smo pri statističnem testiranju postavili nizko mejo statistične značilnosti. Glede na rezultate bi bila morda bolj primerna uporaba neparametričnih testov, saj bi bilo bolj smiselno ugotavljati skupen trend bioloških ponovitev (npr. večje ali manjše izražanje), kot absolutno ponovljivost razmerja izražanja. Problematike bi se lahko lotili tudi z analizo »z-score filtering«, pri kateri bi za vsako mikromrežo posebej določili gene, katerih izražanje znatno odstopa od povprečja. V naslednjem koraku bi kot statistično značilne določili tiste gene, katerih odstopanje od povprečja bi se ponovila v večjih bioloških ponovitvah (Golem in Curver, 2003). Variabilnost med biološkimi ponovitvami bi lahko obšli z združevanjem rastlinskega materiala večjih bioloških ponovitev, kot so opisali Scheideler in sodelavci (2002). Gotovo bo izboljšanje samega načrta poskusa in analize podatkov predmet nadaljnjih raziskav.

Uporaba toplotnih grafov in eksploratornih metod kot je združevanje (npr. slike 16 - 18), je pri mikromrežah nujna. V našem primeru je testna matrika vsebovala 13 stolpcev (parov vzorcev) in 11153 vrstic (klonov cDNA). Zato bi brez računalniških algoritmov težko izbrali gene, katerih izražanje je statistično in hkrati biološko značilno.

5.1.4 PCR v realnem času

Prepis RNA v cDNA je ena izmed ključnih faz za natančno kvantifikacijo količine RNA. Napake lahko nastanejo zaradi tvorbe sekundarnih ali terciarnih struktur RNA, variabilnosti v učinkovitosti začetnih oligonukleotidov in lastnosti encima reverzne transkriptaze. Količina cDNA lahko variira tudi do 100-krat glede na opazovani gen in uporabljeno reverzno transkriptazo (Ståhlberg in sod., 2004b). Velike razlike med dvema kompletoma za sintezo cDNA smo opazili tudi v naših eksperimentih (preglednica 5). Po priporočilih proizvajalcev je komplet Archive primeren za prepis RNA v cDNA pred PCR v realnem času, saj učinkovito in sorazmerno prepiše vse vrste RNA v cDNA, kar je nujno za natančno kvantifikacijo (High Capacity cDNA Archive Kit).

RT reakcijo lahko začnejo naključni, oligo-dT ali specifični oligonukleotidi. Naključni

začetni oligonukleotidi se prilegajo na različnih mestih RNA, tudi na rRNA, ki predstavlja večino totRNA. Zato je sinteza z oligo-dT lahko bolj specifična, vendar pa je možno, da se transkript ne prepíše v celoti (Lekanne Deprez in sod., 2002). Še bolj specifični so za gen-specifični začetni oligonukleotidi, vendar pa s tem izgubimo fleksibilnost reakcije PCR v realnem času (Bustin in Nolan, 2004). Izbira začetnih oligonukleotidov v veliki meri odvisna tako od gena kot od nadaljne uporabe cDNA (Bustin in sod., 2005), kar se je izkazalo tudi v našem primeru. Zato je nujno, da preizkusimo pogoje RT za gene, ki jih želimo kvantificirati (Ståhlberg in sod., 2004a).

Kljub temu, da smo v preliminarnih poskusih dobili boljše rezultate z oligo-dT začetnimi oligonukleotidi (slika 13), smo se v raziskavi študija izražanja 9 genov v zgodnjem odgovoru dveh sort krompirja na PVY^{NTN} odločili za uporabo naključnih začetnih oligonukleotidov. K odločitvi je botrovala večja univerzalnost teh primerjev ter dejstvo, da proizvajalec kompleta Archive priporoča uporabo naključnih oligonukleotidov. Hkrati smo želeli za normalizacijo uporabiti 18S rRNA, kar z uporabo oligo-dT ne bi bilo možno.

Opazili smo tudi precejšnjo variabilnost tako RT, kot tudi v PCR v realnem času (preglednici 6 in 7). Za zmanjšanje negativnega vpliva variabilnosti na pravilnost kvantifikacije se je le-teh težav potrebno zavedati in čim bolj poenotiti postopke. To smo poizkusili upoštevati pri načrtovanju poskusa analize izražanja 9 izbranih genov s PCR v realnem času. K zmanjšanju variabilnosti RT bi lahko pripomogla uporaba inhibitorja RNaz, ki smo jo uvedli v postopku RT. Pri PCR v realnem času smo s pipetiranjem z robotom lahko dosegli večjo natančnost. V okviru poskusa smo uporabili reagente iz iste šarže ter iste redčine začetnih oligonukleotidov. Prav tako smo na isti ploščici s preučevanimi geni analizirali več normalizatorskih genov ter pri analizi podatkov upoštevali učinkovitost posameznih reakcij. Prav taka standardizacija bi lahko pripomogla k večji konsistentnosti rezultatov (Bustin, 2000).

Zaradi opaženih razlik v učinkovitosti pomnoževanja v PCR v realnem času med vzorci in ampliconi smo metodo, ki jo je za analizo podatkov predlagal Pfaffl (2002) modificirali tako, da smo upoštevali učinkovitost preučevanega vzorca, kar je lahko znatno vplivalo na izračun.

Zaradi napak pri ocenjevanju količine RNA ter možne nesorazmernosti količine rRNA in mRNA, je nujno potrebna normalizacija na vzdrževalne gene. Ker pa ne moremo biti prepričani, da je določen vzdrževalni gen res izražen konstantno v vseh pogojih poskusa, je potrebna uporaba večih normalizatorskih genov (Vandesompele in sod., 2002). Z izračunom povprečne vrednosti Ct treh normalizatorskih genov za vsak vzorec (slika 15) smo dobili »univerzalni« gen za normalizacijo. S takim načinom normalizacije smo upoštevali parametre kot so različne količine mRNA, rRNA, kot tudi učinkovitosti RT in PCR v realnem času. Uporabljeni vzdrževalni geni so bili kot primerni normalizatorji za analizo podatkov določeni s programom GeNorm (Vandesompele in sod., 2002; podatki niso prikazani).

5.1.5 Izražanje genov po okužbi z virusom PVY^{NTN}

Z uporabo mikromrež z naneseo cDNA klonov krompirja, smo ugotavljali profil izražanja genov po okužbi z virusom PVY^{NTN}. Že hiter pregled toplotnih grafov je razkril, da so bile vrednosti M na analiziranih mikromrežah relativno nizke, variabilnost med biološkimi ponovitvami pa velika. Pri klonih, pri katerih smo ugotovili velike razlike v izražanju genov, te niso bile statistično značilne, saj razlike med serijami niso bile ponovljive. Največ statistično značilno izraženih genov smo ugotovili pri sorti 'Sante' 30 minut po inokulaciji (preglednica 10). Iz tega bi lahko sklepali, da gre pri tej sorti za močnejši odziv na okužbo. Močen odziv na okužbo smo ugotovili tudi v posameznih serijah 12 ur po okužbi pri obeh sortah. Opažene spremembe niso bile ponovljive, zato je v tej časovni točki manjše število značilno različno izraženih genov. Večje število manj izraženih genov v tej časovni točki bi lahko kazalo na splošno utišanje gostiteljevih genov, katerega lahko povzroči okužba z virusom (Aranda in Maule, 1998).

Pri okužbi rastlin z virusi z mehansko inokulacijo ne moremo natančno spremljati oz. kontrolirati procesov vstopa virusov v celice, premikanja po rastlini in razmnoževanja. Zato je lahko v naših poskusih, ko je šlo za zelo kratek čas po inokulaciji, šlo za različno dinamiko (pod vplivom fiziološkega stanja rastlin, letnega časa, koncentracije virusa v inokulatu ipd.) okuževanja in različne rezultate posameznih bioloških ponovitev.

Dejstvo, da različni virusi uporabljajo različne rastlinske proteine za svoje razmnoževanje in transport, prav tako pa so v PTGS za različne viruse vključeni različni proteini, znatno otežuje primerjavo izsledkov raziskav virusne okužbe med različnimi rastlinami in različnimi virusi (Nelson in Citovsky, 2005). Medtem ko so ugotovili, da se pri navadnem repnjakovcu po okužbi z bakterijami ali glivami spremeni izražanje kar četrteine genov v genomu (Maleck in sod., 2000), pri okužbi z virusi spremembe niso tako dramatične. Golem in Curver (2000) sta po okužbi navadnega repnjakovca s TMV ugotovila ponovljivo izražanje le 68 genov, ki pa niso bili specifični za odziv na okužbo z virusi.

Pri sorti 'Igor' 30 minut po inokulaciji (preglednica 11) smo ugotovili majhno povišanje izražanja genov, kar bi lahko odražalo dejstvo, da se ta sorta krompirja v tako kratkem času še ne odzove na prisotnost virusa. Ugotovili smo približno dva-kratno povišanje izražanja gena za ribosomsko RNA, kar bi lahko kazalo na večje potrebe mehanizma prepisovanja RNA. Višje izražanje gena za glutaredoksin bi lahko kazalo celo na aktiven odziv rastline z ROS. Struktura proteina z domeno forkhead nakazuje na morebitno vlogo v regulaciji transkripcije.

Veliko število manj izraženih genov pri sorti 'Igor' 30 minut po inokulaciji (preglednica 12) ima vlogo v obrambi, kar bi lahko kazalo na to, da okužba z virusom zavre aktivni odziv rastline ali na nezmožnost sorte 'Igor' v aktivaciji obrambnega odziva. Zmanjšalo se je izražanje dveh genov za transkripcijska faktorja: na virus odzivni TF WRKY in TF Myb, za katera je bilo ugotovljeno, da imata pomembno vlogo v regulaciji obrambnih genov (Eulgem in sod., 2005). Prav tako se je zmanjšalo izražanje dveh PR-proteinov, PR-1b in 1,3-β-glukanaze in kopija poliproteina, ki je LTR retrotranspozon. Pri rastlinah je aktivacija retrotranspozonov pod vplivom stresa pogosta (Grandbastien, 1998). Primarna vloga 1,3-β-glukanaze je aktivna obramba proti glivam, virusi pa jo lahko izkoristijo za olajšano širjenje po rastlini, saj lahko poveča odprtine plazmodezm (Beffa in Meins, 1996).

Zmanjšano izražanje tega encima smo ugotovili tudi 12 ur po inokulaciji sorte 'Igor' z virusom, kar morda kaže na aktiven odgovor te sorte na okužbo.

Pri sorti 'Sante' smo 30 minut po inokulaciji (preglednica 13) ugotovili povečanje izražanja večih proteinov, vključenih v obrambni odgovor (ankirin-kinaza, protein ABP19a in tioredoksin peroksidaze). Ankirin-proteinske kinaze so najprej odkrili v nodulih lucerne, kasneje pa so ugotovili, da se je njihovo izražanje pri tej rastlini povečalo tudi ob osmotskem stresu (Chinchilla in sod., 2003). Proteinske kinaze imajo pomembno vlogo v odgovoru na napad patogenov. Sodelujejo namreč v signalizacijskih kaskadah, ki vodijo v sintezo TF (Eulgem in sod., 2005). Tioredoskin peroksidaze so del aktivne zaščite rastline pred prostimi radikali, ki nastajajo pri obrambnih procesih (Herbette in sod., 2002). Povečalo se je tudi izražanje nekaterih proteinov, ki so vključeni v sintezo proteinov (plastidna cistein-sintaza in ribosomski protein L3).

