

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
INTERDISCIPLINARNI PODIPLOMSKI ŠTUDIJ  
BIOTEHNOLOGIJE

Nataša TOPLAK

**PREUČEVANJE MOLEKULARNIH MEHANIZMOV ODPORNOSTI  
PROTI VIRUSU PVY<sup>NTN</sup> V GENSKO SPREMENJENIH RASTLINAH  
KROMPIRJA (*Solanum tuberosum* L.) SORTE 'IGOR'**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**STUDY OF MOLECULAR MECHANISMS OF RESISTANCE  
AGAINST THE VIRUS PVY<sup>NTN</sup> IN GENETICALLY MODIFIED  
PLANTS OF POTATO (*Solanum tuberosum* L.) cv. IGOR**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana 2006

Doktorska disertacija je zaključek doktorskega dela s področja biotehnologije. Doktorsko delo je bilo opravljeno na Oddelku za rastlinsko fiziologijo in biotehnologijo Nacionalnega inštituta za biologijo v Ljubljani, del določanja nukleotidnega zaporedja virusa PVY<sup>NTN</sup>-NIB na Scottish Crop Research Institute, Dundee, v Veliki Britaniji in določanje kratkih molekul RNA na Ghent University, Department of Plant Systems Biology, Zwijnaarde, v Belgiji.

Senat Univerze v Ljubljani je dne 15.2.2004 za mentorico imenoval prof. dr. Jana Žel in za somentorico doc. dr. Kristino Gruden.

Mentorica: prof. dr. Jana Žel

Somentorica: doc. dr. Kristina Gruden

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Borut Bohanec

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Članica: prof. dr. Jana Žel

Ljubljana, Nacionalni inštitut za biologijo

Članica: doc. dr. Kristina Gruden

Ljubljana, Nacionalni inštitut za biologijo

Član: prof. dr. Borut Štrukelj

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo

Datum zagovora: 27. 3. 2006

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Doktorandka: Nataša Toplak

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dd
- DK UDK 581.15:578.5:577.2.08:633.491(043)=863
- KG krompir/*Solanum tuberosum*/gensko spremenjene rastline/GSO/rastlinski virusi/*Potiviridae*/PVY<sup>NTN</sup>/mehanizem utišanja genov/kvantitativni PCR v realnem času /Q-PCR/cDNA mikromreže/gensko izražanje
- AV TOPLAK, Nataša, univ. dipl. biol.
- SA ŽEL, Jana (mentorica)/GRUDEN, Kristina (somentorica)
- KZ Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana, Slovenija
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni podiplomski študij biotehnologije
- LI 2006
- IN PREUČEVANJE MOLEKULARNIH MEHANIZMOV ODPORNOSTI PROTI VIRUSU PVY<sup>NTN</sup> V GENSKO SPREMENJENIH RASTLINAH KROMPIRJA (*Solanum tuberosum L.*) SORTE 'IGOR'
- TD doktorska disertacija
- OP XVII, 194 str., 20 pregl., 36 sl., 199 vir.
- IJ sl
- JL sl/en
- AI Krompirjev virus Y je splošno razširjen virus krompirja. Eden izmed izolatov PVY je tudi PVY<sup>NTN</sup>, ki povzroča obročkasto nekrozo gomoljev krompirja (PTNRD) (potato tuber necrotic ringspot disease). Krompirjeva sorta 'Igor' je izredno občutljiva na okužbo s PVY<sup>NTN</sup>. PVY je genetsko variabilen virus in zato zanimiv za študije evolucijskih sprememb v genomu ter nadaljnje povezave z biološko funkcijo. Določili smo celotno nukleotidno zaporedje slovenskega izolata PVY<sup>NTN</sup>-NIB in ga primerjali z ostalimi objavljenimi zaporedji genomov izolatov PVY. Na transgenih rastlinah krompirja sorte 'Igor', ki so imele vnesen transgen za plaščni protein virusa PVY<sup>NTN</sup>, smo vzpostavili kvantitativno metodo verižnega pomnoževanja s polimerazo v realnem času (Q-PCR) primerno za analizo izražanja transgena. Uspešnost vpeljane metode je bila potrjena tudi na transformiranih rastlinah tobaka. V predhodnih študijah so nekatere izmed transgenih linij krompirja kazale odpornost na okužbo s PVY<sup>NTN</sup> in kot tip mehanizma rezistence je bil predlagan mehanizem utišanja genov oziroma z RNA posredovana rezistence. Izražanje genov vpletenih v ta mehanizem (SDE3, SGS3 in AGO1) smo preučili z metodo Q-PCR. Z novo tehnologijo cDNA mikromrež smo preučili spremembe v profilu izražanja 10 000 genov pri občutljivih in rezistentnih transgenih linijah krompirja.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Dd  
 DC UDK 581.15:578.5:577.2.08:633.491(043)=863  
 CX potato/*Solanum tuberosum*/transgenic plants/GMO/plant viruses/*Potiviridae*/PVY<sup>NTN</sup>/gene silencing/quantitative real-time PCR/Q-PCR/cDNA microarrays/gene expression  
 AU TOPLAK, Nataša  
 AA ŽEL, Jana (supervisor)/GRUDEN, Kristina (co-advisor)  
 PP Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana, Slovenija  
 PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdisciplinary Postgraduate Study in Biotechnology  
 PY 2006  
 TI STUDY OF MOLECULAR MECHANISMS OF RESISTANCE AGAINST THE VIRUS PVY<sup>NTN</sup> IN GENETICALLY MODIFIED PLANTS OF POTATO (*Solanum tuberosum* L.) cv. IGOR  
 DT doctoral dissertation  
 NO XVII, 194 p., 20 tab., 36 fig., 199 ref.  
 LA sl  
 AL sl/en  
 AB Potato virus Y (PVY) (*Potyvirus*, *Potyviridae*) is one of the most common viruses found in potato. Slovenian potato cultivar Igor is extremely susceptible to infection with PVY<sup>NTN</sup> strains of PVY causing potato tuber necrotic ringspot disease (PTNRD). PVY has been found to be genetically variable. Therefore, it is interesting object to study the aspect of genome evolution in relation to its biological properties. In the course of our research work we have determined a sequence of genomic RNA of PVY<sup>NTN</sup>-NIB. A comparison of genome sequence between PVY<sup>NTN</sup>-NIB and the available sequences of other PVY isolates was performed. We have introduced the real-time PCR method for quantitative determination of transgene expression level in transgenic potato plants which were in previous studies transformed with transgenes that contained coat protein gene sequence of PVY<sup>NTN</sup>. The general applicability of the designed assay was confirmed on transgenic tobacco plants. In previous studies some of transgenic potato lines exhibited resistance to PVY infection. The gene silencing was proposed as resistance mechanism. Q-PCR method was used as a method for studying the expression of genes (SDE3, SGS3 and AGO1) involved in this mechanism. Gene expression profiling using new technology of cDNA microarrays was used to investigate the changes in gene expression in sensitive and resistant transgenic lines in a more general way.

## KAZALO VSEBINE

<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....</b>	<b>XII</b>
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 HIPOTEZE IN CILJI DOKTORSKE NALOGE .....	3
<b>2 PREGLED OBJAV.....</b>	<b>4</b>
2.1 SPLOŠNO O KROMPIRJU.....	4
2.1.1 KROMPIR SORTE 'IGOR' .....	5
2.2 KROMPIRJEV VIRUS Y (PVY).....	6
2.2.1 ORGANIZACIJA GENOMA PVY .....	8
2.2.2 VIRUSNI PROTEINI RODU POTIVIRUSOV IN NJIHOVA VLOGA .....	9
2.2.3 KLASIFIKACIJA PVY .....	13
2.2.4 KROMPIRJEV VIRUS Y <sup>NTN</sup> (PVY <sup>NTN</sup> ).....	14
2.2.5 VARIABILNOST GENOMA PVY.....	14
2.2.6 SPECIFIČNO DOLOČANJE PVY <sup>NTN</sup> .....	17
2.3 ZAŠČITA PRED OKUŽBO Z VIRUSOM PVY .....	20
2.4 OBRAMBNI MEHANIZMI RASTLINE PROTI VIRUSOM .....	20
2.4.1 MEHANIZEM Z RNA POSREDOVANE REZISTENCE ALI UTIŠANJE GENOV... .....	21
2.4.1.1 Post-transkripcjsko utišanje genov (PTGS) .....	22
2.4.1.1.1 Rastlinska od RNA odvisna RNA polimeraza (RdRP).....	25
2.4.1.1.2 DICER-podobni (DICER-Like) rastlinski proteini in nastanek molekul siRNA .....	27
2.4.1.1.3 RISC in argonaut proteini .....	28
2.4.1.1.4 Virusni supresorji mehanizma utišanja genov .....	29
2.4.1.1.5 Pomen mehanizma utišanja genov .....	30
2.4.1.1.6 Dokazovanje prisotnosti kratkih siRNA molekul .....	30
2.4.1.2 MEHANIZMI NARAVNE ODPORNOSTI PROTI PVY .....	31
2.4.1.3 Z VНОСОМ TRANSGENOV POSREDOVANA ODPORNOST .....	31
2.4.1.4 METODE ZA ŠTUDIJ IZRAŽANJA GENOV IN TRANSGENOV .....	33
2.7.1 KVANTITATIVNO POMNOŽEVANJE S POLIMERAZO V REALNEM ČASU .....	35
2.7.1.1 Nespecifična detekcija nastalih produktov PCR .....	36
2.7.1.2 Specifična detekcija nastalih produktov PCR .....	37
2.7.2 UPORABA MIKROMREŽ .....	39
<b>3 MATERIALI IN METODE .....</b>	<b>42</b>
3.1 MATERIALI .....	43
3.1.1 VIRUSI .....	43
3.1.1.1 VIRUSNI IZOLAT PVY <sup>NTN</sup> -NIB .....	43
3.1.2 RASTLINSKI MATERIAL .....	43
3.1.2.1 <i>Solanum tuberosum L.</i> sorta 'Igor' .....	43
3.1.2.2 <i>Nicotiana tabacum L.</i> sorta 'Samsun' .....	44
3.1.3 BAKTERIJE .....	45
3.1.3.1 Bakterija <i>Escherichia coli</i> .....	45
3.1.4 OLIGONUKLEOTIDNI ZАČETNIKI .....	45
3.1.4.1 Oligonukleotidni začetniki - določanje nukleotidnega zaporedja genoma PVY <sup>NTN</sup> -NIB.....	45
3.1.4.2 Univerzalni oligonukleotidni začetniki .....	49
3.1.4.3 Oligonukleotidni začetniki - določanje izražanja transgena in zunanje kontrole luciferaze.....	50

3.1.4.4	Oligonukleotidni začetniki - določanje izražanja genov vključenih v mehanizem utišanja genov	51
3.1.4.5	Oligonukleotidni začetniki - pomnoževanje gena za plaščni protein virusa PVY <sup>NTN</sup>	52
3.1.5	<b>PLAZMIDI</b>	52
3.1.6	<b>GOJIŠČA</b>	52
3.1.6.1	Bakterijska gojišča	52
3.1.6.2	Gojišča za rastlinski material	53
3.1.7	<b>STERILNA ZEMLJA</b>	54
3.1.8	<b>RASTNI POGOJI</b>	54
3.1.9	<b>MIKROMREŽE</b>	54
3.2	<b>METODE</b>	55
3.2.1	<b>DELO S TESTNIMI RASTLINAMI</b>	55
3.2.1.1	Priprava testnih rastlin	55
3.2.1.1.1	Netransgene in transgene rastline <i>N. tabacum L.</i> sorte 'Samsun'	56
3.2.1.1.2	Netransgene in transgene rastline <i>S. tuberosum L.</i> sorte 'Igor'	57
3.2.1.2	Mehanska inokulacija rastlin	59
3.2.1.2.1	Priprava inokuluma	59
3.2.1.2.2	Inokulacija rastlin	60
3.2.1.3	DAS ELISA	61
3.2.2	<b>SERIJE POIZKUSOV</b>	62
3.2.3	<b>IZOLACIJA IN ANALIZA RNA</b>	64
3.2.3.1	Izolacija RNA	64
3.2.3.1.1	Izolacija s kompletom kemikalij RNeasy Plant Mini kit (Qiagen)	64
3.2.3.1.2	Izolacija celokupne RNA z reagentom TRIzol®	66
3.2.3.1.3	Izolacija kratkih molekul RNA	67
3.2.3.2	Preverjanje integritete, velikosti in količine izoliranih nukleinskih kislin	68
3.2.3.2.1	Preverjanje integritete celokupne RNA in produktov PCR na agaroznem gelu	68
3.2.3.2.2	Preverjanje produktov PCR na poliakrilamidnem gelu	70
3.2.3.2.3	Preverjanje koncentracije celokupne RNA z barvilm RiboGreen®	70
3.2.3.2.4	Preverjanje koncentracije z inštrumentom Agilent 2100 Bioanalyzer	71
3.2.3.2.5	Preverjanje koncentracije z inštrumentom NanoDrop 1000	71
3.2.4	<b>KLONIRANJE IN DOLOČANJE NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA</b>	71
3.2.4.1	Reverzna transkripcija (sinteza cDNA) s specifičnimi oligonukleotidnimi začetniki	71
3.2.4.2	Izolacija produktov RT-PCR iz agaroznega gela	73
3.2.4.3	Vstavitev produkta RT-PCR v plazmidni vektor	73
3.2.4.3.1	Transformacija bakterij in selekcija transformant	74
3.2.4.3.2	PCR reakcija za preverjanje uspešnosti insercije produkta RT-PCR v plazmid	74
3.2.4.3.3	Izolacija plazmida z vstavljenim produkтом RT-PCR in sekveniranje	75
3.2.4.4	Določanje nukleotidnega zaporedja	75
3.2.4.4.1.1	Sekvenčna reakcija	75
3.2.4.4.2	Čiščenje DNA po sekvenčni reakciji	76
3.2.4.4.3	Kapilarna elektroforeza	76
3.2.4.4.4	Analiza nukleotidnih zaporedij	76
3.2.5	<b>DOLOČANJE IZRAŽANJA GENOV Z RAZLIČNIMI IZVEDBAMI PCR REAKCIJE</b>	77
3.2.5.1	Razgradnja genomske DNA oziroma tretiranje z DNaza I	77
3.2.5.2	Reverzna transkripcija z nespecifičnimi naključnimi oligonukleotidnimi začetniki	78
3.2.5.3	Načrtovanje oligonukleotidnih začetnikov	79

3.2.5.4	Semi-kvantitativni PCR .....	80
3.2.5.5	Kvantitativni PCR v realnem času (Q-PCR).....	81
3.2.5.5.1	Analiza podatkov Q-PCR .....	83
<b>3.2.6</b>	<b>DOLOČANJE IZRAŽANJA GENOV V TRANSFORMIRANIH RASTLINAH KROMPIRJA S cDNA MIKROMREŽAMI.....</b>	<b>85</b>
3.2.6.1	Hibridizacija krompirjeve cDNA mikromrež .....	86
3.2.6.2	Analiza podatkov cDNA mikromrež .....	90
<b>3.2.7</b>	<b>DOLOČANJE PRISOTNOSTI siRNA MOLEKUL V TRANSFORMIRANIH RASTLINAH KROMPIRJA .....</b>	<b>93</b>
3.2.7.1	Detekcija siRNA z radioaktivnim označevanjem .....	93
<b>3.3</b>	<b>VARNO DELO Z GENSKO SPREMENJENIMI ORGANIZMI .....</b>	<b>97</b>
3.3.1	<b>DELO S TRANSGENIMI BAKTERIJAMI .....</b>	<b>97</b>
3.3.2	<b>DELO S TRANSGENIMI RASTLINAMI .....</b>	<b>97</b>
<b>4</b>	<b>REZULTATI.....</b>	<b>98</b>
4.1	<b>DOLOČANJE NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA GENOMA VIRUSA PVY<sup>NTN</sup>-NIB .....</b>	<b>98</b>
4.1.1	<b>KLONIRANJE GENOMA VIRUSA PVY<sup>NTN</sup>-NIB .....</b>	<b>98</b>
4.1.2	<b>SEKVENIRANJE PRIDOBLEJENIH FRAGMENTOV RT-PCR .....</b>	<b>103</b>
4.1.3	<b>ANALIZA PRIDOBLEJENIH SEKVENC.....</b>	<b>105</b>
4.2	<b>DOLOČEVANJE IZRAŽANJA TRANSGENA .....</b>	<b>117</b>
4.2.1	<b>IZOLACIJA CELOKUPNE RNA.....</b>	<b>117</b>
4.2.2	<b>ANALIZA IZRAŽANJA TRANSGENA.....</b>	<b>118</b>
4.2.2.1	Semi-kvantitativni RT-PCR.....	118
4.2.2.2	Q-PCR .....	120
4.3	<b>UGOTAVLJANJE MEHANIZMOV UTIŠANJA GENOV.....</b>	<b>125</b>
4.3.1	<b>ANALIZA KVALITETE IZOLIRANE RNA .....</b>	<b>125</b>
4.3.2	<b>Q-PCR.....</b>	<b>127</b>
4.3.2.1	Preverjanje inhibicije v reakciji reverzne transkripcije.....	127
4.3.2.2	Načrtovanje oligonukleotidnih začetnikov.....	128
4.3.2.3	Preverjanje specifičnosti in učinkovitosti načrtovanih amplikonov .....	128
4.3.3	<b>KROMPIRJEVE TIGR cDNA MIKROMREŽE .....</b>	<b>133</b>
4.3.3.1	Hibridizacija krompirjevih cDNA mikromrež.....	133
4.3.3.2	Analiza cDNA mikromrež .....	136
4.3.4	<b>DOKAZOVANJE PRISOTNOSTI siRNA MOLEKUL .....</b>	<b>149</b>
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI.....</b>	<b>152</b>
5.1	<b>RAZPRAVA .....</b>	<b>152</b>
5.1.1	<b>DOLOČANJE NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA VIRUSA PVY<sup>NTN</sup>-NIB .....</b>	<b>152</b>
5.1.2	<b>DOLOČANJE IZRAŽANJA TRANSGENA .....</b>	<b>156</b>
5.1.3	<b>MEHANIZEM UTIŠANJA GENOV .....</b>	<b>160</b>
5.2	<b>SKLEPI .....</b>	<b>169</b>
<b>6</b>	<b>POVZETEK (SUMMARY).....</b>	<b>171</b>
6.1	<b>POVZETEK .....</b>	<b>171</b>
6.2	<b>SUMMARY .....</b>	<b>173</b>
<b>7</b>	<b>VIRI.....</b>	<b>175</b>
<b>ZAHVALA .....</b>		<b>1</b>

## KAZALO SLIK

Slika 1: Organizacija potivirusnega genoma (Urcuqui-Inchima in sod., 2001).....	9
Slika 2: Model mehanizma utišanja genov pri rastlinah (Silhavy in Burgýán, 2004).....	24
Slika 3: Model RNA utišanja, kot odgovor rastline na virusno okužbo (Voinnet, 2001) .....	26
Slika 4a in 4b: Način detekcije v Q-PCR reakcijah.....	39
Slika 5: Model tehnologije mikromrež (Bruvoll, 2006).....	41
Slika 6: Shema eksperimentalnega dela. ....	42
Slika 7: Blok genov, ki je bil vnesen v <i>A. tumefaciens</i> , s katerim so transformirali rastline krompirja ali tobaka (Stanič-Racman in sod., 1999).....	44
Slika 8: Razvoj bolezenskih znamenj po okužbi tobaka sorte 'Samsun' z virusom PVY <sup>NTN</sup> . ....	98
Slika 9: Elektroforeza produktov RT-PCR za določanje nukleotidnega zaporedja virusa PVY <sup>NTN</sup> -NIB. ....	99
Slika 10: Analiza rekombinacijskih plazmidov.....	104
Slika 11: Elektroforeza plazmidov pGEM-T z vstavljenim fragmentom RT-PCR.....	104
Slika 12: Nukleotidno zaporedje virusa PVY <sup>NTN</sup> -NIB (AJ585342).....	107
Slika 13: Aminokislinsko zaporedje predvidenega poliproteina virusa PVY <sup>NTN</sup> -NIB (CAE51230). ....	108
Slika 14: Filogenetsko drevo ORF. ....	112
Slika 15: Shematski prikaz genomov štirih različnih PVY izolatov (PVY <sup>NTN</sup> -NIB, PVY <sup>NTN</sup> -H, PVY-N605, PVY <sup>O</sup> -139). ....	112
Slika 16: Filogenetsko drevo gena, ki kodira protein Hc-Pro. ....	113
Slika 17: Filogenetsko drevo gena, ki kodira protein P3.....	114
Slika 18: Filogenetsko drevo gena, ki kodira protein NIa.....	114
Slika 19: Filogenetsko drevo poliproteina PVY.....	115
Slika 20: Shematski prikaz poliproteina štirih različnih PVY izolatov (PVY <sup>NTN</sup> -NIB, PVY <sup>NTN</sup> -H, PVY-N605, PVY <sup>O</sup> -139). ....	116
Slika 21: Izolacija celokupne RNA transgenih rastlin krompirja.....	117
Slika 22: Elektroforeza produktov PCR transgena CP (semi-kvantitativni RT-PCR). ....	119
Slika 23: Logaritemski prikaz pomnoževanja transgena CP.....	121
Slika 24a in 24b: Relativno izražanje transgena CP v transgenih rastlinah krompirja (a) in transgenih rastlinah tobaka (b). ....	124
Slika 25a in 25b: Določanje koncentracije in integritete celokupne RNA z instrumentom Agilent 2100 Bioanalyzer.....	126
Slika 26a, 26b in 26c: Disociacijske krivulje amplikonov AGO1, SDE3 in SGS3. ....	129

Slika 27: Elektroforeza produktov PCR na poliakrilamidnem gelu (AGO1, SDE3 in SGS3) .....	130
Slika 28: Relativno izražanje genov AGO1, SDE3 in SGS3 v časovnih točkah vzorčenja 4, 8, 12 in 24 ur po okužbi z virusom za posamezne transgene linije (34, 35, 16, 29 in K (netransgeno kontrolo)) s Q-PCR metodo .....	132
Slika 29a in 29b: Krompirjeva TIGR cDNA mikromreža. ....	136
Slika 30a in 30b: Normalizacija podatkov krompirjevih cDNA mikromrež.....	138
Slika 31a in 31b: Normalizacija podatkov cDNA mikromreže s kodo 12901287. ....	139
Slika 32: Toplotni grafi značilno izraženih genov po testu ANOVA, katerih ocena verjetnosti p (p-vrednost) je manjša od 0.01. ....	147
Slika 33: Shematski prikaz značilno različno izraženih genov povezanih z biološko funkcijo v celici. ....	148
Slika 34: Elektroforeza produkta PCR transgena CP. ....	149
Slika 35a in 35b: (a) odtis celotne RNA na membrani obarvani z EtBr. (b) kratke molekule RNA, hibridizirane z radioaktivno označeno sondjo (produkt PCR CP PVY <sup>NTN</sup> )....	151
Slika 36: Primerjava s Q-PCR ali s cDNA mikromrežami detektirane ekspresije genov AGO1, SDE3 in SGS3, prikazana v obliki toplotnega grafa.....	164

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Uporabljeni oligonukleotidni začetniki v RT-PCR reakcijah in sekvenčnih reakcijah z namenom določanja nukleotidnega zaporedja slovenskega izolata PVY <sup>NTN</sup> -NIB.....	46
Preglednica 2: Univerzalni oligonukleotidni začetniki .....	49
Preglednica 3: Sonde in oligonukleotidni začetniki uporabljeni v Q-PCR reakcijah za določanje ekspresije transgena CP in zunanje kontrole <i>luciferaze</i> .....	50
Preglednica 4: Oligonukleotidni začetniki uporabljeni v Q-PCR reakcijah za določanje ekspresije genov vključenih v mehanizem utišanja genov.....	51
Preglednica 5: Transgene linije tobaka.....	56
Preglednica 6: Transgene linije krompirja.....	58
Preglednica 7: Transgene linije krompirja.....	59
Preglednica 8: Rezultati pomnoževanja genoma PVY <sup>NTN</sup> -NIB z različnimi kombinacijami oligonukleotidnih začetnikov z RT-PCR metodo.....	100
Preglednica 9: Objavljena nukleotidna in aminokislinska zaporedja celotnega genoma različnih virusov PVY.....	109
Preglednica 10: Primerjava nukleotidnega in aminokislinskega zaporedja virusa PVY <sup>NTN</sup> -NIB z ostalimi objavljenimi nukleotidnimi zaporedji virusov PVY.....	110
Preglednica 11: Primerjava nukleotidnega in aminokislinskega zaporedja virusov PVY <sup>NTN</sup> -NIB, NA-PVY <sup>NTN</sup> Tu 660, NA-PVY <sup>N</sup> N-Jg, PVY <sup>NTN</sup> -H, PVY <sup>O</sup> -139 in PVY-N605.....	111
Preglednica 12: Določanje mRNA transgena CP v transgenih linijah krompirja s semi-kvantitativno RT-PCR metodo .....	120
Preglednica 13: Določanje ekspresije transgena CP s Q-PCR metodo v transgenih linijah krompirja in tobaka.....	123
Preglednica 14: Preverjanje inhibicije v reakcijah reverzne transkripcije z zunanjim controlo <i>luc</i> v serijah IV, VI in VII.....	127
Preglednica 15: Primerjava teoretično izračunane temperature taljenja (Tm) produkta PCR z eksperimentalno dobljeno temperaturo.....	129
Preglednica 16: Povprečna učinkovitost pomnoževanja Q-PCR reakcije za amplikon AGO1, SDE3 in SGS3.....	130
Preglednica 17: Načrt poizkusa hibridizacij cDNA mikromrež.....	134
Preglednica 18: Število analiziranih točk na posamezni cDNA mikromreži, ki so imele primerno kvaliteto za nadaljnjo obdelavo v programskem okolju R.....	137
Preglednica 19: Število značilno različno izraženih genov po analizi variance (Model 1 in Model 2) glede na p-vrednost.....	140
Preglednica 20: Primerjava pozitivnih rezultatov analize ekspresije transgena v transgenih linijah krompirja z različnimi metodami (northern prenosom, semi-kvantitativen RT-	

PCR in Q-PCR) .....	156
---------------------	-----

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

18S	18 S rRNA
Amp	ampicilin
A <sub>št.</sub>	absorbanca <sub>valovna dolžina v nm</sub>
ATP	adenozin tri fosfat
bp	bazni par
BSA	goveji serumski albumin (bovine serum albumin)
BFB	bromfenol modro (bromo phenol blue)
CaMV	virus mozaika cvetače ( <i>Cauliflower mosaic virus</i> )
cDNA	komplementarna DNA (complementary DNA)
CMV	virus mozaika kumar ( <i>Cucumber mosaic virus</i> )
CP	plaščni protein (coat protein)
cpm	število udarcev na minuto, ki jih zazna števec za merjenje radioaktivnosti (counts per minute)
Cy3	fluorescentno barvilo (Cyanine3)
Cy5	fluorescentno barvilo (Cyanine5)
ddH <sub>2</sub> O	deionizirana in destilirana voda
Da	dalton; enota za molekulsko maso, ki ustreza 1/12 mase čistega izotopa <sup>12</sup> C
DAS ELISA	dvojni sendvič ELISA
DEPC	dietil pirokarbonat
DNA	deoksiribonukleinska kislina
DNaza	deoksiribonukleaza
dNTP	2'-deoksinukleozid trifosfat
DR	delno rezistenten

dsDNA	dvovertična DNA (double-stranded DNA)
dsRNA	dvovertična RNA (double-stranded RNA)
DTT	ditiotreitol (treo-1,4-dimerkapto-2,3-butandiol)
E	učinkovitost (efficiency)
EDTA	etilendiaminotetraocetna kislina
ELISA	encimsko imunska metoda (enzyme-linked immunosorbent assay)
ER	ekstremna rezistenza
EtOH	etanol
FS-CP	gen za plaščni protein z zamknjenim odprtim bralnim okvirjem, ki producira nesmiseln protein
g	rcf (relative centrifugal force)
G	modificiran signal barvila Cy3
Gf	signal barvila Cy3
Gb	signal ozadja barvila Cy3
HR	hipersenzitivna rezistenza
IPTG	izopropil-β-D-tiogalaktopyranozid
INSV	virus nekrotične pegavosti vodenke ( <i>Impatiens necrotic spot virus</i> )
<i>luc</i>	luciferaza ( <i>luciferase</i> )
<i>kb</i>	tisoč baznih parov (kilo bases)
kDa	kilodalton
M	molarnost, mol/l
M <sub>r</sub>	relativna molekulska masa (brez enote)
mRNA	informacijska RNA (messenger RNA)
MS	Murashige in Skoog gojišče
NOS	nopalinska sintazni (pro.-promotor; ter.-terminator)