Zmanjšano izražanje proteina, ki se veže na MAR (organizacija kromatina), in signalne peptidaze pri sorti 'Sante' 30 minut po okužbi (preglednica 14) kaže na zmanjšano sintezo proteinov. S patogeni inducirana α -deoksigenaza je vključena v α -oksidacijo maščobnih kislin in je verjetno del verige nastanka signalnih molekul (Hamberg in sod., 1999). Glutation peroksidaze so del aktivne zaščite rastline pred prostimi radikali, ki nastajajo pri obrambnih procesih (Herbette in sod., 2002). Verjetno se njihovo izražanje zniža na račun povišanja aktivnosti drugih peroksidaz. Ugotovili smo tudi zmanjšanje izražanja gena za ACCOx, je ključni encim v biosintezi rastnega regulatorja etilena. Pri okužbi rastlin vrste tobaka *N. glutinosa* s TMV se je povečalo izražanje ene skupine genov za ACCOx, medtem ko se izražanje za drugo skupino genov ni spremenilo (Kim in sod., 1998). Regulacija vsebnosti encima ACCOx je posttranskripcijska, zato izražanje gena za ACCOx ni direktno povezano z aktivnostjo encima ali nivojem etilena v celici (Knoester in sod., 1997). Zmanjšanje izražanja tega gena so ugotovili tudi Pompe Novak in sodelavci (2006) pri sorti krompirja 'Igor' 5 dni po inokulaciji z virusom PVY^{NTN}.

Pri sorti 'Igor' 12 ur po inokulaciji (preglednica 15) smo ugotovili povečanje izražanja več genov, ki so vključeni v regulacijo izražanja genov (protein T14p4,10, transkripcijski faktor PCF6, ribosomski protein S6, nukleolin), kar kaže na povišano sintezo proteinov, morda povezano z razmnoževanjem virusa. Prav tako smo ugotovili povišanje izražanja nekaterih genov, povezanih z obrambo (protein Cf-2,1, protein z WD ponovitvami, mitohondrijski sHsp), kar kaže, da pri tej sorti pride do obrambnega odziva, vendar kot kaže le-ta ni upešen. Povišanje izražanja gena za sHsp smo ugotovili tudi z metodo PCR v realnem času (slika 19). Protein Cf-2 je transmembranski R protein paradižnika, odgovoren za odpornost proti glivi *Cladosporium flavum*, njegova vloga pa še ni natančno pojasnjena (Dixon in sod., 2000).

Pri sorti krompirja 'Igor' smo 12 ur po inokulaciji (preglednica 16) ugotovili zmanjšanje izražanja številnih genov za proteine, povezane z obrambo in stresom, kar je morda razlog, ki privede do pojava bolezenskih znakov. Zmanjšano je bilo tudi izražanje gena za encim saharoze-sintazo. Količina topnih sladkorjev je lahko signal za pospešitev obrambnega mehanizma rastline in za izražanje s patogenezo povezanih genov (Herbers in sod., 2000).

Pri sorti 'Sante' so bili 12 ur po inokulaciji bolj izraženi številni geni, povezani s sintezo proteinov (translacijska iniciacijska faktorja eIF5 in 2B, protein z DnaJ domeno) (preglednica 17). Znano je, da virusi izkoristijo nekatere iniciacijske translacijske faktorje

za svoje razmnoževanje (Leonard in sod., 2000), vendar ni jasno, ali pri sorti 'Sante' sploh pride do razmnoževanja virusa PVY^{NTN}. Ugotovili smo tudi povišanje izražanja gena za TSI-1. Protein TSI-1 (tomato stress induced1) je homologen proteinu PR-10a (STH-2) iz krompirja. Proteini iz družine PR-10 lahko delujejo kot ribonukleaze s protivirusno aktivnostjo (Park s sod., 2004). Povišanje izražanja gena za TSI-1 so ugotovili tudi pri paradizniku pod vplivom SA in okužbe z glivo *Fusarium oxysporum*, medtem ko se izražanje pri ranitvi ni spremenilo (Sree-Vidya in sod., 1999). Povišano je bilo tudi izražanje gena za citokrom p450, encima, ki je vključen v proces sinteze sekundarnih metabolitov in rastlinskih rastnih regulatorjev, kar bi lahko kazalo na aktivacijo obrambnega odgovora rastline.

Pri sorti 'Sante' smo 12 ur po inokulaciji (preglednica 18) ugotovili manjše izražanje večih genov, povezanih z razgradnjo proteinov (proteini s cinkovim prstom, inhibitor proteinaz). Ugotovili smo tudi zmanjšano izražanje gena za ogljik-anhidrazo, ki je vključena v obrambni odgovor rastline. Lahko se veže na SA, vključena pa je tudi v fotosintezo, metabolizem maščobnih kislin ter deluje kot antioksidant (Restrepo in sod., 2005). Pri odzivu rastlin krompirja z glivo *Phytophthora infestans* so ugotovili, da se je gen za ogljik-anhidrazo 12 ur po okužbi različno odzival v kompatibilni in nekompatibilni interakciji (Restrepo in sod., 2005), kasneje pa je bilo v obeh interakcijah izražanje zmanjšano.

Ugotovili smo tudi manjše zmanjšanje izražanja genov za nekatere proteine, vključene v fotosintezo (mala podenota Rubisco, podenota fotosistema I in reakcijski center fotosistema II). Do podobnih ugotovitev je pri svojih raziskavah prišla tudi Pompe Novak (2002) pri sorti 'Sante' 5 dni po okužbi z virusom PVY^{NTN}. Virusna okužba lahko povzroči znižan nivo fotosinteze, manjša vsebnost klorofila pa je navadno povezana z nastankom primarnih bolezenskih znamenj (Milavec in sod., 2001). Zanimivo je, da je bilo veliko genov, povezanih s fotosintezo bolj izraženih 30 minut po inokulaciji in manj izraženih 12 ur po inokulaciji obeh sort krompirja (komentar pri sliki 17).

Z metodo statistične analize ANOVA smo iskali gene, katerih izražanje je bilo specifično glede na kultivar, čas po inokulaciji ali v interakciji sorta - čas. Večje število značilno različno izraženih genov glede na čas kot glede na kultivar morda kaže na to, da je odziv obeh kultivarjev bolj podoben, kot je razlika med izražanjem 30 minut in 12 ur po okužbi. Geni, za katere smo ugotovili, da se izražajo specifično v interakciji (npr. gen za železovo superoksid dismutazo) nam lahko kažejo na zakasnen odziv sorte 'Igor', ki je lahko ključen za različno občutljivost preučevanih sort krompirja. Superoksid dismutaza sodeluje v obrambi pred oksidativnim stresom (Hammond-Kosack in Jones, 1996, slika 1). V 5 dneh po okužbi rastlin krompirja sort 'Sante' in 'Igor' s PVY^{NTN} se izražanje gena za Cu/Zn superoksid dismutazo ni spremenilo (Pompe Novak, 2005; osebni vir).

Zmanjšano izražanje gena za z brasinosteroidi reguliran protein pri sorti 'Sante' 30 minut po inokulaciji in pri sorti 'Igor' 12 ur po inokulaciji (preglednica 16, slika 18) bi lahko bilo povezano z delovanjem brasinosteroidov, rastlinskih rastnih regulatorjev, katerih delovanje je lahko povezano z razvojem in odgovorom na stres (Krishna, 2003). Brasinosteroid brasinolid je sprožil odpornost tobaka proti TMV, bakteriji *P. syringae* in glivi *Oididum* sp, odpornost pa ni bila povezana z mehanizmom SAR (Nakashita in sod., 2003).

Z metodo PCR v realnem času smo ugotavljali izražanje 9 izbranih genov: 5 proteinov vročinskega šoka, 2 s patogenezo povezanih proteinov in dveh proteinaznih inhibitorjev.

Zaradi velikih razlik v odzivu posameznih bioloških ponovitev razlike v izražanju med posameznimi sortami in časovnimi točkami (slika 19, 20), z izjemo gena za sHsp in PR-10, niso bile statistično značilne. Možna razlaga bi lahko bila časovni zamik med dogajanjem v posameznih bioloških ponovitvah. Zato zelo težko sklepamo na možno funkcijo posameznih genov v odgovoru rastlin krompirja na PVY^{NTN}. Kljub slabi ponovljivosti izražanja med biološkimi ponovitvami pa smo ugotovili zelo podobne profile izražanja med skupinami genov za Hsp in PI (slika 21), kar kaže na pravilnost uporabljenih metod oziroma dejansko različen odziv v posameznih bioloških ponovitvah.

Ugotovili smo razmeroma majhne spremembe v izražanju genov za Hsp (slika 19). Izražanje Hsp₇₀ se prehodno poveča v celicah, kjer se virus razmnožuje (Aranda in sod., 1996), proces indukcije pa je različen od tistega pri vročinskem šoku. Povečano izražanje so avtorji pripisali večji količini proteinov v citosolu, ki je posledica razmnoževanja virusa (Aparicio in sod., 2005) in premikanju virusa po rastlini (Aoki in sod., 2002). Zanimiv je različen profil izražanja dveh amplikonov za Hsp70 (slika 21), saj je bilo izražanje gena za Hsp70₁ (homologen Hsp70 iz riža), precej različno od izražanja za Hsp70₂ (homologen Hsp70 iz paradižnika). Ugotovili pa smo tudi, da je bilo v vzorcih cDNA za Hsp70₁ precej več kot cDNA za Hsp₂ (preglednica 8, redčenje cDNA), kar kaže na to da gre res za 2 različna transkripta. Vzorcju izražanja gena za Hsp70₁ je bilo podobno izražanje gena za Hsp40, kar bi lahko potrjevalo dejstvo, da je Hsp40 košaperon Hsp70₁. Dokazano je bilo, da Hsp70 in Hsp40 sodelujeta pri premikanju virusa po rastlini (Aoki in sod., 2002). V vseh treh bioloških ponovitvah smo ugotovili povečano izražanje gena za Hsp40 pri sorti 'Sante' 12 ur po inokulaciji.

Majhen odziv izražanja genov za Hsp70 in Hsp40 po virusni okužbi lahko pripešemo zgodnjemu času po okužbi, ko verjetno še ni prišlo razmnoževanja in razširjanja virusa, ali pa je bil relativni delež celic, v katerih je prišlo do teh procesov, še zelo majhen.

Izražanje gena za Hsp90 (homolognega Hsp80 paradižnika, Koning in sod., 1992) je bilo zelo podobno izražanju gena za Hsp70₁. Ugotovili so, da ima Hsp90 velik pomen pri odpornosti na viruse, saj se lahko veže na R proteine (Liu in sod., 2004; Lu in sod., 2003). Indukcija tega gena je bila največja pri 'Sante' 12h 3, kar bi lahko kazalo na odziv, ki ga povzročijo proteini R.

V analizi PCR v realnem času smo ugotovili povečano izražanje gena za sHsp (homologen sHsp iz mitohondrija paradižnika) v skoraj vseh točkah (slika 19). Izražanje je bilo značilno večje 12 ur po okužbi, kar smo ugotovili tudi pri analizi z mikromrežami (slika 17). Izražanje tega gena je bilo podobno izražanju gena za PR-10 in Hsp70₂. Izražanje gena za mitohondrijski sHsp se je povečalo ob toplotnem stresu, njegova vloga pa naj bi bila zaščita encimov, ki so vključeni v elektronski transport (Liu in Shono, 1999). Genko spremenjene rastline paradižnika s povečanim izražanjem tega gena so bile termotolerantne (Nautiyal in sod., 2005). Marathe in sodelavci (2004) so opisali zmanjšano izražanje 3 različnih genov za sHsp v zgodnjem odgovoru odpornega ekotipa na CMV, Whitham in sodelavci (2003) pa povečano izražanje gena za sHsp 17,6A po okužbi navadnega repnjakovca s petimi različnimi virusi. Prav zaradi velike variabilnosti sHsp pri rastlinah (Wang in sod., 2004) težko primerjamo rezultate omenjenih študij z našimi rezultati.

Pri analizi izražanja gena za protein PR-1, homolognega z genom za PR-1 iz krompirja (van't Klooster in sod., 1999) s PCR v realnem času je bilo med biološkimi ponovitvami enako le nekoliko zmanjšano izražanje pri sorti 'Sante' 30 minut po inokulaciji (slika 19),

medtem ko je bilo v ostalih točkah izražanje med posameznimi biološkimi ponovitvami različno.