O	občutljiv
pGEM-T	plazmid (Invitrogen, ZDA)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (polymerase chain reaction)
pH	negativni logaritem koncentracije vodikovih ionov
PLRV	virus zvijanja krompirjevih listov ( <i>Potato leafroll virus</i> )
pNPP	para-nitrofenilfosfat
PPV	virus šarke ( <i>Plum pox virus</i> )
PTGS	post-transkripcijsko utišanje genov
PTNRD	obročasta nekroza gomoljev krompirja
PVA	krompirjev virus A ( <i>Potato A virus</i> )
PVV	krompirjev virus V ( <i>Potato V virus</i> )
PVP	polivinil pirolidon
PVX	krompirjev virus X ( <i>Potato X virus</i> )
PVY	krompirjev virus Y ( <i>Potato Y virus</i> )
PVY <sup>C</sup>	krompirjev virus Y <sup>C</sup> ( <i>Potato Y<sup>C</sup> virus</i> )
PVY <sup>O</sup>	krompirjev virus Y <sup>O</sup> ( <i>Potato Y<sup>O</sup> virus</i> )
PVY <sup>N</sup>	krompirjev virus Y <sup>N</sup> ( <i>Potato Y<sup>N</sup> virus</i> )
PVY <sup>NTN</sup>	krompirjev virus Y <sup>NTN</sup> ( <i>Potato Y<sup>NTN</sup> virus</i> ), nekrotičen različek PVY, povzročitelj PTNRD
RFLP	polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov (restriction fragment length polymorphism)
R	rezistenten ali modificiran signal barvila Cy5
RdRP	od RNA odvisna RNA polimeraza
Rf	signal barvila Cy5
Rb	signal ozadja barvila Cy5

rRNA	ribosomska ribonukleinska kislina
RNA	ribonukleinska kislina
RNaza	ribonukleaza
RT	reverzna transkripcija, sinteza cDNA (reverse transcription)
RT-PCR	obratna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo
S-CP	smiselna oblika gena za plaščni protein
SD	standardna deviacija (standard deviation)
SDS	natrijev dodecil sulfat
siRNA	majhna vpletena RNA molekula (small interfering RNA)
SSC	raztopina natrijevega klorida in natrijevega citrata
ss ali ds TCP	(transcript conformation polymorphism)
SYNV	virus rumene mrežavosti škrbinke ( <i>Sonchus yellow net virus</i> )
TAE	raztopina Trisa, acetata in EDTA
TAS ELISA	trojni sendvič ELISA (triple antibody sandwich ELISA)
TBE	raztopina Trisa, borata in EDTA
TBSV	virus razraščanja in pritlikavosti paradižnika ( <i>Tomato bushy stunt virus</i> )
TC	skupno zaporedje (tentative consensus sequence)
TE	raztopina Trisa in EDTA
TEV	virus jedkanja tobaka ( <i>Tobacco etch virus</i> )
TGS	transkripcijsko utišanje genov (transcriptional gene silencing)
Ti-plazmid	plazmid bakterije <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
Tm	temperatura taljenja (melting temperature)
TMV	virus mozaika tobaka ( <i>Tobacco mosaic virus</i> )
Tris	2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiol
TVMV	virus žilne marogavosti tobaka ( <i>Tobacco vein mottling virus</i> )
UMM	(universal master mix)

UV <sub>312</sub>	ultravijolična svetloba valovne dolžine 312 nm
YEB	tekoče gojišče s kvasnim ekstraktom (Yeast Extract Broth)
x-gal	5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-galaktopiranozid
XC	ksilen cianol (Xylene cyanol)
Q-PCR	verižna reakcija s polimerazo v realnem času (real-time polymerase chain reaction)

### **Okrajšave imen aminokislin**

<i>Ala</i>	<i>A</i>	<i>alanin</i>
<i>Arg</i>	<i>R</i>	<i>arginin</i>
<i>Asn</i>	<i>N</i>	<i>asparagin</i>
<i>Asp</i>	<i>D</i>	<i>asparaginska kislina</i>
<i>Cys</i>	<i>C</i>	<i>cistein</i>
<i>Phe</i>	<i>F</i>	<i>fenilalanin</i>
<i>Gly</i>	<i>G</i>	<i>glicin</i>
<i>Gln</i>	<i>Q</i>	<i>glutamin</i>
<i>Glu</i>	<i>E</i>	<i>glutaminska kislina</i>
<i>His</i>	<i>H</i>	<i>histidin</i>
<i>Ile</i>	<i>I</i>	<i>izolevcin</i>
<i>Leu</i>	<i>L</i>	<i>levcin</i>
<i>Lys</i>	<i>K</i>	<i>lizin</i>
<i>Met</i>	<i>M</i>	<i>metionin</i>
<i>Pro</i>	<i>P</i>	<i>prolin</i>
<i>Ser</i>	<i>S</i>	<i>serin</i>
<i>Tyr</i>	<i>Y</i>	<i>tirozin</i>
<i>Thr</i>	<i>T</i>	<i>treonin</i>
<i>Trp</i>	<i>W</i>	<i>tryptofan</i>
<i>Val</i>	<i>V</i>	<i>valin</i>

### **Standardne kratice za nukleotide**

<b>A</b>	<i>adenin</i>		<b>K</b>	<i>G ali T</i>
<b>C</b>	<i>citozin</i>		<b>S</b>	<i>G ali C</i>
<b>G</b>	<i>gvanin</i>		<b>W</b>	<i>A ali T</i>
<b>T</b>	<i>timin</i>		<b>H</b>	<i>A ali C ali T</i>
<b>U</b>	<i>uracil</i>		<b>B</b>	<i>G ali T ali C</i>
<b>R</b>	<i>G ali A</i>		<b>V</b>	<i>G ali C ali A</i>
<b>Y</b>	<i>C ali T</i>		<b>D</b>	<i>G ali A ali T</i>
<b>M</b>	<i>A ali C</i>		<b>N</b>	<i>A, C, G ali T</i>

## 1 UVOD

Krompirjev virus Y<sup>NTN</sup> (PVY<sup>NTN</sup>), eden izmed različkov krompirjevega virusa PVY, je povzročitelj bolezni imenovane obročkasta nekroza gomoljev krompirja (potato tuber necrotic ringspot disease - PTNRD). PVY<sup>NTN</sup> zmanjšuje pridelek krompirja bolj kot ostali različki virusa PVY<sup>N</sup>, pri občutljivih sortah pa vpliva tudi na kakovost gomoljev. V Sloveniji so ga v večjem obsegu opazili leta 1988 in v treh letih (1989-1991) je izrinil iz pridelave našo najbolj priljubljeno in najbolj razširjeno sorto krompirja 'Igor' (Kus, 1994).

Kontrola te in drugih virusnih bolezni tradicionalno temelji na požlahtnjitvi proti virusom odpornih sort. S sodobnimi biotehnoškimi metodami (kloniranja) lahko vnesemo v občutljive sorte gene, odgovorne za odpornost. Po izvoru se geni, ki jih vnašamo s pomočjo sodobnih biotehnoških metod, delijo na virusne gene (npr. gen za plaščni protein), rastlinske gene (npr. geni, ki nosijo informacijo za proteine, ki so vključeni pri patogenezi) ali druge gene (npr. geni za protitelesa). Ta pristop, k izboljšanju lastnosti sort, hkrati ohranja tudi vse zaželene lastnosti, ki se lahko med procesom klasičnega žlahtnjenja izgubijo. Mehanizmi odpornosti proti virusom pri rastlinah, transformiranih z virusnimi geni, so zelo različni. Odpornost je lahko vzpostavljena pri rastlinah, kjer pride do sinteze proteina, čigar informacijo nosi vneseni gen, ali pa za pojav rezistence zadostuje že akumulacija transgenih nukleinskih zaporedij in ne pride do izražanja transgenega proteina. Slednji primer imenujemo mehanizem utišanja genov (gene silencing). Proses temelji na utišanju genov na podlagi identičnosti nukleotidnih zaporedij.

Z razvojem novejših bolj občutljivih molekularno-bioloških metod je mogoče detektirati izražanje genov, ki sodelujejo pri tem mehanizmu in preučevati razlike v izražanju med različnimi fenotipi (občutljive / rezistentne) transgenih rastlin.

Za študij te vrste odpornosti smo izbrali transgene rastline krompirja (*Solanum tuberosum L.*) sorte 'Igor', ki je naravno občutljiva sorta na okužbo s krompirjevim virusom PVY<sup>NTN</sup>. V predhodnih študijah transformacij in testiranja odpornosti so se nekatere vzgojene

transgene linije izkazale za odporne (Stanič-Racman, 2002).

## 1.1 HIPOTEZE IN CILJI DOKTORSKE NALOGE

Nameni doktorske naloge:

- določiti natančno nukleotidno zaporedje celotnega genoma krompirjevega virusa PVY<sup>NTN</sup>-NIB, ki se pojavlja v Sloveniji
- vzpostaviti hitro in občutljivo ter hkrati natančno molekularno-biološko metodo za detekcijo transkriptov v transgenih rastlinah
- s sodobnimi molekularno-biološkimi metodami ugotoviti ali obstaja razlika v izražanju genov med občutljivimi in odpornimi transgenimi linijami krompirja sorte 'Igor' z vstavljenim genom plaščnega proteina virusa PVY<sup>NTN</sup>

Cilji doktorske naloge:

- poznavanje molekularno-bioloških osnov za pojav različka virusa PVY<sup>NTN</sup>, ki povzroča obročkasto nekrozo gomoljev krompirja
- vzpostavitev modernih molekularno-bioloških metod za študije izražanja genov pri transgenih rastlinah krompirja
- povečanje razumevanja mehanizma utišanja genov z analizo procesa na nivoju izražanja genov

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 SPLOŠNO O KROMPIRJU

Krompir spada v družino razhudnikovk (*Solanaceae*). Je zel s stebli, ki zrastejo do 1 meter visoko, s paradižniku podobnimi liho pernatimi listi. Ima socvetja, z belimi do vijoličnimi cvetovi, katerih premer doseže do 2.5 centimetra. Užitni del rastline je gomolj, to je odebelen del podzemnega steba. Gomolj pokriva rjava do vijolična kožica, meso je ponavadi belo ali rahlo rumeno, pri nekaterih andskih sortah je tudi vijoličasto (Arends in Kus, 1999).

Krompir spada med štiri najpomembnejše poljščine na svetu poleg riža, koruze in žita. Njegova domovina je Južna Amerika, natančneje perujski Andi. V Evropo so ga prinesli Španci v 16. stoletju. V zadnjih dveh stoletjih pa ga vzgajajo že po vsem svetu. V zadnjih štirih desetletjih se je njegova proizvodnja povečala v deželah v razvoju, vendar je zdaj začela upadati, predvsem zaradi različnih patogenov krompirja (Acosta in sod., 1999; Arends in Kus, 1999). Patogeni, ki zmanjšujejo pridelek krompirja, so žuželke, nematodi, glive, bakterije, virusi in viroidi, ki so povzročitelji resnih bolezni. Obstaja več različnih ustaljenih strategij kontrole patogenov na krompirju, na primer kemično tretiranje, izogibanje virom okužbe ali požlahtnjitev odpornih sort krompirja (Hull, 1990). Kontrola virusnih in bakterijskih bolezni z agrokemikalijami ali izogibanjem virom okužbe je težavna oziroma skoraj nemogoča, zato so se že razvile nove tehnike za vzgojo odpornih rastlin. Žlahtnenje krompirja se je pričelo razvijati v Evropi in Ameriki v 19. stoletju. Zaradi virusnih okužb je prihajalo do degeneracije krompirja, ki so jo napačno pripisovali staranju oziroma izrabi osnovnega sadilnega materiala zaradi neprekinjenega vegetativnega razmnoževanja. Z vzgojo spolne generacije preko pravega semena (samooplodnja) so pridelovalci nevede odstranili vzrok degeneracije, saj se večina krompirjevih virusov ne prenaša s pravim semenom. Pogostejsa medsortna križanja so se začela uporabljati šele s ponovnim odkritjem Mendlovi del, ki pomenijo rojstvo moderne genetike (Dolničar, 1996). Resnejše žlahtnjiteljsko delo pri vzgoji odpornih sort krompirja se je pričelo v začetku 20. stoletja z vnosom genov za odpornost proti različnim boleznim iz divjih sort v sorodne kultivirane sorte. Klasično križanje, pri katerem je možno iz rastlin, ki nosijo

naravno rezistenco, dobiti primerne odporne križance, velja za precej dolgotrajen postopek. V rastline namreč vnesemo tudi gene, ki ne nosijo le želenih lastnosti, ampak še druge, ki jih nato skušamo odstraniti s povratnimi križanji. Pomembno je poudariti tudi dejstvo, da žlahtnitelji lahko v teh primerih uporabijo le gene sorodnih, spolno kompatibilnih vrst, saj pri križanju oddaljenih ali nesorodnih vrst pride do razvoja sterilnih rastlin (Žel, 1996).

V zadnjem desetletju se poleg klasičnega žlahtnjenja, ki je zelo dolgotrajno in včasih tudi neuspešno, saj po določenem času patogeni mikroorganizem obide vneseno odpornost, vedno bolj razvijajo tehnike žlahtnjenja rastlin, s pomočjo uporabe tkivnih kultur in molekularno-bioloških metod. Nove tehnike s skupnim imenom imenujemo rastlinska biotehnologija ali gensko inženirstvo. Razvoj teh metod je usmerjen predvsem v produkcijo tehnološko in prehrambeno pomembnih rastlin, ki so odporne proti virusom, bakterijam, insektom, herbicidom ter so tolerantne na stres okolja.

Obstaja 235 vrst krompirja (*Solanum spp.*, *Solanaceae*). Ena izmed kultiviranih vrst je *Solanum tuberosum*, ki zajema tudi dve podvrsti *S. t. tuberosum* in *S. t. andigena*, na katerih temelji večina modernih kultivarjev (Valkonen, 1997). Na svetu obstaja že več tisoč sort krompirja. Pridelovalci vsako leto nekaj sort opustijo, prav tako pa se vsako leto pojavijo tudi nove sorte, ki so rezultat žlahtnjenja (Arends in Kus, 1999).

### **2.1.1 KROMPIR SORTE 'IGOR'**

Nekoč priljubljena in najbolj razširjena sorta krompirja v Sloveniji je bila srednje pozna belomesna slovenska sorta 'Igor', ki je bila leta 1962 ena izmed prvih registriranih slovenskih sort. S krompirjevo sorto 'Igor' je bilo posajenih 70 odstotkov slovenskih krompiričev vse do leta 1988, ko je bila izrinjena iz pridelave zaradi okužbe s krompirjevim virusom Y - nekrotičen različek NTN (PVY<sup>NTN</sup>), ki povzroča bolezen, imenovano obročasta nekroza gomoljev (PTNRD) (potato tuber necrotic ringspot disease). V Sloveniji se PTNRD od leta 1988, ko je bila prvič opažena v večjem obsegu, nezadržno širi in se iz leta v leto stopnjuje. Obročasta nekroza krompirja je ena izmed najhujših bolezni,

ki je v zadnjih sto letih prizadela krompir na Slovenskem (Čergan, 2000; Kus, 1994).

## 2.2 KROMPIRJEV VIRUS Y (PVY)

Krompirjev virus Y (PVY – *Potato virus Y*) spada v rod *Potyvirus* in družino *Potyviridae*. Družina *Potyviridae* je največja in ekonomsko najpomembnejša družina rastlinskih virusov, ki povzročajo precejšno škodo na različnih poljščinah. Za pridelavo krompirja, *S. tuberosum L.*, so ekonomsko pomembni trije potivirusi: krompirjev virus Y (PVY), krompirjev virus A (PVA) in krompirjev virus V (PVV). PVY in PVA sta razširjena po vsem svetu, medtem ko so PVV našli v Južni Ameriki (v Andih) in v Evropi. PVA in PVV v glavnem okužujeta krompir, medtem ko PVY okužuje tudi druge poljščine iz družine razhudnikovk (*Solanaceae*) (npr. paradižnik (*Lycopersicon esculentum* Mill.), papriko (*Capiscum anuum* L.) in tobak (*Nicotiana tabacum* L.)), lahko pa prizadene tudi nekatere vrste iz družin ščirnic (*Amaranthaceae*), lobodovke (*Chenopodiaceae*), nebinovke (*Asteraceae*) in metuljnice (*Fabaceae*). Z rastlinskim sokom se lahko PVY prenese na okoli 120 rastlinskih vrst (de Bokx in Huttinga, 1981; Kus, 1994; Valkonen, 1997).

PVY je helikalno zgrajen, paličast, rahlo upognjen virus, dolžine 680 - 900 nm in premera 11 - 13 nm. V sredini virusnega delca je centralni kanal s premerom 3.4 nm. Ima enoverižen, pozitivno nabit, približno 9.7 kb, dolg RNA genom, ki predstavlja 5% skupne mase virusa (Berger in sod., 2005).

PVY v naravi prenašajo rastlinske uši in sicer na nepersistenten način. Prenaša se tudi z vegetativnim razmnoževanjem in z dotikom, z rastlinskim sokom. Umetno ga lahko prenašamo z mehansko inokulacijo ali s cepljenjem (de Bokx in Huttinga, 1981; Kus, 1994; Acosta in sod., 1999).

Vsi gospodarsko pomembni virusi se iz mesta okužbe razširijo po vsej rastlini in okuženost traja vse, dokler rastlina živi. Pri nespolnem razmnoževanju iz delov okužene rastline zraste nova generacija okuženih rastlin. Škoda, ki jo povzročajo virusi na krompirju, torej

ni le enkratna oziroma sezonska, temveč trajna, kar poimenujemo izrojevanje ali degeneracija krompirja (Acosta in sod., 1999; Arends in Kus, 1999).

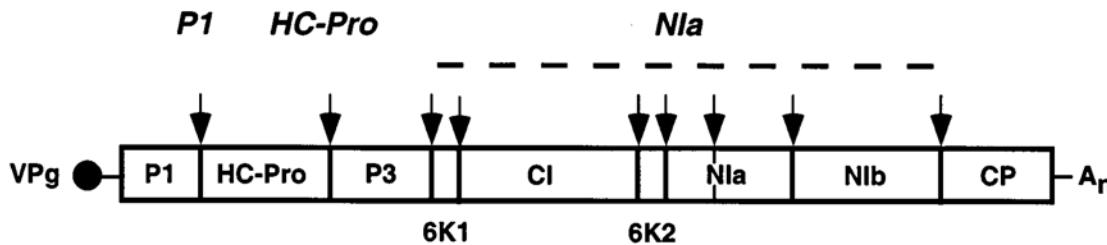
Prisotnost PVY dokažemo s serološkim testom - dvojni sendvič encimsko-imunska metoda (DAS ELISA) (enzyme-linked immunosorbent assay) ali RT-PCR metodo (reverzna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo) že v zelo nizki koncentraciji. Pogosto za identifikacijo uporabljam tudi testne rastline, kot so na primer vrste *Nicotiana glutinosa* L., *N. tabacum* L., *S. tuberosum* L., *Tinantia erecta*. Za vzdrževanje virusa uporabljam rastline tobaka sorte 'Samsun'. Simptomi, ki se pojavijo na rastlini tobaka po okužbi so mozaiki na listih in sistemski obledelost žil (de Bokx in Huttinga, 1981; Kus, 1994; Acosta in sod., 1999).

Trenutno poznamo več različkov virusa PVY in še vedno se pojavljajo novi. Eden izmed njih je krompirjev virus Y<sup>O</sup> (PVY<sup>O</sup>), ki je splošno razširjen. Je povzročitelj tako lokalnih simptomov, ki se pojavijo na inokuliranih listih, kot sistemskih simptomov pri krompirju. Bolezenska znamenja, ki se pojavijo na rastlinah tobaka po okužbi z virusom PVY<sup>O</sup> se izražajo kot sistemsko gubanje listov. Drugi poznan različek PVY je krompirjev virus Y<sup>N</sup> (PVY<sup>N</sup>), ki se od PVY<sup>O</sup> loči po simptomih, ki jih povzroča na rastlinah tobaka. Povzroča namreč jasne nekroze, gubanje listov, ki po določenem času popolnoma porjavijo in propadejo. Gospodarska škoda, ki jo povzročajo različki PVY v krompirjevih nasadih je od 10 do 80 odstotna in je odvisna predvsem od različka virusa, sorte krompirja, časa okužbe in klimatskih pogojev (de Bokx in Huttinga, 1981; Kus, 1994; Crosslin, 2005).

### 2.2.1 ORGANIZACIJA GENOMA PVY

Genom potivirusov predstavlja linearne, enojne, pozitivno usmerjena molekula RNA dolga 9.7 kilobaz, ki predstavlja 5% teže delca in je obdana s približno 2000 kopijami plaščnega proteina (CP) (coat protein). Na 5' terminalnem koncu RNA genoma je kovalentno vezan vezavni protein VPg (viral protein genome). Protein VPg je majhen nestruktureden protein, ki služi kot začetek pri podvajjanju RNA verige. 3' terminalni konec genoma je poliadeniliran (poli(A)) rep. Poli (A) rep na 3' terminalnem koncu predstavlja poliadeninsko zaporedje. Njegova vloga še ni poznana, predvideva se, da je povezana s sposobnostjo virusne RNA, da le-ta deluje kot evkariotska informacijska RNA (mRNA).

Genom ima en sam dolg odprt bralni okvir (ORF) (open reading frame). Na 5' kot na 3' terminalnem koncu ozioroma pred in za ORF leži nekodirajoča regija ozioroma regija, ki se ne prevaja (5'-UTR in 3'-UTR) (non-translated region). Odprt bralni okvir se prepiše v 340 do 370 kilodalton (kDa) velik enojen poliprotein (sestavljen iz več kot 3000 aminokislin). Med ali po končani translaciji se poliprotein proteolitično razcepi na specifičnih mestih s katalizo treh virusnih proteinaz. Po končani cepitvi nastane devet funkcionalnih virusnih proteinov (funkcionalni proteini v zaporedju od 5' terminalnega konca do 3' terminalnega konca genoma: P1, HC-Pro, P3, 6k1, CI, 6k2, NIa, NIb in CP) (slika 1) (Agrios, 1997; Urcuqui-Inchima in sod., 2001).



**Slika 1: Organizacija potivirusnega genoma (Urcuqui-Inchima in sod., 2001).**

Na 5' terminalnem koncu RNA genoma je vezan protein VPg in na 3' terminalnem koncu se genom končuje s poli(A) repom. Genom kodira en sam poliprotein, ki se kasneje s katalizo proteinaz razcepi na devet funkcionalnih proteinov. Imena proteinov so napisana znotraj bralnega okvirja. Mesta cepitve so označena s puščicami in oznako proteinaze, ki cepi na določenem mestu.

Figure 1: Organization of the potyvirus genome (Urcuqui-Inchima in sod., 2001).

The RNA carries a VPg bound to its 5'end and a poly (A) at its 3' end. The genomes contain a single long open reading frame translated into a large polyprotein that is cleaved into nine protein products. The polyprotein is boxed. The abbreviations of the names of the viral proteins are indicated within the ORF. The positions at which cleavage occurs are indicated by vertical lines within the large ORF. The viral proteinases (in italics) and the positions at which they cleave the polyprotein (arrows) are presented above the major ORF.

## 2.2.2 VIRUSNI PROTEINI RODU POTIVIRUSOV IN NJIHOVA VLOGA

Virusni proteini imajo različno vlogo v življenjskem ciklu virusa. Vsi virusni proteini sodelujejo pri virusnem pomnoževanju in vsi razen proteinov P3, 6k1 in 6k2, imajo sposobnost vezave na RNA. Prve študije kažejo na to, da so proteini, ki ležijo na C terminalnem delu poliproteina, v večji meri odgovorni za tvorbo replikacijskega kompleksa in tisti na N terminalnem delu za gibanje virusa.

### 5'-UTR (Un-Translated Region)

5' terminalna ne-kodirajoča regija (5'-UTR) se med različnimi virusi močno razlikuje po nukleinskem zaporedju vendar ne po velikosti. Dolga je od 129 do 204 nukleotidov, od tega je visok delež adenina. Vsebuje močno konzervativno regijo TCA ACA CAA CAT (potybox), kar je verjetno značilnost vseh potivirusov. Predvideva se, da je njena vloga pomembna pri pospeševanju translacije (Hari, 1995).

### Protein VPg (Viral Protein genome)

Majhen, 24kD velik nestrukturni vezavni protein VPg stabilizira virusno RNA in jo ščiti pred napadom gostiteljskih eksonukleaz. Protein VPg reagira z rastlinskimi proteini v gostiteljski rastlinski celici in s tem se začne prevajanje virusnega genoma ter upočasnitev sinteze rastlinskih proteinov (Urcuqui-Inchima in sod., 2001). Rajamäki in Valkonen (2002) sta v svojih raziskavah ugotovila, da protein VPg pri PVA prav tako sodeluje pri sistemski okužbi gostiteljske rastline.

### Protein P1

Nukleotidno zaporedje, ki predstavlja informacijo proteina P1, leži na 5' terminalnem delu genoma virusa oziroma na začetku ORF. Protein P1 je 32 kD velik protein. Je serinski tip encima proteinaze, katerega funkcija je cepljenje poliproteina. Po cepitvi nastane funkcionalen protein P1. Protein P1 je najmanj ohranjen protein med proteinimi potivirusov, če ne upoštevamo njegovega C terminalnega konca, ki predstavlja za proteinazo katalitično domeno (Thole in sod., 1993; Urcuqui-Inchima in sod., 2001). Kasschau in Carrington (1998) sta ugotovila, da poliprotein P1/Hc-Pro virusa jedkanja tobaka (TEV, *Tobacco etch virus, Potyviridae*) deluje kot supresor mehanizma utišanja genov.

### Protein Hc-Pro (Helper Component Proteinase)

Protein Hc-Pro je multifunkcionalen protein. Njegove funkcije so:

- sodeluje pri interakciji vektorjev (listne uši) in vironov (predvideva se, da sodeluje pri naboru prenosa s specifičnim vektorjem),
- v okuženih rastlinah se povezuje v dimere,
- sodeluje pri pomnoževanju virusa in sistemskem prenosu po rastlini,
- veže se na nukleinske kisline z dvema specifičnima domenama v centralni regiji,
- je supresor mehanizma utišanja genov (vplete se v rastlinski imunski odgovor, ki normalno prepreči akumulacijo virusa v rastlini),
- sodeluje pri synergizmu in razvoju simptomov,
- ima avtoproteinazno aktivnost, ki katalizira razcep Hc-Pro na njegovem C terminalnem koncu (Urcuqui-Inchima in sod., 2001).

V novejših študijah Tribodet in sod. (2005) umetno sintetizirajo mutante med virusom PVY-N605 in virusom PVY<sup>O</sup>-139 na delu, ki so ga Glais in sod. (2002) predvidevali za del (od 3' terminalnega dela gena P1 do 5' terminalnega dela gena P3) odgovoren za nastanek nekroz na tobaku. S preučevanjem mutant ugotavlja, da sta za nastanek nekroz na tobaku odgovorni dve aminokislinski mesti in sicer K400 (lizin 400) in E 419 (glutaminska kislina 419) na C koncu proteina Hc-Pro.

### Protein P3

Protein P3 je najmanj okarakteriziran protein potivirusov. Sáenz in sod. (2000) je s preučevanjem mutant virusa šarke (PPV) (*Plum pox virus, Potyviridae*) ugotovil, da je C terminalni konec kompleksa proteina P3 in peptida 6k1 eden izmed ključnih faktorjev za razvoj simptomov, torej za patogenost. Predvideva se, da igra pomembno vlogo tudi pri pomnoževanju virusa v rastlini (Urcuqui-Inchima in sod., 2001).

### Peptid 6k1

Peptid 6k1 se povezuje s proteinom P3 in v kombinaciji sodeluje pri nastanku bolezenskih znamenj (Sáenz in sod., 2000; Urcuqui-Inchima in sod., 2001).

### Protein CI (Cytoplasmic Inclusions)

Protein citoplazemskih vključkov ali CI tvori v rastlinski celici značilne celične vključke v obliki vetrnic. Protein CI ima ATPazno aktivnost, zmožnost razvijanja dvojne RNA (helikazno aktivnost), afiniteto za vezavo nukleotidov in afiniteto za vezavo na RNA, s čimer olajša transkripcijo in translacijo virusnega genoma (Fernández in García, 1996; Fernández in sod., 1997; Urcuqui-Inchima in sod., 2001). Protein CI ima tudi indirektno vlogo pri transportu virusa po rastlini (Urcuqui-Inchima in sod., 2001).

### Peptid 6k2

Peptid 6K2 se skupaj s proteini VPg ali NIa ali celo večjim poliproteinom pri virusu jedkanja tobaka (TEV) veže na endoplazmatski retikulum v rastlinski celici, in tako igra pomembno vlogo pri pomnoževanju genoma virusa (Schaad in sod., 1997). Spetz in

Valkonen (2004) sta z analizo peptida 6k2 virusa PVA ugotovila, da sodeluje tudi pri transportu po okuženi rastlini in razvoju simptomov.

#### Mali protein jedrnih vključkov NIa (Nuclear Inclusions a)

Mali protein jedrnih vključkov oziroma protein NIa ima dve ključni domeni. Ena je vezalna domena proteina VPg, druga domena pa ima proteinazno funkcijo (Hari, 1995, Urcuqui-Inchima in sod., 2001). Protein NIa se veže tako sam s sabo kot s proteinom NIb in tako so Li in sod. (1997) ter Daròs in sod. (1999) predstavili model, ki predvideva, da so za uspešen začetek sinteze RNA molekule potrebne vezava proteina NIb s proteolitično domeno proteina NIa, vezava proteina NIb s peptidom 6k2, nadaljnja vezava na celično membrano in vezava s proteinom VPg. Glais in sod. (2002) v svoji študiji povezujejo proteine NIa, NIb in CP z nastankom nekroz na krompirjevih gomoljih.