Proteini PR-1 veljajo kot markerji za SAR. Čeprav so ugotovili, da lahko delujejo protiglavno, njihova natančna vloga v interakciji s povzročitelji bolezni ni natančno poznana (van Loon in van Stiren, 1999). Morebitnega mehanizma SAR pri naših poskusih nismo mogli spremljati, saj smo ugotavljali le izražanje v inokuliranih listih.

Izražanje tega gena so van't Klooster in sodelavci (1999) spremljali v času od enega do 6 dni po okužbi krompirja z virulentnim in avirulentnim sevom glive *P. infestans* ter po mehanski ranitvi. Izražanje gena so opazili 1 dan po okužbi, njegovo izražanje pa se je zmanjšalo pri kompatibilni reakciji 4 dni po okužbi. Mehanizem delovanja kaže na to, da gen ni specifičen za SAR. Izražanje gena za PR-1b pri krompirju se je znatno povečalo šele 24 ur po okužbi z glivo *P. infestans* ali bakterijo *P. syringae* (Hoegen in sod., 2002). Pri tobaku (*N. tabacum*), okuženem z virusom PVY, je bila vsebnost proteina PR-1a večja pri rastlinah ki so kazale bolj izrazite bolezenske znake (Naderi in Berger, 1997).

Znano je, da je pri krompirju zaradi visoke konstitutivne vsebnosti SA, povečano tudi konstitutivno izražanje PR-1 (Navarre in Mayo, 2004), vendar pa tudi tretiranje s SA lahko sproži izražanje PR-1. Krečič Stres in sodelavci (2005) so ugotovili, da bazalni nivo SA pri različnih sortah krompirja ni povezan z njihovo občutljivostjo na PVY^{NTN}. V inokuliranih listih sorte Igor se je 24 ur po inokulaciji nivo proste SA povečal, zato bi pričakovali da se bo izražanje gena za PR-1 povečalo vsaj pri tej sorti. Vendar pa glede na zgoraj opisane izsledke van't Klooster in sodelavcev (1999) lahko sklepamo, da protein PR-1, katerega izražanje smo spremljali ni odvisen samo od SA, ampak tudi od drugih stresnih dejavnikov.

Pri PR-proteinih iz skupine PR-1 pri paradižniku so kljub veliki homologiji ugotovili različno lokalizacijo in delovanje: izražanje proteina PR1b1 je inducirano z okužbo s TMV, medtem ko je protein PR1a2 izražen konstitutivno, njegovo izražanje pa se spreminja skladno z razvojem (Tornero in sod., 1997). Zato so Laird in sodelavci (2004) predlagali, da naj bi kot PR-1 poimenovali le tiste proteine, ki so dejansko markerji za SAR, torej se njihovo izražanje ne odziva le na samo okužbo, temveč tudi na tretiranje s SA.

Z metodo PCR v realnem času smo spremljali tudi izražanje gena za PR-10, homolognega genu *STH-2* krompirja (Matton in Brisson, 1989), ki kodira PR-10a. Izražanje je bilo znatno povečano v dveh in nespremenjeno pri eni biološki ponovitvi pri sorti 'Igor' 30 minut po inokulaciji, medtem ko so bile v ostalih točkah biološke ponovitve med sabo bistveno bolj različne (slika 19). Najšibkejši odziv smo ugotovili pri sorti 'Sante' 12 ur po inokulaciji (slika 19).

Proteini iz skupine PR-10 so citosolni proteini; čeprav je nukleotidno zaporedje za te gene podobno genom za PR-1, nimajo zaporedja za signalno peptidazo. Dokazana je njihova vključenost v obrambni odgovor rastline, saj se je njihovo izražanje povečalo po tretiranju s SA, mehanski ranitvi in okužbi z glivo *Venturia inaequalis* (Poupard in sod., 2003). Avtorji so ugotovili različen odziv izražanja gena pri kompatibilni (virulenten sev glive) in nekompatibilni interakciji (nevirulenten sev glive). Pri prvi se je izražanje gena za PR-10 induciralo prej kot pri drugi, kar je v nasprotju z splošnimi mehanizmi obrambe, ki

se večinoma v inkompatibilni interakciji sprožijo prej kot v nekompatibilni. Indukcijo izražanje genov za PR-10 so ugotovili tudi pri jablani (*Malus domestica*) po okužbi s TMV, virusom jedkanja tobaka (TEV) in virusom žilne marogavosti tobaka (TVMV) (Pühringer in sod. 2000). Pri okužbi paprike (*Capsicum annuum*) z dvema različnoma TMV so ugotovili, da se izražanje gena za PR-10 poveča le v nekompatibilni reakciji ter da PR-10 lahko deluje kot ribonukleaza za RNA virusa (Park in sod., 2004). Za produkt gena *STH-2* ribonukleazne aktivnosti niso ugotovili, zato gensko spremenjene rastline krompirja s povišanim izražanjem *STH-2* niso bile odporne virulentnemu sevu glive *P. infestans* in krompirjevem virusu X (PVX) (Constabel in sod., 1993). Dinamika izražanja gena *STH-2* je bila odvisna tudi od koncentracije spor glive *P. infestans* (Constabel in Brisson, 1992), kar bi lahko povezali tudi z variabilnostjo pri naših bioloških ponovitvah, kjer natančne koncentracije virusa v inokulumu nismo določili. Posredno je bila dokazana tudi vključenost proteina PR10a v obrambni mehanizem, saj se na promotersko regijo njegovega gena veže transkripcijski faktor PBF-2 iz skupine Whirly, vezava pa je direktno povezana z izražanjem tega gena (Desveaux in sod. 2005).

Zanimiv je bil tudi podoben profil izražanja genov za PR-10 in sHsp (slika 21) pri PCR v realnem času.

Z metodo PCR v realnem času smo ugotovili podoben profil izražanja genov za proteinazna inhibitorja PI TR8 in PCPI (slika 21), vendar je bilo izražanje gena za PCPI bolj izrazito (slika 19). Podoben ekspresijski profil lahko kaže na koregulacijo obeh genov.

Izražanje gena za PI TR8, ki spada v skupino II krompirjevih proteinaznih inhibitorjev, se je povečalo v koreninah rastlin paradižnika po tretiranju z avksini (Taylor in sod., 1993). Izražanje gena za proteinazni inhibitor krompirja skupine II (pin II) se je povečalo lokalno v rastlinah tobaka po okužbi s TMV ter ob ranitvi in UV obsevanju (Balandin 1995). Pin II naj bi bil marker za obrambni odgovor, induciran z JA (Fidantsef in sod., 1999). Tri dni po okužbi krompirja z virulentnim sevom glive *P. infestans* so ugotovili zmanjšano izražanje gena za PI TR8, medtem ko se izražanje pri nekompatibilni interakciji ni spremenilo (Restrepo in sod., 2005). V naših poskusih zaradi velike variabilnosti med serijami in morda tudi zgodnjega časa po okužbi nismo ugotovili razlik med odzivom obeh sort.

Tudi izražanje genske družine PCPI je bilo med serijami zelo različno, vendar pa so bile razlike med izražanjem med okuženimi in slepo inokuliranimi rastlinami, ugotovljene s PCR v realnem času pri tej skupini genov največje (slika 19). Gensko spremenjene rastline tobaka s povečanim izražanjem PCPI so bile odporne na okužbo s PVY (Guitierrez-Campos in sod., 1999). Pompe Novak (2005) je 5 dni po okužbi s PVY^{NTN} ugotovila povečano izražanje gena za PCPI5 pri sorti 'Sante', in manjše izražanje izražanje genov PCPI9 in PCPI10 pri sorti) 'Pentland Squire'.

Značilnost rastlinskih genomov je pojavljanje multigenskih družin zelo podobnih genov, ki pri navadnem repnjakovcu predstavljajo kar dve tretjini genoma (The *Arabidopsis* genome Initiative, 2000). Šele analiza vseh predstavnikov ene genske družine nam lahko da jasne informacije o funkciji le-te. Ker je z cDNA-mikromrežami ločevanje med predstavniki genskih družin praktično nemogoče, je to lahko razlog v odstopanju rezultatov dobljenih z metodama cDNA mikromreže in PCR v realnem času (slika 22).

Primerjava rezultatov, dobljenih z metodama mikromreže in PCR v realnem času je

pokazala, da smo pri genih, pri katerih smo ugotovili velike razlike v izražanju genov z metodo mikromreže, te razlike tudi potrdili z metodo PCR v realnem času, kljub veliki variabilnosti rezultatov med serijami, dobljenimi z obema metodama (slika 22).

Najboljše ujemanje v izražanju smo ugotovili pri genu za PCPI (sliki 22 in 23), kjer so bili začetni oligonukleotidi za PCR v realnem času načrtovani tako, da so zajeli celotno gensko družino PCPI (Krečič Stres, 2006). Zaradi velike podobnosti pripadnikov te genske družine, je cDNA sonda na mikromreži, sicer označena kot PCPI 8.3, verjetno lovila tudi cDNA za druge proteine PCPI. Pri drugih genih nismo dobili tako dobre ponovitve rezultatov, Zanimivo pa je, da smo v nekaterih točkah potrdili več rezultatov kot v drugih (npr. 'Sante' 30 min 1, 'Sante' 12h 2).

Razlike, ki so jih avtorji opazili med rezultati izražanja, dobljenimi z metodama mikromreže in PCR v realnem času so delno pripisali manjši natančnosti cDNA-mikromrež (vezava večih mRNA ene genske družine na eno sondo, kar se lahko pokaže kot lažno pozitiven rezultat (Schenk in sod., 2003), čeprav tudi rezultatov dobljenih z biočipi niso mogli popolnoma ponoviti (Wang in sod., 2003). Do neponovljivosti lahko pride tudi zaradi različnega biološkega materiala in različnih pogojev RT (začetni oligonukleotidi, reverzna transkriptaza; Hammons in sod., 2003), kar je bil primer tudi v naših poskusih, saj smo cDNA pripravljali ločeno za mikromreže (poglavje 3.3.3.1) in PCR v realnem času (poglavje 3.4.2).

Geni, katerih izražanje je inducirano v sorti 'Sante', bi bili lahko pomembni za morebitno pridobivanje gensko spremenjenih odpornih rastlin. Proti PVY odporne gensko spremenjene rastline krompirja ali tobaka so pridobili z vnosom genov virusa PVY: za NIa (Vardi in sod., 1993), plaščni protein (Malnoš in sod., 1994; Smith in sod., 1994, Han in sod., 1999), P1 (Mäki-Valkama in sod., 2000). Z vnosom gena za plaščni protein in gena za plaščni protein s premaknjenim bralnim okvirjem so dobili proti PVY^{NTN} odporne rastline sorte 'Igor' (Stanič-Racman in sod., 2001). Proti PVY odporne rastline pa so pridobili tudi z vnosom genov za proteine drugih virusov, npr. virus zvijanja krompirjevih listov (PLRV; Tacke in sod., 1996), virus mozaika solate (Hassairi in sod. 1998), antivirusnega proteina iz vrste *Phytolacca insularis* (Moon in sod., 1996) ali s povišanjem izražanja encima glukozil-transferaze (Matros in Hock, 2005).