#### Veliki protein jedrnih vključkov NIb (Nuclear Inclusions b)

Veliki protein jedrnih vključkov oziroma protein NIb predstavlja od RNA odvisno RNA polimerazo potivirusov (RdRP) (RNA-dependent RNA Polymerase) (Hong in Hunt, 1996).

#### Plaščni protein (Coat Protein)

Plaščni protein (CP) je pomemben predvsem za virusno enkapsidacijo. Sam potek enkapsidacije še ni popolnoma poznan. Protein CP je velik od 32 kD do 36 kD. Razdeljen je na tri domene in sicer na variabilni N terminalno in C terminalno domeno, ki sta izpostavljeni na zunanjji površini virusa ter osrednjo domeno. Vloga proteina CP je ključnega pomena pri prenosu s prenašalcji (obstaja možnost, da pride do interakcije med proteinom Hc-Pro in CP), pri premiku virusa iz celice v celico in pri sistemskem transportu ter pri pakiranju in pomnoževanju virusnega genoma (Hari, 1995; Urcuqui-Inchima in sod., 2001).

#### 3'-UTR (Un-Translated Region)

3'-UTR je 3' terminalna nekodirajoča regija virusnega genoma. Med virusi se močno

razlikuje po velikosti in je dolga od 147 do 499 nukleotidov. Analize 3'-UTR nukleotidnih zaporedij so pokazale, da je zgrajena, pri različnih potivirusih, iz regije parov direktnih ponovitev, segmentov bogatih z adeninom in uracilom in je sposobna tvoriti stabilne sekundarne strukture, ki se razlikujejo med virusi. Predvideva se, da ima 3'-UTR regija pomembno vlogo pri pojavljanju bolezenskih znakov (Hari, 1995).

### 2.2.3 KLASIFIKACIJA PVY

Obstaja več različnih razvrstitev PVY izolatov in sicer:

- glede na **gostiteljsko rastlino** iz katere je bil izoliran izolat (4 skupine: krompirjev, paprikin, tobakov in paradižnikov izolat)
- glede na **biološke** (simptomi in obrambni odgovor okužene rastline) in **serološke lastnosti**
- glede na **molekularno-biološke lastnosti** (npr. krompirjeve izolate uvrščamo v tri skupine (de Bokx in Huttinga, 1981):
  - PVY<sup>O</sup> – navadni (common strains)
  - PVY<sup>C</sup> – črtasti (stipple streak strains)
  - PVY<sup>N</sup> – nekrotični (tobacco veinal necrosis strains). V skupino PVY<sup>N</sup> spada, zaradi visoke homologije v nukleotidnem in aminokislinskem zaporedju plaščnega proteina, tudi PVY<sup>NTN</sup> (van den Heuvel in sod., 1994; Le Romancer in sod., 1994). V novejših študijah Boonham in sod. (2002b) PVY<sup>NTN</sup> razvrščajo v novo skupino imenovano rekombinantni izolati, ki povzročajo PTNRD. Vendar so povzročitelji PTNRD tudi nekateri nerekombinantni izolati.

Ena izmed zadnjih predstavljenih je razvrstitev Singh R (2004), ki deli viruse glede na reakcijo na modelnih rastlinah tobaka, serološko reakcijo in molekularno-biološko metodo reverzne transkripcije in verižnega pomnoževanja s polimerazo (RT-PCR) metodo, na PVY<sup>N</sup>, rekombinantne PVY<sup>N:O</sup>, nerekombinantni PVY<sup>NTN</sup>, rekombinantni PVY<sup>NTN</sup> in posamezne izolate, ki ne sodijo v nobeno od naštetih skupin.

## 2.2.4 KROMPIRJEV VIRUS Y<sup>NTN</sup> (PVY<sup>NTN</sup>)

Krompirjev virus Y<sup>NTN</sup> (PVY<sup>NTN</sup>) je eden izmed različkov virusov skupine PVY<sup>N</sup>. V skupino PVY<sup>N</sup> ga uvrščamo glede na bolezenska znamenja, ki jih povzroča na rastlinah tobaka. PVY<sup>NTN</sup> je povzročitelj bolezni imenovane PTNRD. Ime virusa je povezano z njegovo virulentnostjo, tako PVY<sup>NTN</sup> pomeni krompirjev virus Y, ki spada v skupino N (necrotic group) in je povzročitelj nekroz na gomoljih (tuber necrosis). Bolezen se izraža kot površinske nekroze na shranjenih gomoljih (Kus, 1994; Le Romancer in sod., 1994). PTNRD je bila prvič omenjena na Madžarskem v osemdesetih letih (1979), v Sloveniji so jo v večjem obsegu opazili leta 1988 in se od takrat nezadržno širi (Kus, 1992). PVY<sup>NTN</sup> zmanjšuje pridelek krompirja bolj kot ostali različki virusa PVY<sup>N</sup>, pri občutljivih sortah pa vpliva tudi na kakovost gomoljev in prav zaradi tega je bolezen v treh letih (1989 - 1991) izrinila iz pridelave našo najbolj priljubljeno in najbolj razširjeno sorto 'Igor'. Z močno občutljivostjo določenih kultivarjev lahko razumemo velike izgube, ne pa nepričakovani pojav bolezni, ki jo povzroča PVY<sup>NTN</sup>. PVY<sup>NTN</sup> je serološko močno podoben PVY<sup>N</sup>, vendar sorte, ki sicer veljajo za izredno odporne proti PVY<sup>N</sup>, ne kažejo odpornosti proti različku PVY<sup>NTN</sup> (Le Romancer in Nedellec, 1997; De Bokx in Huttinga, 1981).

Izolati povezani s PTNRD se razlikujejo od PVY<sup>N</sup> izolatov po spektru gostiteljev (se širi tudi na druge vrste iz družine razhudnikov in po patogenosti na krompirju (Kus, 1994).

## 2.2.5 VARIABILNOST GENOMA PVY

PVY je genetsko variabilen. Objavljenih je več študij, ki razlagajo kako spremembe genoma in evolucija vplivajo na njegovo biološko funkcijo (na izražanje simptomov pri gostiteljski rastlini).

Klasifikacija pri potivirusih klasično temelji na primerjavi nukleotidnega zaporedja CP (Shukla in sod., 1988). Tekom zadnjega desetletja je bilo opravljeno več študij, ki temeljijo na primerjavi virulentnosti virusa in primerjavi posameznih delov genoma različkov PVY,

npr. 5'-UTR, 3'-UTR, plaščnega proteina (Sudarsono in sod., 1993; Van der Vlugt in sod., 1993; Inoue-Nagata in sod., 2001). Študije primerjave nukleotidnih zaporedij posameznih delov genoma so pokazale, da je natančno razporejanje krompirjevih virusov v skupine težavno.

Adams in sod. (2005) v svoji filogenetski študiji, glede na primerjave različnih genomov virusov ali delov genomov različnih virusov (med njimi tudi potivirusov), ugotavlja, da je za klasifikacijo virusov, za katere ni določeno celotno nukleotidno zaporedje odprtga bralnega okvirja, najbolj informativno nukleotidno zaporedje dela genoma, ki kodira protein CI.

Določitev nukleotidnih zaporedij celotnega genoma virusa je najnatančnejši pristop, saj nam lahko pomaga pri sledenju evolucij virusa v celoti in nam da informacijo o povezavi med nukleotidnim zaporedjem in biološko funkcijo. Tako je v predhodnih študijah bilo objavljenih šest različnih nukleotidnih zaporedij celotnega genoma PVY (Robaglia in sod., 1989; Thole in sod., 1993; Singh M in Singh RP, 1996; Jakab in sod., 1997; Nie in Singh RP, 2003b).

Gonilo virusne variabilnosti je rezultat treh fenomenov: mutacije, rekombinacije in preurejanja virusnih genomov (pri virusih s segmentiranim genomom). Rekombinacija je zamenjava genetskega materiala med dvema virusoma ali dvema različkoma virusa in redkeje med virusom ter gostiteljevim genomom. S pomočjo študij filogenetskih sorodnosti RNA virusnih genomov je v primeru rekombinacije mogoče ugotoviti, da deli določenih genomov pripadajo enemu ali drugemu različku virusa (Aaziz in Tepfer, 1999). V študiji so Revers in sod. (1996) pokazali, da rekombinacija prevladuje v rodu potivirusov, posebej pri PVY. Vse te ugotovitve nas opozarjajo na nujnost primerjave celotnih genomov virusov.

Glais in sod. (2002) so s pomočjo primerjave rezultatov dobljenih z analizo polimorfizmov dolžin restrikcijskih fragmentov (RFLP) (Restriction Fragment Length Polymorphism) produktov PCR posameznih delov virusnih genomov ugotovili, da genomi madžarskega, libanonskega in francoskega izolata PVY<sup>NTN</sup> vsebujejo nukleotidna zaporedja, ki so homologna različnim PVY<sup>O</sup> in PVY<sup>N</sup> izolatom. Vzorci restrikcijske analize produktov PCR PVY<sup>NTN</sup> regij 5'-UTR, P1, HC-Pro, NIa, NIb in CP so bili večinoma podobni restrikcijski analizi produktov PCR skupine PVY<sup>N</sup> izolatov. Vzorci restrikcijske analize produktov PCR regij P3, CI in 3'-UTR virusa PVY<sup>NTN</sup> pa so bili podobni vzorcu razgradnje produktov PCR iz skupine PVY<sup>O</sup> izolatov. Rezultate so na primeru PVY<sup>NTN</sup>-H izolata potrdili tudi z analizo prileganja nukleotidnih zaporedij.

Revers in sod. (1996) so rekombinacijska mesta dokazali že pred tem in sicer v delu genoma, ki kodira plaščni protein. Rekombinacijski genom virusa PVY<sup>NTN</sup> bi lahko bil rezultat koeksistence obeh različkov virusov PVY<sup>N</sup> in PVY<sup>O</sup> v isti rastlini. V takem primeru bi lahko prišlo do rekombinacije, katerih rezultat so lahko genomi kot je PVY<sup>NTN</sup> (Glais in sod., 2002).

Glais in sod. (2002) predlagajo, da bi za razvoj PTNRD lahko bile odgovorne regije NIa, NIb in CP, in sicer skupaj ali posamezno ter da bi za razvoj nekroz lahko bila odgovorna mozaična struktura virusnega genoma. Tudi nekateri nerekombinantni izolati, kot je severno ameriški različek virusa imenovan NA-PVY<sup>NTN</sup> Tu 660, lahko povzročajo PTNRD (Nie in Singh RP, 2003b). Omenjena avtorja v svoji študiji predlagata, da glede na to da NA-PVY<sup>NTN</sup> Tu 660 povzroča PTNRD in nima rekombinacijskega genoma, mozaična struktura genoma ni nujno potrebna za nastanek PTNRD. Patogenost virusnega različka je tako lahko povezana z manjših spremembami v enem ali večih genih ozziroma proteinih.

## 2.2.6 SPECIFIČNO DOLOČANJE PVY<sup>NTN</sup>

V primeru razvoja PTNRD je zelo pomembno natančno ločevanje med različki PVY<sup>N</sup> in PVY<sup>NTN</sup>. Obstajajo zelo različne metode določanja in sicer:

Klasično določevanje z opazovanjem bolezenskih znamenj na testnih rastlinah, na gomoljih in listju krompirja, ki jih povzroča okužba s PVY<sup>NTN</sup> ali PVY<sup>N</sup> (Le Romancer in sod., 1994). Klasično določanje je zahtevno in dolgotrajno delo in zato manj primerno za diagnostične namene.

S klasičnimi serološkimi metodami ne moremo ločiti PVY<sup>NTN</sup> od drugih različkov PVY<sup>N</sup>. Delno specifična so le monoklonska protitelesa, ki jih je razvil Čeřovská (1998), ki se uporabljam v trojni sendvič encimsko-imunski metodi (TAS ELISA).

Zadnje desetletje se razvijajo tudi modernejše molekularno-biološke tehnike, osnovane na nukleotidnih razlikah v genu za protein P1 (Weilguny in Singh RP, 1998; Nie in Singh RP, 2002), v 5'-UTR regiji (Rosner in Maslenin, 1999a, 1999b; Rosner in Maslenin, 2003; Glais in sod., 1996; Nie in Singh RP, 2002), v 3'-UTR delu genoma virusa (Rosner in Maslenin, 2001) ali rekombinacijsko mesto v genu plaščnega proteina (Szemes in sod., 2002; Boonham in sod., 2002a; Moravec in sod., 2003) ali druge rekombinacijske točke v genomu virusa (Nie in Singh RP, 2003a) ali pa variabilnosti vzdolž celotnega genoma virusa (Glais in sod., 1998).

Molekularne metode, ki nam omogočajo ločevanje med različki PVY<sup>N</sup> in PVY<sup>NTN</sup> so:

- Weilguny in Singh RP (1998) uporabljata kombinacijo reverzne transkripcije in verižne reakcije s polimerazo (RT-PCR) in vgnezden PCR (nested-PCR) ter metode

z uporabo le 3' specifičnega oligonukleotidnega začetnika v RT-PCR metodi (3'-primer RT-PCR), ki izkorišča razlike med obema različkoma virusa PVY<sup>N</sup> in PVY<sup>NTN</sup> znotraj gena P1.

- Kombinacija RT-PCR metode, PCR metode s specifičnimi oligonukleotidnimi začetniki na 5'-UTR delu genoma virusa in znotraj gena P1 ter nadaljnjo primerjavo restrikcijskih vzorcev (RFLP) dobljenih produktov PCR (Glais in sod., 1996, Rosner in Maslenin, 1999).
- Kombinacija RT-PCR tehnike, naknadnega prepisa v RNA ter hibridizacije s specifičnimi oligonukleotidnimi začetniki, ki so specifični za posamezne regije znotraj genoma 5'-UTR virusa. Končna detekcija poteka na poliakrilamidni elektroforezi pri določenih pogojih, ki vplivajo na sekundarno strukturo hibridiziranega produkta in posredno na njegovo mobilnost (Rosner in Maslenin, 2003).
- Uporaba AmpliDet RNA metode, ki izkorišča rekombinacijsko mesto v genu za CP in omogoča ločevanje med različki PVY<sup>N</sup>, PVY<sup>O</sup> in PVY<sup>NTN</sup>. Metoda je kombinacija pomnoževanja nukleinskih kislin in detekcije s specifičnimi sondami (molecular beacon probes) (Szemes in sod., 2002).
- Metoda enoverižna TCP ali dvoverižna TCP (ssTCP ali dsTCP) (Transcript Conformation Polymorphism). Metoda temelji na razlikah v mobilnosti enoverižnih RNA (ssRNA) (single stranded RNA) transkriptov genoma virusa ali dvoverižnih transkriptov (dsRNA) (double stranded RNA) na elektroforezi. dsRNA transkripti nastanejo z vezavo znanega specifičnega RNA transkripta PVY<sup>NTN</sup> ali PVY<sup>N</sup> s testiranim vzorcem (Rosner in Maslenin, 1999, Rosner in Maslenin, 2001).
- Metoda RT-PCR, ki izkorišča rekombinacijsko točko znotraj gena CP in uporabo različnih setov oligonukleotidnih začetnikov, ki ležijo na 5' in 3' terminalnem delu gena CP (Boonham in sod., 2002a) ali pa kombinacija RT-PCR metode še z uporabo dodatnega oligonukleotidnega začetnika, ki ima homologijo z nukleotidom G na poziciji 8611 genoma vseh rekombinacijskih genomov virusa PVY<sup>NTN</sup> (Moravec in sod., 2003).

- RT-PCR metoda, ki izkorišča variabilnost gena P1 (Nie in Singh RP, 2002) ali pa RT-PCR metoda, ki izkorišča rekombinacijske točke znotraj genoma PVY<sup>NTN</sup>, tako da oligonukleotidni začetniki ležijo okrog rekombinacijskih točk v genomu (v regijah virusnega genoma, ki kodirajo Hc-Pro in P3, 6k2 in NIa ter CP in 3'-UTR) (Nie in Singh, 2003a).
- Na področju detekcije virusov se trenutno uvajajo tudi nove tehnike, kot je uporaba mikromrež, ki bi omogočale testiranje več vrst krompirjevih virusov istočasno (diagnostika virusnih bolezni krompirja) (Boonham in sod., 2003, Bystricka in sod., 2005). Problem te tehnike je natančno razlikovanje med različki virusa zaradi pogojev hibridizacije oziroma uspešnosti vezave različnih nukleotidnih zaporedij oziroma različnih pogojev hibridizacije preiskovanega vzorca na točkovno nanesena specifična nukleotidna zaporedja na mikromreži (Boonham in sod., 2003).

Vse metode imajo določene prednosti in slabosti. Avtorji številnih metod za specifično detekcijo PVY<sup>NTN</sup> poročajo da, zaradi velikega polimorfizma med izolati PVY<sup>NTN</sup> s posamezno metodo ne moremo detektirati vseh izolatov, ki povzročajo PTNRD. Z RT-PCR metodo, ki izkorišča rekombinacijsko točko znotraj gena za CP, lahko detektiramo le izolate PVY<sup>NTN</sup>, ki imajo rekombinacijsko točko na tem delu genoma, medtem ko ostalih izolatov PVY<sup>NTN</sup> (npr. NA- PVY<sup>NTN</sup> Tu 660), ki je nimajo, na ta način ne moremo detektirati (Moravec in sod., 2003). Nie in Singh RP (2002) sta objavila metodi in sicer uporabo enega ali večih oligonukleotidnih začetnikov v kombinaciji z enim univerzalnim oligonukleotidni začetnikom, ki so homologni nukleotidnemu zaporedju, ki kodira protein P1. Različne kombinacije oligonukleotidnih začetnikov omogočajo natančno ločevanje različkov virusa, ne glede na rekombinacijske točke v virusnem genomu.

### 2.3 ZAŠČITA PRED OKUŽBO Z VIRUSOM PVY

#### Uporaba brezvirusnega semenskega krompirja

PVY lahko nadzorujemo z uporabo brezvirusnega semenskega krompirja, pridelovanjem na izoliranih območjih ali sajenjem zelo ali popolnoma odpornih sort. Zaščita je uspešna le v primerih, da v okolju ni drugih rezervoarjev PVY. V večini primerov je to neuspešno, saj se PVY ponavadi nahaja v samoselcih krompirja ali pa v rastlinah (lobodovke, nebinovke, metuljnice), ki rastejo v bližini in se kasneje uspešno prenese z ušmi v krompirjeve nasade. Okužbo je mogoče omejiti tudi z izločanjem okuženih rastlin v semenskih nasadih in zgodnjim uničevanjem cime (Hämäläinen in sod., 1997, Arends in Kus, 1999).

#### Škropljenje z insekticidi

Škropljenje z insekticidi je žal neuspešno za preprečevanje okužbe z neperzistentnimi virusi, ki jih v krompirjev nasad prinesejo uši. Delovanje insekticidov je v večini primerov prepočasno glede na hitrost okužbe krompirja z virusom (Kus, 1994).

#### Navzkrižna zaščita

Beczner in sod. (1984) so v testih navzkrižne zaščite med različnimi izolati virusov iz skupine PVY ugotovili, da je le-ta žal neuspešna.

### 2.4 OBRAMBNI MEHANIZMI RASTLINE PROTI VIRUSOM

Kot glavni mehanizem obrambe rastlin pred virusnimi okužbami je danes prepoznano post transkripcijsko utišanje genov (PTGS). V primeru okužbe s potivirusi ta mehanizem ni uspešen, zato obrambni sistemi v rezistentnih rastlinah temeljijo na drugih mehanizmih, danes še ne natančno določenih in raziskanih.

#### **2.4.1 MEHANIZEM Z RNA POSREDOVANE REZISTENCE ALI UTIŠANJE GENOV**

Mehanizem, poznan pod imenom utišanje genov (RNA silencing ali gene silencing) je splošen fenomen v evkariontskem svetu in igra pomembno vlogo v različnih razvojnih bioloških procesih, spreminjanju kromatinske strukture nukleinskih kislin ter kot obrambni mehanizem pred napadom virusnih patogenov (Bartel, 2004, Lippman in Martienssen, 2004, Waterhouse in sod., 2001).

Osnovni mehanizem utišanja genov vključuje razrez dvostranske RNA (dsRNA) (double-stranded RNA) z RNaze III podobnim proteinom imenovanim Dicer. Dicer razreže dsRNA v 21 do 28 nukleotidov dolge kratke RNA molekule (siRNA) (short interfering RNA), ki imajo prepoznavno strukturo in sicer 2 prosta nukleotida na 3' terminalnem koncu. Verigi siRNA se kasneje ločita, predvidoma s pomočjo helikaze, in ena izmed verig je odgovorna za vodenje kompleksa RISC (RNA Interference Specificity Complex) do tarčne molekule mRNA. RISC je odgovoren za končno razgradnjo tarčne molekule in posledično utišanja genov (Qi in Hannon, 2005a).

V rastlinskem svetu so poznani trije osnovni mehanizmi utišanja genov (Baulcombe, 2004):

- Prvi osnovni mehanizem je post-transkripcijsko utišanje genov (PTGS) (Post Transcriptional Gene Silencing). V njem sodelujejo približno 21 nukleotidov dolge RNA molekule imenovane siRNA, ki nastanejo z encimskim razrezom iz dsRNA. Vir dsRNA so lahko replikacijski intermediati rastlinskih virusov, obrnjene ponovitve v transgenih ali pa produkt rastlinske ali virusne RdRP, ki preoblikuje enoverižne aberantne RNA.
- Drug osnovni mehanizem je mehanizem, pri katerem sodelujejo kratke endogene

molekule RNA ali mikro RNA (miRNA) (micro RNA). Nastanejo iz prekurzorjev miRNA z encimsko razgradnjo proteinskega kompleksa Dicer-like 1 (DCL1). MiRNA prekurzorji so prepisi genov, ki kodirajo miRNA v genomu rastline. Molekule miRNA regulirajo gensko izražanje tarčnih mRNA z mehanizmom parjenja baz, kar vodi do razgradnje tarčnih mRNA in tako do degradacije mRNA ali inhibicije translacije tarčne mRNA. Ta tip utišanja genov se vključuje v normalne procese rasti in razvoja evkariontskih celic.

- Tretji osnovni mehanizem je transkripcijsko utišanje genov (TGS) (Transcriptional Gene Silencing), katerega končni rezultat je s pomočjo molekul siRNA vodeno spreminjanje kromatinskih struktur DNA ali histonska metilacija.

#### 2.4.1.1 Post-transkripcijsko utišanje genov (PTGS)

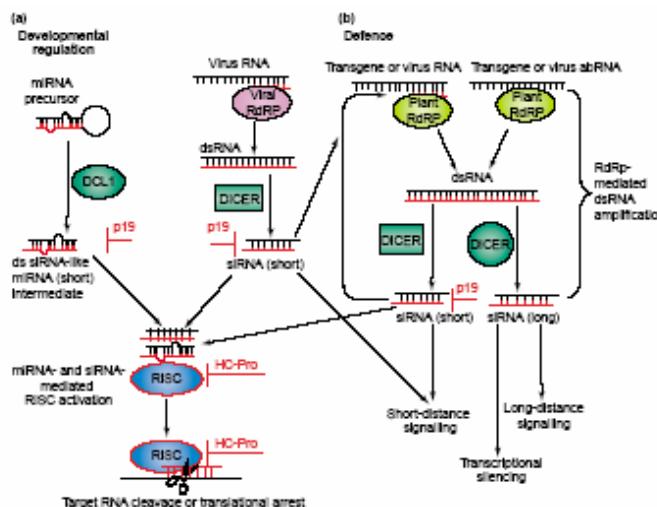
Naravna vloga PTGS je obramba pred virusi, zaščita genoma in razvojna regulacija genske ekspresije (Baulcombe, 2005). PTGS lahko aktivirajo virusi, transgeni ali endogeni geni. Aktivacija pomeni začetek razgradnje specifične homologne RNA, ki jo lahko kodirajo geni, transgeni in v nekaterih primerih virusi (Fagard in Vaucheret, 2000).

Trenutno je veljaven model mehanizma PTGS, ki se sproži kot odgovor na virusno okužbo pri rastlinah in upošteva podatke, pridobljene z mutacijskimi analizami pri modelni rastlini navadnega repnjakovca (*Arabidopsis thaliana*) (Voinnet, 2001). Model je deljen na dve osnovni poti. Prva pot je pot razvojne regulacije in druga pot je obramba proti parazitskim nukleinskim kislinam (Silhavy in Burgyán, 2004). Znanih je več načinov nastanka dsRNA. Eden izmed njih je detekcija in spreminjanje aberantne RNA v dsRNA s kompleksom rastlinskih proteinov, ki so odgovorni za nadzor in pomnoževanje ter se imenuje RdRP. Drug izmed znanih načinov je povezan z obliko transgenov. Tako transgeni s protismiselno obliko ali prerazporejeno strukturo lahko direktno producirajo dsRNA in sicer preko parjenja baz. Ta način nastanka dsRNA je neodvisen od rastlinskega kompleksa proteinov RdRP. Tretji način pa je sinteza dsRNA v replikacijski fazи vseh RNA virusov. Sam sistem je možno aktivirati tudi z direktnim vnosom specifičnih dsRNA, z vnosom transgena, ki

vsebuje inverzne ponovitve in se po prepisu zavije v dvočleno obliko (Voinnet, 2001) ali pa s križanjem transgenih rastlin, katerih ena parentalna generacija vsebuje smiselno obliko transgena, druga pa protismiselno. Pri generaciji križancev z obema konstruktoma, po prepisu pride do parjenja transkriptov in nastanka dsRNA (Waterhouse in sod., 1998).

Različne možne veje aktivacije v poti obrambe proti parazitskim nukleinskim kislinam se združujejo v koraku akumulacije dsRNA. dsRNA se nato procesirajo v kratke, od 21 do 22 nukleotidov dolge siRNA – kratke siRNA (short interfering RNA (short)) in od 24 do 26 nukleotidov dolge siRNA – dolge siRNA (short interfering RNA (long)) (Hamilton in sod., 2002, Silhavy in Burgýán, 2004). Pri poti regulacije razvoja pa nastanejo s prepisom intergenskih regij genoma 21 nukleotidov dolge miRNA molekule (Baulcombe, 2002, Hake, 2003). Procesiranje dsRNA je zagotovljeno z delovanjem encima, ki je podoben DICER encimu vinske mušice (*Drosophila sp.* RNAza III encim). Kratke siRNA so odgovorne za širjenje signala PTGS med celicami in v določenih primerih vodenje kompleksa RdRP do tarčne mRNA, ki jo nato RdRP preoblikuje v dsRNA (Sijen in sod., 2001, Dalmay in sod., 2000, Nishikura, 2001). Poglavitna vloga kratkih siRNA pa je vključevanje v multimerne kompleks imenovan RISC. Kratke siRNA vodijo kompleks RISC do homolognih tarčnih molekul mRNA (preko parjenja komplementarnih baz med siRNA in tarčno mRNA). Po vezavi kratkih siRNA in tarčnih mRNA sledi razgradnja tarčnih molekul mRNA. S posredovanjem dolgih siRNA se signal prenaša na sosednje celice in po rastlini (Mlotshwa in sod., 2002). Dolge siRNA delujejo tudi na utišanje genov na nivoju transkripcije (TGS). Molekula miRNA z vezavo na proteinski kompleks RISC posredno sproži razgradnjo endogenih tarčnih mRNA ali pa blokado translacije (Voinnet, 2001, Baulcombe, 2002, Silhavy in Burgýán, 2004) (slika 2).

Virusi, ki napadejo celico, so lahko tarča PTGS, aktivatorji PTGS ali pa lahko kodirajo tudi supresor PTGS. Supresor RNA utišanja pri potivirusih, v skupino katerih spada tarčni preiskovan virus PVY<sup>NTN</sup>, je protein Hc-Pro. Spoznanje o supresorjih PTGS daje naslednjo ugotovitev: PTGS je možni naravni obrambni mehanizem rastlin na okužbo z virusi (Fagard in Vaucheret, 2000).