Vsekakor pa ne smemo mimo dejstva, da z uporabljenimi metodami lahko opazujemo le transkripcijski nivo izražanja genov (trenutno relativno vsebnost mRNA), ne pa post-transkripcijskih ali post-translacijskih sprememb, vsebnosti ali celo aktivnosti proteinov (Kazan in sod., 2001). Korelacija med nivojem mRNA in proteinov naj bi bila zelo nizka (Gygy in sod., 1999). Z mikromrežami težko ločimo izražanje posameznih genov v genskih družinah, kar bi lahko omilili z uporabo specifičnih zaporedij UTR (untranslated region) ali oligo mikročipov. Zaenkrat je problematična tudi sama občutljivost mikromrež, kar je opazno posebej pri genih z nizkim izražanjem, ali pri zgodnjem odgovoru rastline, kjer je aktivnih le nekaj celic (Kazan in sod., 2001). Seveda pa obstaja možnost napake v vseh fazah postopka priprave in hibridizacije mikromrež. Tudi analiza podatkov je zaenkrat še problematična, saj še niso postavljeni standardi, ki bi dali zanesljive rezultate. Če se zavedamo zgoraj omenjenih napak, je potrebno rezultate potrditi in dodatno funkcionalno okarakterizirati izbrane gene (z utišanjem, čezmernim izražanjem, izbijanjem genov ali s pripravo gensko spremenjenih rastlin s prehodnim izražanjem) (Kazan in sod., 2001).

5.2 SKLEPI

Namen doktorskega dela je bil poglobiti razumevanje odgovora rastlin na okužbo z virusom. V ta namen smo ugotavljali razlike v izražanju genov v zgodnjem odgovoru (30 minut in 12 ur po inokulaciji) dveh različno občutljivih sort krompirja na okužbo s PVY^{NTN}.

- Pri analizi izražanja z metodo mikromrež smo ugotovili, da so geni, ki se po okužbi različno izražajo, povezani z odgovorom na stres, obrambnimi procesi, sintezo proteinov in regulacijo izražanja genov. Veliko genov, pri katerih smo ugotovili spremenjeno izražanje kodira proteine, katerih funkcija je do sedaj neznana.
- Ugotovili smo, da se je po okužbi spremenilo izražanje več genov glede na čas po inokulaciji kot glede na sorto krompirja, kar bi lahko kazalo na to, da v zgodnjem odzivu med odzivom sort krompirja ni bistvenih razlik. Po drugi strani pa bi lahko izražanje genov, ki so se izrazili enako pri sorti 'Sante' 30 minut po inokulaciji in sorti 'Igor' 12 ur po inokulaciji, kazalo na zakasnen odgovor sorte 'Igor' in s tem občutljivost na virus.
- Z metodo PCR v realnem času smo ugotavljali izražanje 9 genov: 5 proteinov vročinskega šoka, 2 s patogenezo povezanih proteinov in dveh proteinaznih inhibitorjev. Rezultati so potrdili njihovo vključenost v obrambni odgovor rastline.
- Rezultati obeh metod so se v primeru genov, ki so se močno odzivali na okužbo, ujemali.
- Poleg ugotavljanja izražanja genov smo optimizirali nekatere postopke, potrebne za pripravo cDNA (razgradnjo genomske DNA in obratno prepisovanje) ter prilagodili analizo podatkov tako, da smo upoštevali čim več vzrokov variabilnosti.
- Tako smo vzpostavili učinkovit sistem analize izražanja genov v listih krompirja, ki ga bomo lahko uporabili za študij odgovora na nivoju izražanja genov pri drugih sortah krompirja in drugih virusih.

6 POVZETEK (SUMMARY)

6.1 POVZETEK

Krompirjev virus Y^{NTN} (PVY^{NTN}), ki povzroča obročkasto nekrozo gomoljev krompirja, zmanjšuje pridelek in vpliva na njegovo kakovost. Sorte krompirja so različno občutljive za ta virus, ni pa natančno poznano, kakšen je mehanizem, ki privede do teh razlik. Med najbolj občutljive sodi nekoč zelo priljubljena slovenska sorta 'Igor', pri kateri okužba z virusom povzroči razvoj izrazitih bolezenskih znamenj, tako na poganjkih kot na gomoljih. Pri odporni sorti 'Sante' odpornost izvira iz divje vrste krompirja *Solanum stoloniferum*. Interakcija krompirja s PVY^{NTN} je zelo dobro raziskana na morfološkem in biokemijskem nivoju, ni pa še popolnoma razjasnjeno, kakšne so spremembe na nivoju izražanja genov, ki privedejo do opaženih sprememb. Posebej zanimivo je ugotavljanje morebitnih razlik na nivoju izražanja genov med občutljivimi in odpornimi sortami v zgodnjem odgovoru rastline na okužbo z virusom, saj gre tu v večji meri za odgovor na okužbo in ne na posledice okužbe.

Namen doktorskega dela je bil poglobiti razumevanje odgovora rastlin na okužbo z virusom, natančneje ugotavljati razlike v izražanju genov v zgodnjem odgovoru dveh različno občutljivih sort krompirja na okužbo s PVY^{NTN}. Hkrati smo želeli razviti postopek, ki je omogočal pripravo kakovostne cDNA iz vzorcev rastlin krompirja in njeno analizo z metodama PCR v realnem času in mikromreže ter optimizirati analizo podatkov, dobljenih z obema metodama.

Z metodama cDNA-mikromreže in PCR v realnem času smo ugotavljali različno izražanje genov v zgodnjem odgovoru krompirja (*Solanum tuberosum* L.) na okužbo krompirjevim virusom Y^{NTN}. Izražanje pri na virus občutljivi (cv. 'Igor') in odporni (cv. 'Sante') sorti krompirja smo primerjali med slepo inokuliranimi in okuženimi rastlinami, 30 minut in 12 ur po inokulaciji, v treh bioloških ponovitvah.

Vzorci komplementarne cDNA, prepisane iz celokupne RNA, smo hibridizirali na cDNA-mikromreže s cDNA krompirja in hibridizirano cDNA označili z dendrimeri fluorescenčnih barvil. Po optičnem branju in predpripravi podatkov, ki je vključevala kontrolo kvalitete, normalizacijo in filtriranje, smo podatke analizirali s statističnima testoma t-test in ANOVA. Tako smo dobili skupine genov, ki so se značilno v okuženih rastlinah značilno bolj ali manj izrazili. Ugotovili smo da so geni, ki se po okužbi različno izražajo, povezani z odgovorom na stres, obrambnimi procesi, sintezo proteinov in regulacijo izražanja genov. Veliko genov, pri katerih smo ugotovili spremenjeno izražanje kodira proteine, katerih funkcija je do sedaj neznana. Ugotovili smo tudi, da se je več genov izrazilo različno glede na čas po inokulaciji kot glede na sorto rastline.

Z metodo PCR v realnem času smo ugotavljali izražanje 9 genov: 5 proteinov vročinskega šoka, 2 s patogenezo povezanih proteinov in dveh proteinaznih inhibitorjev. Preučevane gene smo izbrali glede na preliminarne rezultate, dobljene z analizo mikromrež in tako skonstruirali in optimizirali začetne oligonukleotide za 4 amplikone genov za proteine vročinskega šoka. Rezultati izražanja izbranih genov so potrdili njihovo vključenost v

obrambni odgovor rastline. Največje razlike v izražanju smo po okužbi ugotovili pri genu za proteinazne inhibitorje krompirja.

Rezultati obeh uporabljenih metod so se v primeru genov, ki so se močno odzivali na okužbo, ujemale.

Poleg ugotavljanja izražanja genov smo optimizirali nekatere postopke, potrebne za pripravo cDNA. Izbrali smo najprimernejši način razgradnje genomske DNA v vzorcih celokupne RNA ter prilagodili koncentracijo encima DNAza I. Izbrali smo tudi najprimernejše začetne oligonukleotide in reverzno transkriptazo v postopku obratnega prepisovanja ter ugotavljali variabilnost reakcij obratnega prepisovanja in PCR v realnem času.

Optimizirali smo sistem analize podatkov za obe uporabljeni metodi ugotavljanja izražanja genov. S preverjanjem kvalitete podatkov v več fazah in upoštevanjem več vzrokov variabilnosti smo vzpostavili učinkovit sistem analize izražanja genov v listih krompirja.

6.2 SUMMARY

Potato virus Y^{NTN} (PVY^{NTN}), causing potato tuber ring necrosis disease, dramatically lowers the quantity and the quality of the potato yield all over the world. Different potato cultivars are differently susceptible to the virus, though it is not known, what the mechanisms, leading to these differences are. The cultivar Igor, once very popular variety, is one of the most sensitive ones, with severe disease symptoms on plants as well as on tubers. The high resistance of cv. Sante has been introduced from wild potato *Solanum stoloniferum*. In this cultivar, virus can enter the cell, but can move only into neighboring cells where its further spreading is stopped by the hypersensitive response.

The interaction of potato and PVY^{NTN} has been studied in detail on the morphological and biochemical level, while the transcript level has not been studied enough to explain what are the differences in gene expression leading to observed morphological and biochemical differences. Differences in gene expression, especially those in early response to infection, when the response is more defense-related rather than response to infection, between sensitive and resistant cultivars could improve our understanding of the resistance mechanisms.

The goal of the doctoral dissertation was to deepen our understanding of plant response to virus infection by studying differences in gene expression in early response of two differently susceptible cultivars on PVY^{NTN} infection. In addition, our goal was to develop a procedure for the preparation of high quality cDNA from potato leaf material for microarray and real-time PCR analysis and to optimize analysis of data obtained by the both methods.

Differential gene expression in early response of potato (*Solanum tuberosum* L.) plants to potato virus Y^{NTN} infection was studied using cDNA-microarrays and real-time PCR. Expression in two potato cultivar, a susceptible cv. Igor and resistant cv. Sante, 30 minutes and 12 hours after virus inoculation was compared between mock inoculated and virus infected plants, in three biological replicates.

Samples of complementary cDNA, reverse transcribed from DNase-digested total RNA, were hybridized to cDNA-microarrays containing potato clone cDNAs. Hybridized cDNA was labeled with dendrimers of fluorescent dyes. After scanning and data preparation that included quality control, normalization and gene filtering, data was analyzed using t-test and ANOVA. In this way genes that showed significant expression in virus infected plants were discovered. Genes that were significantly differentially expressed were involved in response to stress and defense, or involved in regulation of gene expression or protein synthesis or were coding proteins with unknown functions. More genes were expressed differentially regarding the time after inoculation than regarding the cultivar.

Real-time PCR was used to monitor the expression of nine genes: 5 genes for heat shock proteins two genes for pathogenesis-related proteins and 2 genes for proteinase inhibitors. Genes were selected on the basis of preliminary microarray analysis and possible involvement in plant defense. Primers for four amplicons for heat shock proteins were constructed and optimized. Results confirmed involvement of the selected genes in plant

response to virus infection.

In the case of genes that responded strongly to virus infection (e.g. genes for potato cysteine proteinase inhibitors), the results of expression obtained by both methods were in accordance.

Beside gene expression study, processes in cDNA preparation were optimized. The method for residual genomic DNA was chosen and DNase I concentration was optimized. Most suitable primers and reverse transcriptase for reverse transcription were chosen. Additionally, the variability in reverse transcription and real-time PCR reaction was monitored.

Data analysis for the data obtained by both used methods were optimized by quality control in several stages and taking into account several sources of variability of the data. In this way a successful system for gene expression analysis in potato leaves was developed.

7 VIRI

- 3DNA Array 350TM expression array detection kit for micorarrays. 2005. Hatfield, Genisphere: str. 8.
- Aharoni A., Vorst O. 2002. DNA microarrays for functional plant genomics. *Plant Molecular Biology*, 48, 1 - 2: 99-118
- Alba R., Fei Z., Payton P., Liu Y., Moore S.L., Debbie P., Cohn J., D'Ascenzo M., Gordon J.S., Rose J.K., Martin G., Tanksley S.D., Bouzayen M., Jahn M.M., Giovannoni J. 2004. ESTs, cDNA microarrays, and gene expression profiling: tools for dissecting plant physiology and development. *Plant Journal*, 39, 5: 697-714
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Meyers E.W., Lipman D. J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215: 403-410
- Anžlovar S., Kovač M., Ravnikar M. 1996. Photosynthetic pigments in healthy and virus-infected potato plantlets (*Solanum tuberosum* L.) grown in vitro. *Phyton* 36, 2: 221-230
- Aoki K., Kragler F., Xoconostle-Cázares B., Lucas W.J. 2002. A subclass of plant heat shock cognate 70 chaperones carries a motif that facilitates trafficking through plasmodesmata. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 25: 16342-16347
- Aparicio F., Thomas C.L., Lederer C., Niu Y., Wang D., Maule A.J. 2005. Virus induction of heat shock protein 70 reflects a general response to protein accumulation in the plant cytosol. *Plant Physiology*, 138, 1: 529-536
- Aranda M., Maule A. 1998. Virus-induced host gene shutoff in animals and plants. *Virology*, 243, 2: 261-267
- Aranda M.A., Escaler M., Wang D., Maule A.J. 1996. Induction of HSP70 and polyubiquitin expression associated with plant virus replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, 26: 15289-15293
- Ashburner M., Ball C.A., Blake J.A., Botstein D., Butler H., Cherry J.M., Davis A.P., Dolinski K., Dwight S.S., Eppig J.T., Harris M.A., Hill D.P., Issel-Tarver L., Kasarskis A., Lewis S., Matese J.C., Richardson J.E., Ringwald M., Rubin G.M., Sherlock G. 2000. Gene ontology: tool for the unification of biology. *Nature Genetics*, 25, 1: 25-29
- Badiee A., Eiken H.G., Steen V.M., Lovlie R. 2003. Evaluation of five different cDNA labeling methods for microarrays using spike controls. *BMC Biotechnology*, 3, 23:[1-5]
<http://www.biomedcentral.com/>
- Baebler Š., Hren, M., Kogovšek P., Krečič Stres H., Curk T., Juvan P., Zupan B., Pompe Novak M., Gruden K. 2005. Laboratory and computer practice protocols. Ljubljana, Department of Plant Physiology and Biotechnology, National Institute of Biology: 39

str.

- Baebler Š., Krečič Stres H., Pompe Novak M., Gruden K., Kovač M., Žel J., Ravnikar M. 2003. Differential gene expression of aminocyclopropanecarboxylate oxidase and catalase I in healthy and potato virus Y^{NTN} infected potato (*Solanum tuberosum* L.) plants. V: Proceedings of Genetika 2003, 3rd Congress of the Genetic Society of Slovenia with International Participation, Bled, 31.5 - 4.6. 2003. Javornik, B., Luthar Z. (eds.). Ljubljana, Genetic Society of Slovenia: 188-189
- Baker B., Zambryski P., Staskawicz B., Dinesh-Kumar S.P. 1997. Signaling in plant-microbe interactions. *Science*, 276: 726-733
- Balandin T., van der Does C., Albert J.-M.B., Bol J.F., Linthorst H.J.M. 1995. Structure and induction pattern of a novel proteinase inhibitor class II gene of tobacco. *Plant Molecular Biology*, 27, 6: 1197-1204
- Baldwin D., Crane V., Rice D. 1999. A comparison of gel-based, nylon filter and microarray techniques to detect differential RNA expression in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 2, 2: 96-103
- Barker H., Harrison B.D. 1984. Expression of genes for resistance to potato virus Y in potato plants and protoplasts. *Annals of Applied Biology*, 105: 539-545
- Barrett J.C., Kawasaki E.S. 2003. Microarrays: the use of oligonucleotides and cDNA for the analysis of gene expression. *Drug Discovery Today*, 8, 3: 134-141
- Beffa R., Meins F.Jr. 1996. Pathogenesis-related functions of plant β -1,3-glucanases investigated by antisense transformation. *Gene*, 179: 97-103
- Benhamou N. 1999. Elicitor-induced plant defence pathways. *Trends in Plant Science*, 1, 7: 233-239
- Bilgin D.D., Liu Y., Schiff M., Dinesh-Kumar S.P. 2003. P58IPK, a plant ortholog of double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR inhibitor, functions in viral pathogenesis. *Developmental Cell*, 4, 5: 651-661
- Birch P.R.J., Avrova A.O., Duncan J.M., Lyon G.D., Toth R.L. 1999. Isolation of potato genes that are induced during an early stage of the hypersensitive response to *Phytophthora infestans*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 12, 4: 356-361
- Birch P.R.J., Kamoun S. 2000. Studying interaction transcriptomes: coordinated analyses of gene expression during plant-microorganism interactions. *Trends in Plant Science*, Supplement: Life Science Research in the 21st Century: a Trends Guide: s77-s82
- Boonham N., Walsh K., Smith P., Madagan K., Graham I., Barker I. 2003. Detection of potato viruses using microarray technology: towards a generic method for plant viral disease diagnosis. *Journal of Virological Methods*, 108, 2: 181-187
- Brigneti G., Garcia-Mas J., Baulcombe D.C. 1997. Molecular mapping of the potato virus Y resistance gene *Ry_{sto}* in potato. *Theoretical and Applied Genetics*, 94: 198-203
- Brigneti G., Voinnet O., Li W.X., Ji L.H., Ding S.W., Baulcombe D.C. 1998. Viral

- pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *EMBO Journal*, 17, 22: 6739-6746
- Brunner A.M., Yakovlev I.A., Strauss S.H. 2004. Validating internal controls for quantitative plant gene expression studies. *BMC Plant Biology*, 4, 14:[1-7], <http://www.biomedcentral.com/>
- Buckhout T.J., Thimm O. 2003. Insights into metabolism obtained from microarray analysis. *Current Opinion in Plant Biology*, 6, 3: 288-296
- Bustin S.A. 2002. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology*, 29, 1: 23-39
- Bustin S.A., Benes V., Nolan T., Pfaffl M.W. 2005. Quantitative real-time RT-PCR - a perspective. *Journal of Molecular Endocrinology*, 34, 3: 597-601
- Bustin S.A., Nolan T. 2004. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *Journal of Biomolecular Techniques*, 15, 3: 155-166
- Bystricka D., Lenz O., Mraz I., Piherova L., Kmoch S., Sip M. 2005. Oligonucleotide-based microarray: A new improvement in microarray detection of plant viruses. *Journal of Virological Methods*, 128, 1-2: 176-182
- Chen W., Provart N.J., Glazebrook J., Katagiri F., Chang H.S., Eulgem T., Mauch F., Luan S., Zou G., Whitham S.A., Budworth P.R., Tao Y., Xie Z., Chen X., Lam S., Kreps J.A., Harper J.F., Si-Ammour A., Mauch-Mani B., Heinlein M., Kobayashi K., Hohn T., Dangel J.L., Wang X., Zhu T. 2002. Expression profile matrix of Arabidopsis transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses. *Plant Cell*, 14, 3: 559-574
- Chinchilla D., Merchan F., Megias M., Kondorosi A., Sousa C., Crespi M. 2003. Ankyrin protein kinases: a novel type of plant kinase gene whose expression is induced by osmotic stress in alfalfa. *Plant Molecular Biology*, 51, 4: 555-566
- Chuaqui R.F., Bonner R.F., Best C.J., Gillespie J.W., Flaig M.J., Hewitt S.M., Phillips J.L., Krizman D.B., Tangrea M.A., Ahram M., Linehan W.M., Knezevic V., Emmert-Buck M.R. 2002. Post-analysis follow-up and validation of microarray experiments. *Nature Genetics*, 32 Suppl: s509-s514
- Coker J.S., Davies E. 2003. Selection of candidate housekeeping controls in tomato plants using EST data. *Biotechniques*, 35, 4: 740-748
- Constabel C.P., Bertrand C., Brisson N. 1993. Transgenic potato plants overexpressing the pathogenesis-related STH-2 gene show unaltered susceptibility to *Phytophthora infestans* and potato virus X. *Plant Molecular Biology*, 22, 5: 775-782
- Constabel C.P., Bertrand C., Brisson N. 1993. Transgenic potato plants overexpressing the pathogenesis-related STH-2 gene show unaltered susceptibility to *Phytophthora infestans* and potato virus X. *Plant Molecular Biology*, 22, 5: 775-782
- Cooper B. 2001. Collateral gene expression changes induced by distinct plant viruses during the hypersensitive resistance reaction in *Chenopodium amaranticolor*. *Plant*

Journal, 26, 3: 339-349

- Creelman R.A., Mullet, J.E. 1997. Biosynthesis and action of jasmonates in plants. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 48: 355-381
- Dermastia M., Ravnikar M. 1996. Altered cytokinin pattern and enhanced tolerance to potato virus Y^{NTN} in the susceptible potato cultivar (*Solanum tuberosum* L.) grown *in vitro*. Physiology and Molecular Plant Pathology, 48: 65-71
- Desveaux D., Maréchal A., Brisson N. 2005. Whirly transcription factors: defense gene regulation and beyond. Trends in Plant Science, 10, 2: 95-102
- Dixon M.S., Golstein C., Thomas C.M., van der Biezen E.A., Jones J.D.G. 2000. Genetic complexity of pathogen perception by plants: The example of *Rcr3*, a tomato gene required specifically by *Cf-2*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 97, 16: 8807-8814
- Dobbin K., Shih J.H., Simon R. 2003. Questions and answers on design of dual-label microarrays for identifying differentially expressed genes. Journal of the National Cancer Institute, 95, 18: 1362-1369
- Dolenc J., Vilhar B., Dermastia M. 2000. Systemic infection with potato virus Y^{NTN} alters the structure and activity of the shoot apical meristem in a susceptible potato cultivar. Physiology and Molecular Plant Pathology, 56: 33-38
- Ducreux L.J., Morris W.L., Hedley P.E., Shepherd T., Davies H.V., Millam S., Taylor M.A. 2005. Metabolic engineering of high carotenoid potato tubers containing enhanced levels of beta-carotene and lutein. Journal of Experimental Botany, 56, 409: 81-89
- Duggan D.J., Bittner M., Chen Y., Meltzer P., Trent J.M. 1999. Expression profiling using cDNA microarrays. Nature Genetics, 21, 1 Suppl: s10-s14
- Ebel J., Mithöfer A. 1998. Early events in the elicitation of plant defence. Planta, 206, 3: 335-348
- Escaler M., Aranda M.A., Roberts I.M., Thomas C.L., Maule A.J. 2000. A comparison between virus replication and abiotic stress (heat) as modifiers of host gene expression in pea. Molecular Plant Pathology, 1, 3: 159-167
- Eulgem T. 2005. Regulation of the *Arabidopsis* defense transcriptome. Trends in Plant Science, 10, 2 : 71-78
- Farmer E.E., Ryan C.A. 1992. Octadecanoid Precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. Plant Cell, 4: 129-134
- Feys B.J., Parker J.E. 2000. Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. Trends in Genetics, 16: 449-445
- Fidantsef A.L., Stout M.J., Thaler J.S., Duffey S.S., Bostock R.M. 1999. Signal interactions in pathogen and insect attack: expression of lipoxygenase, proteinase inhibitor II, and pathogenesis-related protein P4 in the tomato, *Lycopersicon*