**Slika 2: Model mehanizma utišanja genov pri rastlinah (Silhavy in Burgyán, 2004).**

Pri rastlinah je mehanizem utišanja genov razdeljen na dve osnovni poti a) regulacija razvoja in b) obramba pred parazitskimi nukleinskimi kislinami. Inicijacija poti a. je nastanek dsRNA prekurzorjev, ki jih Dicer-like 1 (DCL1) razreže v 21 nukleotidov dolge miRNA. miRNA se vežejo v kompleks RISC, ki nadzoruje endonukleazni razrez ali blokado translacije tarčne mRNA. Inicijacija poti b. pa je razrez dsRNA ali strukturiranih virusnih transgenov, virusnih genov ali transgenih aberantnih RNA v kratke 21-22 nukleotidov dolge siRNA (kratke siRNA) ter 24-26 nukleotidov dolge siRNA (dolge siRNA). Virusna RdRP generira velike količine virusnih dsRNA, ki jih Dicer razreže v kratke ds siRNA. dsRNA, ki nastanejo iz aberantnih transgenov ali z delovanjem rastlinske RdRP pa so razrezane tako v dolge kot kratke siRNA. Dolge in kratke siRNA molekule se ločijo tako po dolžini kot po funkciji, zato verjetno nastanejo zaradi različne aktivnosti Dicer-ja. Kratke siRNA aktivirajo kompleks RISC za razgradnjo tarčne mRNA ali blokado translacije in hkrati vodijo rastlinsko RdRP do matične mRNA, tako da nastanejo nove dsRNA, ki so ponovno razrezane v kratke ali dolge siRNA. Možno je, da so kratke siRNA odgovorne za širjenje signala na kratke razdalje, medtem ko so dolge siRNA odgovorne za širjenje signala na dalje razdalje in TGS. Določeni virusi kodirajo tudi supresorje mehanizma utišanja genov. Na sliki sta predstavljena dva, to je P19 tombusvirusov in He-Pro potivirusov, ki v različnih korakih blokirata mehanizem utišanja genov (rdeče črte).

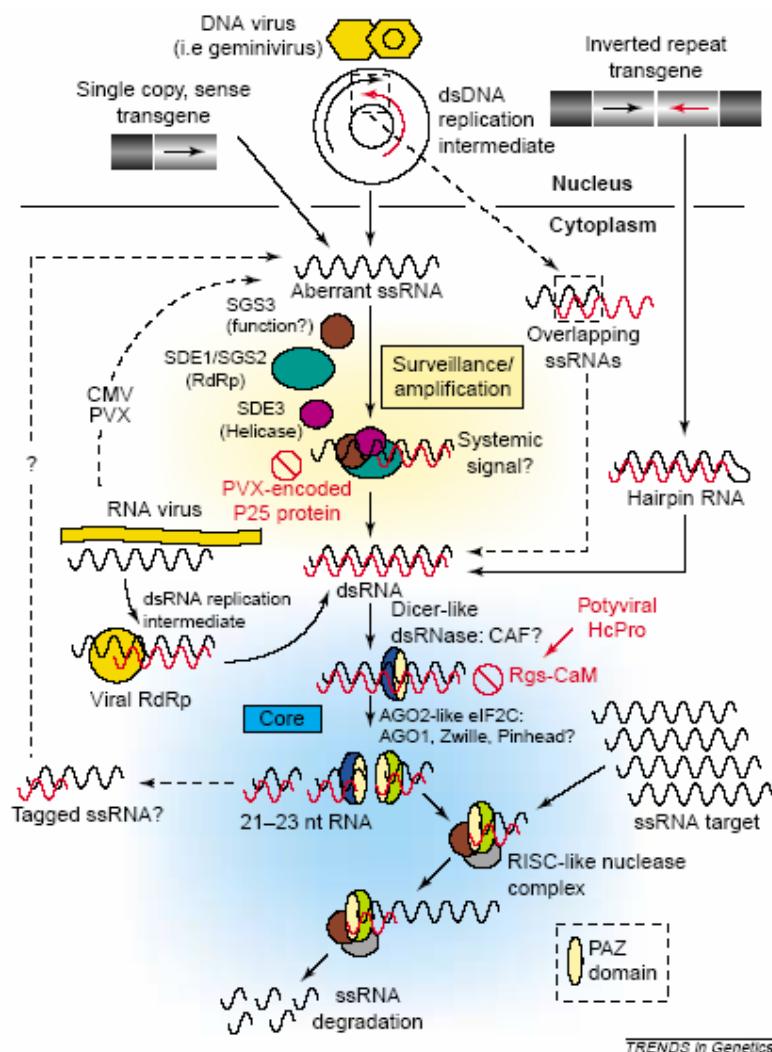
Figure 2: Working model for plant RNA silencing (Silhavy in Burgyán, 2004).

Plant RNA silencing is divided into two main pathways: (a) developmental regulation and (b) defence against parasitic nucleic acids. In the initiation step of developmental regulation, double-stranded (ds) RNA precursors are 'diced' by DICER-LIKE1 (DCL1) into 21-nucleotide miRNA intermediates. miRNAs are recruited into RISC complex, which regulates the endonucleolytic cleavage or translational arrest of target mRNAs. The defence pathways are also initiated by dicing ds or highly structured viral, transgene and transgenic aberrant RNAs into 21–22 nt (short) and 24–26 nt (long) siRNAs. Viral RdRP produced large amount of ds viral RNAs that are diced to short ds siRNAs. By contrast, dsRNAs (which are generated from aberrant transgenic or viral transcript by a plant RdRP) are processed to short and long ds siRNAs. These siRNAs are distinct in size and function, and probably arise from separate Dicer activities. Short siRNAs activate RISC for target cleavage or translational arrest and also guide plant RdRP to amplify dsRNAs, which are diced again to short and long siRNAs. Moreover, these short siRNAs are also responsible for short-distance signaling, whereas the long siRNAs are probably involved in long-distance silencing and TGS. Virus encoded silencing suppressors such as p19 of tombusvirus and HC-Pro of potyvirus block different steps of RNA silencing (indicated by blunt-ended red lines).

#### 2.4.1.1.1 Rastlinska od RNA odvisna RNA polimeraza (RdRP)

Sistem proteinov, ki je odgovoren za sintezo druge verige RNA in za pomnoževanje signala se imenuje RdRP. Sestavljen je iz proteina SGS3, katerega funkcija je neznana, proteina SDE1 in proteina SGS2, ki imata vlogo pri sintezi dsRNA ter proteina SDE3, ki ima še dodatno funkcijo helikaze (slika 3) (Voinnet, 2001). Mourrain in sod. (2000) so s preučevanjem mutant na genih *sgs2* in *sgs3* rastlin *Arabidopsis sp.*, potrdili njihovo vlogo v PTGS. Protein SGS2 je podoben drugim proteinom, ki sestavljajo RdRP v drugih organizmih (npr. *Caenorhabditis elegans*). Protein SGS3 pa nima nobene homologije z že poznanimi proteini v drugih organizmih in le-to nakazuje njegovo posebno vlogo v sistemu PTGS pri rastlinah. Mourrain in sod. (2000) predvidevajo, da protein SGS3 igra vlogo pri tvorbi dsRNA ali pa pri širjenju sistemskega signala. Vlogo pri širjenju signala utišanja genov po rastlini imata verjetno tudi proteina SDE1 in SDE3 (Himber in sod., 2003).

V študiji rastlin tobaka z mutacijami v sistemu RdRP so ugotovili, da so rastline bolj občutljive na okužbo z virusom mozaika kumar (CMV), ne pa tudi na okužbo z drugimi virusi. Mehanizem utišanja genov ne deluje enako proti vsem virusom in obstaja možnost, da določeni virusi ne aktivirajo rastlinske RdRP (Dalmay in sod., 2001).



**Slika 3: Model RNA utišanja, kot odgovor rastline na virusno okužbo (Voinnet, 2001).**

Na sliki je prikazano mesto delovanja kompleksa SDE/SGS proteinov oziroma RdRP, ki detektira in spreminja aberantne RNA v dsRNA. Multimerni RNAzni kompleks imenovan RISC - ena izmed komponent RISC kompleksa so proteini AGO, ki imajo domeno PAZ.

Figure 3: A model of RNA silencing as a response to virus infection in plants (Voinnet, 2001).

SDE/SGS protein complex - RdRP which detects and converts aberrant RNA into dsRNA is shown. Multimeric RNAase complex RISC (RNA Interference Specificity Complex) - one of the components of RISC are AGO proteins, which have PAZ domain.

#### 2.4.1.1.2 DICER-podobni (DICER-Like) rastlinski proteini in nastanek molekul siRNA

Prvi izolirani gen, ki sodeluje pri mehanizmu utišanja genov so izolirali v raziskovalni skupini Jacobsen in sod. leta 1999. Izolirali so ga po pregledu genov mutant rastline *Arabidopsis sp.* in sicer pri mutanti z nenormalno razvitim embrijem, nenormalno ovulo in nenormalnim razvojem cveta. Gen imenovan *Dicer-Like1* (*Dcl1*) kodira protein z večimi domenami in dve od njih sta domeni RNaze III (Schauer in sod., 2002). Kasnejše delo na mutantah rastlin *Ababidopsis sp.* je pokazalo, da je gen *Dcl1* povezan z nastankom molekul miRNA in ne z mehanizmom PTGS (Park in sod., 2002, Reinhart in sod., 2002). Vsa odkritja so nakazovala, da pri rastlinah *Arabidopsis sp.* sodeluje več različnih genov *Dcl*. V nadaljnjih raziskavah so Hamilton in sod. (2002) objavili prisotnost dveh razredov molekul siRNA in sicer 21 do 22 nukleotidov dolge kratke siRNA ter od 24 do 26 nukleotidov dolge molekule imenovane dolge siRNA. Kratke siRNA molekule so bile vključene pri specifični razgradnji mRNA, medtem ko so dolge siRNA molekule sodelovale pri metilaciji homolognega nukleotidnega zaporedja DNA. Schauer in sod. (2002) so ugotovili, da genom rastline *Arabidopsis sp.* kodira štiri različne proteine DCL imenovane DCL-1 do DCL-4. S preučevanjem mutant rastlin *Arabidopsis sp.* je bilo ugotovljeno, da proteina DCL-1 in DCL-3 sodelujeta pri nastanku 21 in 24 nukleotidov dolgih siRNA molekul. Nadaljnjo preučevanje mutant je pokazalo, da je DCL-3 glavni encim za generiranje 24 nukleotidov dolgih siRNA molekul in DCL-1 za generiranje 21 nukleotidov dolgih siRNA molekul (Xie in sod., 2004; Qi in sod., 2005b).

V raziskavah vloge proteina DICER v vinski mušici se je izkazalo, da je le-ta prav tako nujno potreben za nastanek proteinskega kompleksa RISC (Pham in sod., 2004, Lee in sod., 2004, Tomari in sod., 2004) ter da obstaja verjetnost, da bo podoben mehanizem odkrit tudi v rastlinskem sistemu. Natančen biokemijski mehanizem delovanja proteinov DCL-1 in DCL-3 v rastlini *Arabidopsis sp.* ni poznan. Glede na to, da imata oba proteina proteinsko domeno PAZ in dve domeni RNaze III, je mogoče za različen produkt razgradnje, torej 21 ali 24 nukleotidov dolgih siRNA, odgovorna njuna specifična 3-D

struktura (Schauer in sod., 2002). Prav tako so v različnih študijah ugotovili, da imajo proteini DICER inAGO (ki so eden izmed sestavnih proteinov proteinskega kompleksa RISC) skupno domeno imenovano PAZ. Proteinska domena PAZ v sistemu DICER naj bi bila odgovorna za prepoznavanje molekul dsRNA (Song in sod., 2004, Yan in sod., 2003, Lingel in sod., 2003).

#### 2.4.1.1.3 RISC in argonaut proteini

V živalskem svetu molekule siRNA, ki so nastale iz dsRNA, preidejo v proteinski kompleks imenovan RISC, ki vsebuje proteine skupine argonaut (AGO). Proteinski kompleks je nato odgovoren za razrez tarčne mRNA. Pri sesalcih so dokazali, da je protein AGO2 katalitična komponenta RISC kompleksa in direktno odgovoren za razrez tarčne mRNA (Song in sod., 2004, Liu in sod., 2004). Za razrez je odgovorna specifična domena proteina AGO imenovana PIWI. Glede na funkcijo ta protein imenujemo tudi »Slicer«. Predvideva se, da domena PIWI nosi dve funkciji ribonukleaz in sicer iz družine RNaze H nukleaz in transponaz. Leta 2005 so Rivas in sod. dokazali, da je pri humanem proteinu AGO2, za učinkovito utišanje genov, potreben specifičen motiv, imenovan DDH (Asp-Asp-His).

Pri rastlinah je bila dokazana aktivnost kompleksa RISC v ekstraktu zarodnih celic žita in v rastlini *Arabidopsis sp.*, vendar natančna identiteta proteinov AGO še ni poznana (Tang in sod., 2002, Qi in sod., 2005b). V rastlini *Arabidopsis sp.* je vsaj deset različnih proteinov AGO, ki bi lahko sodelovali v mehanizmu utišanja genov. Prvi izmed njih je protein AGO1 (Bohmert in sod., 1998, Carmell in sod., 2002) in je vključen v PTGS (Fagard in sod., 2000, Morel in sod., 2002). Študije homologije desetih proteinov AGO rastlin *Arabidopsis sp.* in človeškega AGO2 so pokazale, da ima osem od desetih proteinov AGO specifičen motiv DDH, ki je katalitično mesto rezanja tarčnih molekul (Rivas in sod., 2005; Qi in sod., 2005). Proteini AGO prav tako sodelujejo pri mehanizmu TGS, katerega potek je mogoče opisati z dvema osnovnima modeloma. Prvi model je direktno parjenje RNA-DNA, drugi model pa je parjenje molekul siRNA in nastajajočega transkripta na

tarčnem delu genoma (Matzke in Birchler, 2005).

#### 2.4.1.1.4 Virusni supresorji mehanizma utišanja genov

Virusi lahko kodirajo supresorje PTGS. Supresor RNA utišanja je pri potivirusih protein Hc-Pro ali v primeru virusa razraščanja in pritlikavosti paradižnika (TBSV) (*Tomato bushy stunt virus*, *Tombusviridae*) protein P19. Trenutno obstajajo trije modeli delovanja supresorjev: delovanje virusnih supresorjev inhibira nastanek virusnih siRNA, supresorji preprečijo vezavo siRNA v proteinske komplekse ali supresorji delujejo direktno na proteinske komplekse (Silhavy in Burgýán, 2004).

Protein P19 blokira širjenje signala utišanja genov po rastlini. Veže se na molekule siRNA oziroma s svojo strukturo (dimer) veže molekule dsRNA in tako prepreči njihovo vezavo v proteinske komplekse (Silhavy in sod., 2002, Zamore, 2004). Protein Hc-Pro blokira PTGS na stopnji kompleksa RISC. Predvideva se, da se veže direktno ali posredno na proteinAGO1 (Mallory in sod., 2001) in tako blokira razgradnjo tarčnih oziroma homolognih nukleinskih kislin ter hkrati blokira razvojno pot rastlinske celice (Kasschau in sod., 2003, Silhavy in Burgýán, 2004).

Spoznanje o virusnih supresorjih PTGS je vodilo do ugotovitve, da je PTGS možni naravni obrambni mehanizem rastlin proti virusni okužbi oziroma proti tujim nukleinskim kislinam, ki vstopijo v rastlino. Rastline jih s tem mehanizmom verjetno prepoznaajo in razgradijo (Fagard in Vaucheret, 2000, Rovere in sod., 2002).