- esculentum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 54, 3-4: 97-114
- Fiehn O., Kloska S., Altmann T. 2001. Integrated studies on plant biology using multiparallel techniques. *Current Opinion in Biotechnology*, 12, 1: 82-86
- Fregene M., Matsumura H., Akano A., Dixon A., Terauchi R. 2004. Serial analysis of gene expression (SAGE) of host-plant resistance to the cassava mosaic disease (CMD). *Plant Molecular Biology*, 56, 4: 563-571
- Gachon C., Mingam A., Charrier B. 2004. Real-time PCR: what relevance to plant studies? *Journal of Experimental Botany*, 55, 402: 1445-1454
- Geri C., Cecchini E., Giannakou M.E., Covey S.N., Milner J.J. 1999. Altered patterns of gene expression in *Arabidopsis* elicited by cauliflower mosaic virus (CaMV) infection and by a CaMV gene VI transgene. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 12: 377-384
- Gibly A., Bonshtien A., Balaji V., Debbie P., Martin G.B., Sessa G. 2004. Identification and expression profiling of tomato genes differentially regulated during a resistance response to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 17, 11: 1212-1222
- Giulietti A., Overbergh L., Valckx D., Decallonne B., Bouillon R., Mathieu C. 2001. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods*, 25, 4: 386-401
- Golem S., Culver J.N. 2003. *Tobacco mosaic virus* induced alterations in the gene expression profile of *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 16, 8: 681-688
- Grandbastien M.A. 1998. Activation of plant retrotransposons under stress conditions. *Trends in Plant Science*, 3: 181-187
- Gruden K., Štrukelj B., Ravnikar M., Herzog-Velikonja B. 2000. A putative virial resistance-connected protein isolated from potato cultivar Santé resistant to PVY^{NTN} infection. *Phyton*, 40: 191-200
- Gutierrez-Campos R., Torres-Acosta J.A., Saucedo-Arias L.J., Gomez-Lim M.A. 1999. The use of cysteine proteinase inhibitors to engineer resistance against potyviruses in transgenic tobacco plants. *Nature Biotechnology*, 17: 1223-1226
- Gygi S.P., Rochon Y., Franza B.R., Aebersold R. 1999. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Molecular Cell Biology*, 19, 3: 1720-1730
- Hamberg M., Sanz A., Castresana C. 1999. α -oxidation of fatty acids in higher plants. Identification of a pathogen-inducible oxygenase (piox) as an α -dioxygenase and biosynthesis of 2-hydroperoxylinolenic acid. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 35: 24503-24513
- Hammond J.P., Bennett M.J., Bowen H.C., Broadley M.R., Eastwood D.C., May S.T., Rahn C., Swarup R., Woolaway K.E., White P.J. 2003. Changes in gene expression in *Arabidopsis* shoots during phosphate starvation and the potential for developing smart

- plants. *Plant Physiology*, 132, 2: 578-596
- Hammond-Kosack K.E., Jones J.D.G. 1996. Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell*, 8: 1773-1791
- Han S.J., Cho H.S., You J.S., Nam Y.W., Park E.K., Shin J.S., Park Y.I., Park W.M., Paek K.H. 1999. Gene silencing-mediated resistance in transgenic tobacco plants carrying potato virus Y coat protein gene. *Molecules and Cells*, 9: 376-383
- Hassiri A., Masmoudi K., Albouy J., Robaglia C., Jullien M., Ellouz R. 1998. Transformation of two potato cultivars Spunta and Claustar (*Solanum tuberosum*) with lettuce mosaic virus coat protein gene and heterologous immunity to potato virus Y. *Plant Science*, 136: 31-42
- Hatsugai N., Kuroyanagi M., Yamada K., Meshi T., Tsuda S., Kondo M., Nishimura M., Hara-Nishimura I. 2004. A plant vacuolar protease, VPE, mediates virus-induced hypersensitive cell death. *Science*, 305, 5685: 855-858
- Havelda Z., Maule A.J. 2000. Complex spatial responses to Cucumber Mosaic Virus infection in susceptible *Cucurbita pepo* cotyledons. *Plant Cell*, 12, 10: 1975-1986
- Hegde P., Qi R., Abernathy K., Gay C., Dharap S., Gaspard R., Hughes J.E., Snesrud E., Lee N., Quackenbush J. 2000. A concise guide to cDNA microarray analysis. *Biotechniques*, 29, 3: 548-4, 556
- Herbers K., Takhata Y., Melzer 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: 51-59
- Herbette S., Lenne C., Leblanc N., Julien J.L., Drevet J.R., Roeckel-Drevet P. 2002. Two GPX-like proteins from *Lycopersicon esculentum* and *Helianthus annuus* are antioxidant enzymes with phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase and thioredoxin peroxidase activities. *European Journal of Biochemistry*, 269, 9: 2414-2420
- Hertzberg M., Sievertzon M., Aspeborg H., Nilsson P., Sandberg G., Lundeberg J. 2001. cDNA microarray analysis of small plant tissue samples using a cDNA tag target amplification protocol. *Plant Journal*, 25, 5: 585-591
- High capacity cDNA archive Kit. Product Bulletin. 2001. Foster City, Applied Biosystems: 19 str.
- 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: 143-150
- Hinrichs J., Berger S., Shaw J. G. 1998. A hypersensitive response-like mechanism is involved in resistance of potato plants bearing the Ry(sto) gene to the potyviruses potato virus Y and tobacco etch virus. *Journal of General Virology*, 79: 167-17
- Hoegen E., Strömberg A., Pihlgren U., Kombrink E. 2002. Primary structure and tissue-specific expression of the pathogenesis-related protein PR-1b in potato. *Molecular*

Plant Pathology, 3, 5: 329-345

- Huang Z., Yeakley J.M., Garcia E.W., Holdridge J.D., Fan J.B., Whitham S.A. 2005. Salicylic acid-dependent expression of host genes in compatible *Arabidopsis*-virus interactions. *Plant Physiology*, 137, 3: 1147-1159
- Iskandar H.M., Simpson R.S., Casu R.E., Bonnett G.D., Maclean D.J., Manners J.M. 2004. Comparison of reference genes for quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of gene expression in sugarcane. *Plant Molecular Biology Reporter*, 22, 4: - 325
- Kazan K., Schenk P.M., Wilson I., Manners J.M. 2001. DNA microarrays: new tools in the analysis of plant defence responses. *Molecular Plant Pathology*, 2, 3: 177-185
- Kim B.R., Nam H.Y., Kim S.U., Kim S.I., Chang Y.J. 2003. Normalization of reverse transcription quantitative-PCR with housekeeping genes in rice. *Biotechnology Letters*, 25, 21: 1869-1872
- Kimura Y., Tosa Y., Shimada S., Soga R., Kusaba M., Sunaga T., Betsuyaku S., Eto Y., Nakayashiki H., Mayama S. 2001. OARE-1, a Ty1-copia retrotransposon in oat activated by abiotic and biotic stresses. *Plant Cell Physiology*, 42: 1345-1354
- Klein D. 2002. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends in Molecular Medicine*, 8, 6: 257-260
- Knoester M., Linthorst H.J.M., Bol J.F., Van Loon L.C. 1997. Modulation of stress-inducible ethylene biosynthesis by sense and antisense gene expression in tobacco. *Plant Science*, 126: 173-183
- Koning A.J., Rose R., Comai L. 1992. Developmental expression of tomato heat-shock cognate protein 80. *Plant Physiology*, 100, 2: 801-811
- Krečič Stres H. 2001. Vloga salicilne in gentinske kisline pri odzivu krompirja (*Solanum tuberosum* L.) na okužbo s krompirjevim virusom Y^{NTN}. Magistrsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta: 95 str.
- Krečič Stres H. 2006. Časovni potek izražanja genov pri odporni sorti krompirja po okužbi z virusom PVY^{NTN}. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Interfakultetni podiplomski študij biokemije in molekularne biologije (disertacija v pripravi).
- Krečič-Stres H., Vučak C., Ravnikar M., Kovač M. 2005. Systemic Potato virus Y^{NTN} infection and levels of salicylic and gentisic acids in different potato genotypes. *Plant Pathology*, 54, 4: 441-447
- Krishna P. 2003. Brassinosteroid-mediated stress responses. *Journal of Plant Growth Regulators*, 22, 4: 289-297
- Kumar S., Reed M.W., Gamper H.B., Jr., Gorn V.V., Lukhtanov E.A., Foti M., West J., Meyer R.B., Jr., Schweitzer B.I. 1998. Solution structure of a highly stable DNA duplex conjugated to a minor groove binder. *Nucleic Acids Research*, 26, 3: 831-838

- Kus M. 1994. Krompir. Ljubljana, ČZP Kmečki glas: 107-115
- Kus M. 1995. The epidemic of tuber necrotic ringspot strain of potato virus Y (PVY^{NTN}) and its effect on potato crops in Slovenia. V: Proceedings of the European Potato Research Conference, Bled, Slovenia: 18-22 June 1995. Ljubljana, European Association of Potato Research: 151-154
- Laird J., Armengaud P., Giuntini P., Laval V., Milner J.J. 2004. Inappropriate annotation of a key defence marker in *Arabidopsis*: will the real *PR-1* please stand up? *Planta*, 219, 6: 1089-1092
- Lekanne Deprez R.H., Fijnvandraat A.C., Ruijter J.M., Moorman A.F. 2002. Sensitivity and accuracy of quantitative real-time polymerase chain reaction using SYBR green I depends on cDNA synthesis conditions. *Analytical Biochemistry*, 307, 1: 63-69
- Leonard S., Plante D., Wittmann S., Daigneault N., Fortin M.G., Laliberte J.F. 2000. Complex formation between potyvirus VPg and translation eukaryotic initiation factor 4E correlates with virus infectivity. *Journal of Virology*, 74, 17: 7730-7737
- Leung Y.F., Cavalieri D. 2003. Fundamentals of cDNA microarray data analysis. *Trends in Genetics*, 19, 11: 649-659
- Liu J., Shono M. 1999. Characterization of mitochondria-located small heat shock protein from tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant and Cell Physiology*, 40, 12: 1297-1304
- Liu Y., Burch-Smith T., Schiff M., Feng S., Dinesh-Kumar S.P. 2004. Molecular chaperone Hsp90 associates with resistance protein N and its signaling proteins SGT1 and Rar1 to modulate an innate immune response in plants. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 3: 2101-2108
- Liu Y., Schiff M., Czymmek K., Tallozy Z., Levine B., Dinesh-Kumar S.P. 2005. Autophagy regulates programmed cell death during the plant innate immune response. *Cell*, 121, 4: 567-577
- Livak K.J., Schmittgen T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{(-\Delta\Delta C(T))}$ method. *Methods*, 25, 4: 402-408
- Longo M.C., Berninger M.S., Hartley J.L. 1990. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene*, 93, 1: 125-128
- 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 defense-signaling pathways and activates rapid systemic generation of reactive oxygen species. *Plant Physiology*, 139, 2: 935-948
- Lu R., Malcuit I., Moffett P., Ruiz M.T., Peart J., Wu A.J., Rathjen J.P., Bendahmane A., Day L., Baulcombe D.C. 2003. High throughput virus-induced gene silencing implicates heat shock protein 90 in plant disease resistance. *EMBO Journal*, 22, 21: 5690-5699
- Maleck K., Levine A., Eulgem T., Morgan A., Schmid J., Lawton K.A., Dangl J.L., Dietrich R.A. 2000. The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic

- acquired resistance. *Nature Genetics*, 26, 4: 403-410
- Malnoë P., Farinelli L., Collet G.F., Reust W. 1994. Small-scale field tests with transgenic potato, cv. Bintje, to test resistance to primary and secondary infections with potato virus Y. *Plant Molecular Biology*, 25: 963-975
- Marathe R., Guan Z., Anandalakshmi R., Zhao H., Dinesh-Kumar S.P. 2004. Study of *Arabidopsis thaliana* resistome in response to cucumber mosaic virus infection using whole genome microarray. *Plant Molecular Biology*, 55, 4: 501-520
- Matros A., Mock H.P. 2004. Ectopic expression of a UDP-glucose:phenylpropanoid glucosyltransferase leads to increased resistance of transgenic tobacco plants against infection with potato virus Y. *Plant and Cell Physiology*, 45, 9: 1185-1193
- Matton D.P., Brisson N. 1989. Cloning, expression, and sequence conservation of pathogenesis-related gene transcripts of potato. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2, 6: 325-331
- Maule A., Leh V., Lederer C. 2002. The dialogue between viruses and hosts in compatible interactions. *Current Opinion in Plant Biology*, 5, 4: 279-284
- Mehle N., Kovač M., Petrovič N., Pompe Novak M., Baebler Š., Krečič Stres H., Gruden K., Ravnikar M. 2004. Spread of potato virus Y^{NTN} in potato cultivars (*Solanum tuberosum* L.) with different levels of sensitivity. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 64, 6: 293-300
- Menke F.L., Champion A., Kijne J.W., Memelink J. 1999. A novel jasmonate- and elicitor-responsive element in the periwinkle secondary metabolite biosynthetic gene *Str* interacts with a jasmonate- and elicitor-inducible AP2-domain transcription factor, ORCA2. *EMBO Journal*, 18, 16: 4455-4463
- Milavec M., Ravnikar M., Kovač M. 2001. Peroxidases and photosynthetic pigments in susceptible potato infected with potato virus Y^{NTN}. *Plant Physiology and Biochemistry* 39: 891-898
- Moon Y.H., Song S.K., Choi K.W., Lee J.S. 1997. Expression of a cDNA encoding *Phytolacca insularis* antiviral protein confers virus resistance on transgenic potato plants. *Molecules and Cells*, 7: 807-815
- Mosolov V.V., Valueva T.A. 2005. Proteinase inhibitors and their function in plants: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 41, 3: 227-246
- Munich information center for protein sequences. 2005. Neuherberg, GSF-National Research Center for Environment and Health
<http://mips.gsf.de/> (5.12.2005): 1str.
- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497
- Murphy A.M., Chivasa S., Singh D.P., Carr J.P. 1999. Salicylic acid-induced resistance to viruses and other pathogens: a parting of the ways? *Trends in Plant Science*, 4: 155-160

- Mysore K.S., Ryu C-M. 2004. Nonhost resistance: how much do we know? Trends in Plant Science, 10: 1360-1385.
- Naderi A., Ahmed A.A., Barbosa-Morais N.L., Aparicio S., Brenton J.D., Caldas C. 2004. Expression microarray reproducibility is improved by optimising purification steps in RNA amplification and labelling. BMC Genomics, 5, 9:[1-14], <http://www.biomedcentral.com/>
- Naderi M., Berger P.H. 1997. Pathogenesis-related protein 1a is induced in potato virus Y-infected plants as well as by coat protein targeted to chloroplasts. Physiological and Molecular Plant Pathology, 51, 1: 41-44
- Nakashita H., Yasuda M., Nitta T., Asami T., Fujioka S., Arai Y., Sekimata K., Takatsuto S., Yamaguchi I., Yoshida S. 2003. Brassinosteroid functions in a broad range of disease resistance in tobacco and rice. Plant Journal, 33, 5: 887-898
- Nautiyal P.C., Shono M., Egawa Y. 2005. Enhanced thermotolerance of the vegetative part of MT-sHSP transgenic tomato line. Scientia Horticulturae, 105, 3: 393-409
- Navarre D.A., Mayo D. 2004. Differential characteristics of salicylic acid-mediated signaling in potato. Physiological and Molecular Plant Pathology, 64, 4: 179-188
- Nelson R.S., Citovsky V. 2005. Plant viruses. Invaders of cells and pirates of cellular pathways. Plant Physiology, 138, 4: 1809-1814
- Nicot N., Hausman J.F., Hoffmann L., Evers D. 2005. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. Journal of Experimental Botany, 56, 421: 2907-2914
- Park C.J., Kim K.J., Shin R., Park J.M., Shin Y.C., Paek K.H. 2004. Pathogenesis-related protein 10 isolated from hot pepper functions as a ribonuclease in an antiviral pathway. Plant Journal, 37, 2: 186-198
- Petricoin E.F., Hackett J.L., Lesko L.J., Puri R.K., Gutman S.I., Chumakov K., Woodcock J., Feigal D.W., Zoon K.C., Sistiare F.D. 2002. Medical applications of microarray technologies: a regulatory science perspective. Nature Genetics, 32: 474-479
- Petrovič N., Miersch O., Ravnikar M., Kovač M. 1997. Potato virus Y^{NTN} alters the distribution and concentration of endogenous jasmonic acid in potato plants grown *in vitro*. Physiology and Molecular Plant Pathology, 50: 1-8
- Pfaffl M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Research, 29, 9: [1-6] <http://nar.oxfordjournals.org>
- Pompe Novak M. 2006. 'Izražanje genov pri sortah krompirja 5 in 14 dni po okužbi z virusom PVY^{NTN}', Ljubljana, Nacionalni Inštitut za Biologijo (osebni vir, november 2005)
- Pompe Novak M., Gruden K., Baebler Š., Krečič Stres H., Kovač M., Jongsma M., Ravnikar M. 2006. Potato virus Y induced changes in the gene expression of potato (*Solanum tuberosum* L.). Physiological and Molecular Plant Pathology (v tisku).

- Pompe Novak, M. 2002. Razlike v izražanju genov med zdravimi in s krompirjevim virusom Y^{NTN} okuženimi rastlinami krompirja (*Solanum tuberosum* L.). Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni podiplomski študij biotehnologije: 240 str.
- Pompe-Novak M., Wrisher M., Ravnikar M. 2001. Ultrastructure of chloroplasts in leaves of potato plants infected by potato virus Y^{NTN}. *Phyton*, 41: 215-226
- Poupard P., Parisi L., Campion C., Ziadi S., Simoneau P. 2003. A wound- and ethephon-inducible PR-10 gene subclass from apple is differentially expressed during infection with a compatible and an incompatible race of *Venturia inaequalis*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 62, 1: 3-12
- Pühringer H., Moll D., Hoffmann-Sommergruber K., Watillon B., Katinger H., da Câmara Machado M.L. 2000. The promoter of an apple *Ypr10* gene, encoding the major allergen Mal d 1, is stress- and pathogen-inducible. *Plant Science*, 152, 1: 35-50
- Puthoff D.P., Nettleton D., Rodermel S.R., Baum T.J. 2003. Arabidopsis gene expression changes during cyst nematode parasitism revealed by statistical analyses of microarray expression profiles. *Plant Journal*, 33, 5: 911-921
- Pylatuik J.D., Fobert P.R. 2005. Comparison of transcript profiling on Arabidopsis microarray platform technologies. *Plant Molecular Biology*, 58, 5: 609-624
- Qbase. Relative quantification software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. 2005. Ghent, Ghent University Hospital
<http://medgen.ugent.be/qbase/> (8.10.2005): 1 str.
- Quackenbush J. 2002. Microarray data normalization and transformation. *Nature Genetics*, 32 Suppl: s496-s501
- R Development Core Team. 2005. R: A language and environment for statistical computing (version 2.1). Dunaj, R Foundation for Statistical Computing.
<http://www.R-project.org> (2.4.2005): program
- Ramonell K.M., Somerville S. 2002. The genomics parade of defense responses: to infinity and beyond. *Current Opinion in Plant Biology*, 5, 4: 291-294
- Rensink W.A., Buell C.R. 2005. Microarray expression profiling resources for plant genomics. *Trends in Plant Science*, 10, 12: 603-609
- Rensink W.A., Lee Y., Liu J., Iobst S., Ouyang S., Buell C.R. 2005. Comparative analyses of six solanaceous transcriptomes reveal a high degree of sequence conservation and species-specific transcripts. *BMC Genomics*, 6, 124:[1-14],
<http://www.biomedcentral.com/>
- Restrepo S., Myers K.L., del Pozo O., Martin G.B., Hart A.L., Buell C.R., Fry W.E., Smart C.D. 2005. Gene profiling of a compatible interaction between *Phytophthora infestans* and *Solanum tuberosum* suggests a role for carbonic anhydrase. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 18, 9: 913-922
- Reymond P. 2001. DNA microarrays and plant defence. *Plant Physiology and*

Biochemistry, 39, 3-4: 313-321

RNeasy mini handbook. 3rd ed. 2001. Hilden, Qiagen: 116 str.

Ros B., Thummler F., Wenzel G. 2004. Analysis of differentially expressed genes in a susceptible and moderately resistant potato cultivar upon *Phytophthora infestans* infection. *Molecular Plant Pathology*, 5, 3: 191-201

Rovere C.V., del Vas M., Hopp H.E. 2002. RNA-mediated virus resistance. *Current Opinion in Biotechnology*, 13, 2: 167-172

Rushton P.J., Somssich I.E. 1998. Transcriptional control of plant genes responsive to pathogens. *Current Opinion in Plant Biology*, 1: 311-315

Saeed A.I., Sharov V., White J., Li J., Liang W., Bhagabati N., Braisted J., Klapa M., Currier T., Thiagarajan M., Sturn A., Snuffin M., Rezantsev A., Popov D., Ryltsov A., Kostukovich E., Borisovsky I., Liu Z., Vinsavich A., Trush V., Quackenbush J. 2003. TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques*, 34, 2: 374-378

Saunders K., Bedford I.D., Yahara T., Stanley J. 2003. Aetiology: The earliest recorded plant virus disease. *Nature*, 422, 6934: 831

Scheidler M., Schlaich N.L., Fellenberg K., Beissbarth T., Hauser N.C., Vingron M., Slusarenko A.J., Hoheisel J.D. 2002. Monitoring the switch from housekeeping to pathogen defense metabolism in *Arabidopsis thaliana* using cDNA arrays. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 12: 10555-10561

Schena M., Shalon D., Davis R.W., Brown P.O. 1995. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, 270: 467-470

Schenk P.M., Kazan K., Manners J.M., Anderson J.P., Simpson R.S., Wilson I.W., Somerville S.C., Maclean D.J. 2003. Systemic gene expression in *Arabidopsis* during an incompatible interaction with *Alternaria brassicicola*. *Plant Physiology*, 132, 2: 999-1010

Schenk P.M., Kazan K., Wilson I., Anderson J.P., Richmond T., Somerville S.C., Manners J.M. 2000. Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97: 11655-11660

Schmidt D.D., Voelckel C., Hartl M., Schmidt S., Baldwin I.T. 2005. Specificity in ecological interactions: attack from the same lepidopteran herbivore results in species-specific transcriptional responses in two solanaceous host plants. *Plant Physiology*, 138, 3: 1763-1773

Semprimožnik M. 1999. Fotosintetski pigmenti in peroksidaze po okužbi krompirja (*Solanum tuberosum* L.) sorte 'Igor' s krompirjevim virusom Y^{NTN}. Magistrsko delo, Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 100 str.

Senthil G., Liu H., Puram V.G., Clark A., Stromberg A., Goodin M.M. 2005. Specific and common changes in *Nicotiana benthamiana* gene expression in response to infection

- by enveloped viruses. *Journal of General Virology*, 86, Pt 9: 2615-2625
- Shi C., Ingvarsdén C., Thummler F., Melchinger A.E., Wenzel G., Lubberstedt T. 2005. Identification by suppression subtractive hybridization of genes that are differentially expressed between near-isogenic maize lines in association with sugarcane mosaic virus resistance. *Molecular Genetics and Genomics*, 273, 6: 450-461
- Singh M., Singh R.P. 1996. Factors affecting detection of PVY in dormant tubers by reverse transcription polymerase chain reaction and nucleic acid spot hybridization. *Journal of Virological Methods*, 60, 1: 47-57
- Smith C.M., Rodriguez-Buey M., Karlsson J., Campbell M.M. 2004. The response of the poplar transcriptome to wounding and subsequent infection by a viral pathogen. *New Phytologist*, 164, 1: 123-136
- Smith H.A., Swaney S.L., Parks T.D., Wernsman E.A., Dougherty W.G. 1994. Transgenic plant virus resistance mediated by untranslatable sense RNAs: expression, regulation, and fate of nonessential RNAs. *Plant Cell*, 6: 1441-1453
- Smyth G. K. 2005. Limma: linear models for microarray data. V: *Bioinformatics and computational biology solutions using R and Bioconductor*. Gentleman R., Carey V., Dudoit S., Irizarry R., Huber W. (eds.). New York, Springer: 397-420
- Sommich I.E., Hahlbrock K. 1998. Pathogen defence in plants - a paradigm of biological complexity. *Trends in Plant Science*, 3, 3: 86-90
- Soosaar J.L., Burch-Smith T.M., Dinesh-Kumar S.P. 2005. Mechanisms of plant resistance to viruses. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 10: 789-798
- Sree-Vidya C.S., Manoharan M., Lakshmi-Sita G. 1999. Cloning and characterization of salicylic acid-induced, intracellular pathogenesis-related gene from tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Journal of Biosciences*, 24: 287-293
- Ståhlberg A., Hakansson J., Xian X., Semb H., Kubista M. 2004a. Properties of the reverse transcription reaction in mRNA quantification. *Clinical Chemistry*, 50, 3: 509-515
- Ståhlberg A., Kubista M., Pfaffl M. 2004b. Comparison of reverse transcriptases in gene expression analysis. *Clinical Chemistry*, 50, 9: 1678-1680
- Stanič-Racman D., McGeachy K., Reavy B., Štrukelj B., Žel J., Barker H. 2001. Strong resistance to potato tuber necrotic ringspot disease in potato induced by transformation with coat protein gene sequences from an NTN isolate of Potato virus Y. *Annals of Applied Biology*, 139: 269-275
- Stears R.L., Getts R.C., Gullans S.R. 2000. A novel, sensitive detection system for high-density microarrays using dendrimer technology. *Physiological Genomics*, 3, 2: 93-99
- Swift G.H., Peyton M.J., MacDonald R.J. 2000. Assessment of RNA quality by semi-quantitative RT-PCR of multiple regions of a long ubiquitous mRNA. *Biotechniques*, 28, 3: 524-531
- Tacke E., Salamini F., Rohde W. 1996. Genetic engineering of potato for broad-spectrum

- protection against virus infection. *Nature Biotechnology*, 14: 1597-1601
- Talarczyk A., Hennig J. 2001. Early defence responses in plants infected with pathogenic organisms. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 6, 4: 955-970.
- Taylor B.H., Young R.J., Scheuring C.F. 1993. Induction of a proteinase inhibitor II-class gene by auxin in tomato roots. *Plant Molecular Biology*, 23, 5 : 1005-1014
- The Arabidopsis Genome Initiative. 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 408, 6814: 796-815
- TIGR potato gene index database. 2004. Rockville, MD 20850., The Institute for Genomic Research
http://www.tigr.org/tigr-scripts/tgi/T_index.cgi?species=potato (7.12.2005):1 str
- Toplak N., Okršlar V., Stanič-Racman D., Gruden K., Žel J. 2000. A high throughput method for quantifying transgene expression in transformed plants using real-time PCR analysis. *Plant Molecular Biology Reporter*, 22: 237-250
- Tornero P., Gadea J., Conejero V., Vera P. 1997. Two PR-1 genes from tomato are differentially regulated and reveal a novel mode of expression for a pathogenesis-related gene during the hypersensitive response and development. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 10, 5: 624-634
- Urcuqui-Inchima S., Haenni A.L., Bernardi F. 2001 Potyvirus proteins: a wealth of functions. *Virus Research*, 74: 157-175
- van Loon L.C., van Stiren E.A. 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 55, 2: 85-97
- Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paepe A., Speleman F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3, 7: [1-12]
<http://www.pubmedcentral.nih.gov>
- van't Klooster J.W., Vleeshouwers V.G.A.A., Kamoun S., Govers F. Characterization of a cDNA encoding a pathogenesis-related Protein PR-1 from potato (*Solanum tuberosum*) (Accession No. [AJ250136](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AJ250136)). 1999. Rockville, American Society of Plant Biologists
<http://www.tarweed.com/pgr/PGR99-182.html> (2.3.2005): 3 str.
- Vardi E., Sela I., Edelbaum O., Livneh O., Kuznetsova L., Stram Y. 1993. Plants transformed with a cistron of a potato virus Y protease (Nia) are resistant to virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90: 7513-7517
- Vidal S., Cabrera H., Andersson A.R., Fredriksson A., Valkonen P.T.J. 2002. Potato gene Y-1 an N gene homolog that confers cell death upon infection with potato virus Y. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 15, 7: 717-727
- Vranova E., Atichartpongkul S., Villarreal R., Van Montagu M., Inze D., Van Camp W.

2002. Comprehensive analysis of gene expression in *Nicotiana tabacum* leaves acclimated to oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 16: 10870-10875
- Walker N.J. 2002. A technique whose time has come. *Science*, 296: 557-559
- Wan J., Dunning F.M., Bent A.F. 2002. Probing plant-pathogen interactions and downstream defense signaling using DNA microarrays. *Functional and Integrative Genomics*, 2, 6: 259-273
- Wang R., Okamoto M., Xing X., Crawford N.M. 2003. Microarray analysis of the nitrate response in arabidopsis roots and shoots reveals over 1,000 rapidly responding genes and new linkages to glucose, trehalose-6-phosphate, iron, and sulfate metabolism. *Plant Physiology*, 132, 2: 556-567
- Wang W., Vinocur B., Shoseyov O., Altman A. 2004. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in Plant Science*, 9, 5: 244-252
- Waters D.L., Holton T.A., Ablett E.M., Lee L.S., Henry R.J. 2005. cDNA microarray analysis of developing grape (*Vitis vinifera* cv. Shiraz) berry skin. *Functional and Integrative Genomics*, 5, 1: 40-58
- Watkinson J.I., Sioson A.A., Vasquez-Robinet C., Shukla M., Kumar D., Ellis M., Heath L.S., Ramakrishnan N., Chevone B., Watson L.T., van Zyl L., Egertsdotter U., Sederoff R.R., Grene R. 2003. Photosynthetic acclimation is reflected in specific patterns of gene expression in drought-stressed loblolly pine. *Plant Physiology*, 133, 4: 1702-1716
- Whitham S.A., Quan S., Chang H.S., Cooper B., Estes B., Zhu T., Wang X., Hou Y.M. 2003. Diverse RNA viruses elicit the expression of common sets of genes in susceptible *Arabidopsis thaliana* plants. *Plant Journal*, 33, 2: 271-283
- Wong M.L., Medrano J.F. 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*, 39, 1: 75-85
- Wullchleger S.D., Diffazio S.P. 2003. Emerging use of gene expression microarrays in plant physiology. *Comparative and Functional Genomics*, 4, 2: 216-224
- Yamaguchi Y., Yoda H., Akiyama K., Sano H. 2003. Induction of transcripts encoding a novel seven-transmembrane protein during the hypersensitive response to tobacco mosaic virus infection in tobacco plants. *Planta*, 218, 2: 249-253

ZAHVALA

Prva zahvala velja neuradni, pa vendar čisto pravi mentorici dr. Maruši Pompe Novak, za idejno, vsebinsko in metodološko vodstvo, in nenazadnje za iskreno prijateljstvo. Za vso potrebno vzpodbudo in pomoč na vseh področjih priprave doktorskega dela se zahvaljujem mentorici prof. dr. Jani Žel.

Članoma komisije za oceno in zagovor doktorskega dela, prof. dr. Borutu Bohancu in prof. dr. Borutu Štruklju, se zahvaljujem za korektno sodelovanje in koristne pripombe.

Mag. Hani Krečič Stres, hvala za odlično partnerstvo.

Sodelavcem na Oddelku za rastlinsko fiziologijo in biotehnologijo hvala za vzpodbudno in iskrivo okolje. Posebej bi se zahvalila dr. Maji Ravnikar, dr. Maji Kovač in dr. Kristini Gruden za pomoč pri reševanju mnogih strokovnih zagat. Matjažu Hrenu hvala za uspešno skupno oranje ledine na področju bioinformatike in Poloni Kogovšek za spodbudo in pomoč pri uporabi robota.

Zahvala velja tudi zaposlenim na Centru za funkcijsko genomiko Medicinske Fakultete za pomoč pri delu z aparaturami.

Zadnja, a zagotovo ne najmanj pomembna zahvala pa velja družini, ki je z razumevanjem sprejela vse.

PRILOGE

Priloga A: Sonda in začetni oligonukleotidi za PCR v realnem času

Tarčni gen, uporabljene koncentracije cDNA (glede na koncentracijo totRNA ali v primeru luciferaze eksogeno dodano mRNA) ter koncentracije sond (S), smiselnih (F) in protismiselnih (R) začetnih oligonukleotidov.

Appendix A: Probes and primers for real-time PCR analysis

Tagret gen with used cDNA (regarding to totRNA or luc mRNA), probe (S) and primer (F, R) concentrations are shown.

Tarčni gen	Konc. cDNA (tot RNA)	konc. F, P, S (mM)	
CP PVY ^{NTN}	0,8 ng	F:	300
		R:	300
		S:	250
Luc	2 – 20 fg	F:	900
		R:	900
		S:	250
ef-1	0,8 – 8 ng	F:	900
		R:	900
		S:	250
18S	0,8 – 8 pg	F:	300
		R:	300
		S:	250
cat1	0,02 – 0,2 ng	F:	900
		R:	900
		S:	250
puf	0,8 – 8 ng	F:	900
		R:	900
		S:	250
ACCOx	0,02 – 0,2 ng	F:	600
		R:	600
		S:	250
PCPI	8 – 40 ng	F:	900
		R:	900
PI TR8	0,8 – 8 ng	F:	300
		R:	300
Hsp70_1	0,08 – 0,8 ng	F:	900
		R:	900
Hsp70_2	8 – 40 ng	F:	300
		R:	300
Hsp40	0,08 – 0,8 ng	F:	300
		R:	300
Hsp90	0,08 – 0,8 ng	F:	900
		R:	900
sHsp	8 – 40 ng	F:	300
		R:	900
PR-1	0,08 – 0,8 ng	F:	300
		R:	300
PR-10	0,8 – 8 ng	F:	300
		R:	300

Priloga B: Izražanje 9 genov v 13 parih vzorcev krompirja po okužbi s PVY^{NTN}

Prikazan je log₂ razmerja med izražanjem v vzorcu okužene in slepo inokulirane rastline, ugotovljen z metodo PCR v realnem času. Pozitivne vrednosti pomenijo večje, negativne pa manjše izražanje gena v vzorcu okužene rastline.

Appendix B: Expression matrix of 9 genes in 13 pairs of samples of potato leaves after PVY^{NTN} infection. Log₂ ratios between expression in virus and mock inoculated samples, determined by real-time PCR analysis are shown. Positive values mean upregulation and negative downregulation in virus infected samples.

Par/ gen	Igor 30min			Sante 30 min			Igor 12h					Sante 12h		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	5	1	2	3	
Hsp70_1	0,07	0,03	0,43	0,34	0,11	-0,81	0,37	0,21	-0,19	-0,17	-0,02	0,27	1,01	
Hsp70_2	-0,57	0,29	0,29	-0,39	0,81	-0,24	0,27	0,51	1,19	-0,52	0,20	0,09	0,40	
Hsp40	0,46	-0,06	0,51	0,42	-0,61	-0,65	0,34	-0,29	0,74	0,54	0,12	0,30	1,38	
Hsp90	-0,01	0,09	0,54	0,14	0,37	-0,78	0,63	0,34	-0,46	-0,08	-0,09	-0,02	1,01	
sHsp	-0,04	0,31	1,02	-0,40	0,64	-0,26	1,23	0,15	0,91	0,71	-0,05	0,61	1,06	
PR-1	-0,26	0,88	0,15	-0,24	-0,79	-0,10	-0,83	0,92	0,99	-0,82	-0,28	0,20	-1,35	
PR-10	-0,03	0,84	1,15	-0,37	0,69	0,46	0,83	-0,90	1,07	0,87	-0,26	0,01	0,60	
PI TR8	1,80	0,00	0,90	0,51	1,02	-0,67	-0,55	1,66	-0,61	0,36	-1,72	1,77	-1,15	
PCPI	-0,20	-0,36	0,64	0,06	-1,33	0,35	-1,89	3,59	1,05	-1,47	-2,45	1,74	-1,90	