#### 2.4.1.1.5 Pomen mehanizma utišanja genov

Kljud temu, da nobeden od treh osnovnih mehanizmov utišanja genov še ni popolnoma poznan, vse kaže na to, da igrajo siRNA molekule pomembno vlogo pri transkripciji genov, izven delovanja transkripcijskih faktorjev ali drugi regulatorni mehanizmi. Možno je, da so siRNA pravzaprav integratorji drugih genetskih regulatornih mehanizmov. Pomembno vlogo igrajo pri zaščiti celic pri vdorih nukleinskih kislin virusov ali drugih mobilnih genetskih elementov, kjer s pomočjo RdRP nastanejo dsRNA, ki so signal za aktivacijo proteinov kompleksa DICER. V zaščitni vlogi je mehanizem idealen, saj je izredno sekvenčno specifičen in hiter.

Sam mehanizem utišanje genov je postal, v zadnjem času, eno izmed najbolj priljubljenih orodij v raziskovanju funkcionalne genomike in na področju odkrivanja novih učinkovin. Prav tako se z razvojem bazičnega znanja o mehanizmu utišanja genov pojavlja upanje o praktični uporabi v medicini za preprečevanje bolezni ljudi. V teh primerih to imenujemo RNAi (RNA interference). V zadnjem času se že opravljajo študije na celičnih kulturah, kjer je mogoče dokazati utišanje določenih bolezenskih genov s pomočjo mehanizma utišanja genov (Baulcombe, 2005).

#### 2.4.1.1.6 Dokazovanje prisotnosti kratkih siRNA molekul

Identifikacija in karakterizacija molekul siRNA, ki sodelujejo pri mehanizmu utišanja genov je izredno pomembna. Trenutno je v uporabi več različnih metod in ena izmed njih je metoda, ki temelji na hibridizaciji. Osnovni princip metode je ločitev molekul RNA na poliakrilamidnem gelu, čemur sledi prenos na membrano in detekcija s specifičnimi sondami (Aravin in Tuschl, 2005).

## 2.5 MEHANIZMI NARAVNE ODPORNOSTI PROTI PVY

Poznana sta dva tipa monogenske dedovane odpornosti proti okužbi s PVY in sicer:

- Hipersenzitivna rezistenca (HR)

Za HR so odgovorni geni *Ny*. HR je ponavadi specifična za posamezno skupino virusov PVY. Rastline po okužbi s PVY razvijejo simptome na okuženih listih ali nekroze na sistemsko okuženih delih (Jones, 1990).

- Ekstremna rezistenca (ER)

Za ER so odgovorni geni *Ry* in je učinkovita za vse skupine PVY. Rastline po okužbi s PVY ne razvijejo simptomov. Znana sta dva gena *Ry*, ki se uporablja za žlahtnjenje in sicer gen *Ry<sub>sto</sub>* iz vrste *S. stoliniferum* in gen *Ry<sub>adg</sub>* iz vrste *S. tuberosum L. andigena* (Hämäläinen in sod., 1997). Do sedaj še ni poznan različek virusa iz skupine PVY, ki bi presegel to obliko rezistence. Mestre in sod. (2000) v svoji študiji predlagajo, da je za indukcijo ER odgovorna virusna NIa proteinaza in vsaka sprememba v aktivnem mestu NIa proteinaze bi pomenila tudi izgubo proteinazne aktivnosti ter posledično neaktivnost virusa. To ugotovitev so kasneje ovrgli z novo študijo, kjer predlagajo, da za indukcijo ni odgovorna le NIa proteinaza temveč so potrebne še dodatne raziskave indukcije ER (Mestre in sod., 2003).

V žlahtnjiteljskih programih se uporablja vnos genov *Ry*. Predvideva se, da je razvoj PVY<sup>NTN</sup> verjetno odgovor na seleksijske pritiske povzročene z vnosom rezistentnih genov v krompir. Glede na dejstvo, da izolati PVY<sup>NTN</sup> okužujejo tudi druge poljščine, obstaja možnost, da se bo njihova patogenost še dodatno povečala in presegla z geni *Ry* posredovano ER (Valkonen, 1994, Valkonen, 1997).

## 2.6 Z VNOSOM TRANSGENOV POSREDOVANA ODPORNOST

V zadnjem desetletju se razvijajo metode, s katerimi vnašamo v genom rastlin eksogeno DNA nukleotidno zaporedje, z željo, da bi s pomočjo vnesenih genov izrazili določeno lastnost v rastlini. Transformacija lahko teče posredno z uporabo bakterij, npr. bakterije *Agrobacterium tumefaciens*, ali neposredno, z uporabo kemijskih in fizikalnih metod (Žel,

1996, Acosta in sod., 1999).

Fenomen navzkrižne zaščite je prvi opisal McKinney leta 1939, ko je ugotovil, da predhodna okužba gostiteljske rastline z milejšim različkom virusa ščiti rastlino pred poznejšimi okužbami z bolj virulentnimi različki istega virusa. Navzkrižno zaščitene rastline kažejo milejše oblike simptomov, časovno zakasnitev v razvoju simptomov ali celo odsotnost sistemskih simptomov. Fenomen navzkrižne zaščite je najizrazitejši med bolj sorodnimi različki nekega virusa in je povsem neučinkovit med nesorodnimi ali daljno sorodnimi virusi (Hackland in sod., 1994).

Razumevanje pojava navzkrižne zaščite je povod za sodobne biotehnološke metode transformacije rastlin in sicer s kloniranjem potivirusnih genov v genom rastline ter posledičnim pojavom od povzročitelja bolezni odvisne odpornosti. Powell-Abel in sod. so leta 1986 prvi vnesli gen za CP virusa mozaika tobaka (TMV) (*Tobamoviridae*) v rastline tobaka in dokazali, da so bile transgene rastline, v katerih je prišlo do izražanja gena za CP, odporne na okužbo z TMV (Acosta in sod., 1999). Ta raziskava je bila osnova za nadaljnje raziskave vzpostavitve odpornosti z vnosom gena za CP, drugih genov virusa (geni za CP, replikaze, proteinaze, gibalne proteine, satelitne RNA) ali nevirusnih genov (rastlinski geni).

S plaščnim proteinom posredovana odpornost se je izkazala za zelo uspešno (Beachy in sod., 1990). Po letu 1990 je tako sledilo še mnogo drugih transformacij različnih rastlin. Pri nekaterih je bilo ugotovljeno, da za vzpostavitev odpornosti ni bilo potrebno izražanje proteina, temveč je za pojav odpornosti zadostovala že sama akumulacija virusnih nukleinskih zaporedij (Lindbo in sod., 1993, Dougherty in sod., 1994). Mehanizem odpornosti še ni popolnoma poznan in se verjetno med različnimi virusi razlikuje. Poznamo dva glavna mehanizma. Pri prvem mehanizmu je izražanje transgenega proteina nujno (Powell-Abel in sod., 1986). Proces naj bi temeljil na zaviranju razstavljanja virusnih delcev, onemogočanju transporta virusov po rastlini ali pa na inhibiciji replikacijskega ciklus virusa (Baulcombe, 1996). Pri drugem mehanizmu pa za odpornost

zadostuje že akumulacija transgenih nukleinskih kislin, npr. transformacija rastlin z nefunkcionalnim genom CP (Dougherty in sod., 1994, Acosta s sod. 1999). Mehanizem pri tej obliki rezistence temelji na identičnosti nukleotidnih zaporedij. pride do preprečitve pomnoževanja in širjenja podobnih RNA virusov (Baulcombe, 1996). Slednji mehanizem temelji na mehanizmu utišanja genov ali tako imenovano z RNA posredovano rezistenco, ki temelji na identičnosti nukleotidnih zaporedij med transgenom in virusnim genomom (Baulcombe, 1996). Pri tem post-transkripcijskem utišanju genov (PTGS) pride do izgube kopiranja mRNA transgena in homolognih virusnih genov v transgenih rastlinah (Han in sod., 1999).

## 2.7 METODE ZA ŠTUDIJ IZRAŽANJA GENOV IN TRANSGENOV

Metode za ugotavljanje sprememb v strukturi in izražanju genov nam omogočajo preučevanje mehanizmov različnih bioloških procesov. Poznamo več metod, ki se ločijo po številu tarčnih genov, ki jih lahko hkrati preiskujemo.

Podobno je pomembna tudi analiza stopnje izražanja umetno vnesenega gena, saj danes spada transformacija rastlin med eno izmed najpomembnejših orodij, tako v rastlinski biologiji kot v rastlinski biotehnologiji. Kljub temu, da je osnovni princip transformacij že precej poznan, ostaja še veliko neznank, kot so nepojasnjene razlike med posameznimi neodvisnimi transgenimi linijami, ki so bile transformirane pod istimi pogoji in z enakim tujim genom. Razlike med transgenimi linijami se ponavadi odražajo tudi v različnem izražanju transgena v določeni liniji, zato je potrebna zanesljiva in učinkovita metoda za dokazovanje izražanja posameznega transgena.

Osnovni metodi za določanje izražanja posameznega gena sta bili do nedavnega dve in sicer northern prenos (Northern Blot) in RT-PCR metoda. Obe metodi omogočata kvalitativno in semi-kvantitativno analizo določenih RNA. V zadnjem času pa sta k zmogljivosti preučevanja izražanja genov pripomogli metodi kvantitativnega PCR v

realnem času (Q-PCR) in mikromreže.

Northern prenos je hibridizacijska tehnika, pri kateri detekcijo iskanega gena določamo s pomočjo radioaktivno ali fluorescenčno ali luminiscenčno označene DNA ali RNA sonde, ki je specifična za iskano molekulo mRNA. Metodo so razvili leta 1977 Alwine in sod. ter se do danes ni veliko spremenila. Izvajanje metode je precej zamudno, saj poteka več dni in pri delu se uporablja več zdravju škodljivih kemikalij (formaldehid, dietil-pirokarbonat). Semi-kvantitativne rezultate lahko dobimo s pomočjo nanašanja in razredčevanja posameznih vzorcev ali pa s pomočjo različnega časa detekcije, ki ga uporabljamo pri merjenju uspele hibridizacije.

Druga znana metoda je metoda kombinacije reverzne transkripcije (RT) in klasične verižne reakcije s polimerazo (PCR). PCR je v bistvu metoda »*in vitro*« za sintezo nukleinskih kislin, s katero lahko v kratkem času sintetiziramo veliko število kopij želenega odseka DNA ali RNA. Metoda je časovno hitrejša od northern prenosa, za analizo pa zadostuje že zelo majhna količina vzorca. Detekcija poteka po končanem pomnoževanju z elektroforezno ločbo na agaroznem gelu (Louie in sod., 2000), kjer preverimo končno količino nastalih produktov PCR oziroma pomnoženih odsekov DNA oziroma RNA. Metoda je uporabna na mnogih raziskovalnih področjih. Glavni problem predstavlja natančno ovrednotenje količine nastalega produkta PCR, ki poteka v plato fazi reakcije. V poznejših ciklih pomnoževanja se namreč reakcija postopoma upočasni zaradi porabe sestavin reakcijskih zmesi, manjše aktivnosti DNA-polimeraze in kopičenja inhibitornih produktov. Število produktov PCR se ne podvojuje več v vsakem ciklu, ampak narašča počasneje, dokler ne doseže platoja, ko se reakcija ustavi (Freeman in sod., 1999, Ginzinger, 2002). Zato je metoda bolj kot ne semi-kvantitativna kot kvantitativna.

V nadaljevanju je bilo predlaganih več izboljšav, ki bi omogočile kvantitativnost PCR metode. Ena takih izboljšav je bila uporaba kompetitivne PCR tehnike. Ta tehnika omogoča izboljšanje kvantitativnosti na račun tekmovanja med dvema fragmentoma, ki se pomnožujeta znotraj iste PCR reakcije in pri tem tekmujeta za reakcijske zmesi (Kim in

sod., 2002).

Holland je leta 1991 predstavil novo tehniko, ki omogoča merjenje nastanka produkta PCR v eksponentni fazi PCR reakcije, ko lahko iz količine nastalega produkta PCR natančno sklepamo o začetni količini tarčnega materiala. Najenostavnejša oblika te detekcije se imenuje semi-kvantitativni PCR in je zbirka reakcijskih mešanic z enako količino tarčnega materiala. PCR reakcijo ustavimo po vsakem ciklu in jo nanesemo na agarozni gel, kjer merimo jakost ter količino nastalega produkta PCR. Pri večji količini dodanega tarčnega materiala se produkt PCR na gelu pokaže prej, torej pri nižjem številu ciklov, pri višjem številu ciklov pa v primeru nižje količine dodanega tarčnega materiala. Na ta način je mogoče določiti cikel, pri katerem se pojavi iskan produkt PCR. Sama tehnika ni v širši uporabi saj je tehnično zamudna in zahteva precejšno optimizacijo za dosego linearne območja kvantifikacije (Freeman in sod., 1999).

### **2.7.1 KVANTITATIVNO POMNOŽEVANJE S POLIMERAZO V REALNEM ČASU**

Z razvojem kemije se je vedno bolj razvijala metoda, ki jo danes imenujemo verižna reakcija s polimerazo v realnem času (Q-PCR). Q-PCR predstavlja nadgradnjo klasične PCR tehnike in omogoča pomnoževanje ter detekcijo produktov PCR med potekom reakcije. Detekcija poteka na osnovi merjenja sproščene fluorescence. Trenutno obstaja več kemijskih metod (»TaqMan®« kemija (Holland in sod., 1991), »Scorpions« (Whitcombe in sod., 1999) in tudi več inštrumentov z različnimi viri svetlobe in različnimi detektorji (LightCycler (Roche, ZDA), ABI PRISM 7900HT (Applied Biosystems, ZDA), ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems, ZDA), iCycler (BIO-RAD, ZDA) (Bustin, 2005)). Ne glede na različne kemijske metode in tehnologije ostaja skupen princip, detekcije količine nastalega produkta PCR med PCR reakcijo. Končni rezultat je podan kot časovna točka oziroma število ciklov (C<sub>t</sub>), pri katerem zaznamo porast fluorescence v eksponentni fazi PCR reakcije. Nov pristop nam omogoča natančno in kvantitativno analizo nukleinskih kislin.

Prednosti Q-PCR so širok dinamični interval kvantifikacije, visoka občutljivost in velika natančnost. Zaradi direktne detekcije signalov med pomnoževanjem, ni več potrebe po dodatnem koraku detekcije produktov PCR na agaroznem gelu in tako nam Q-PCR omogoča rokovanie z veliki številom vzorcev brez strahu pred navzkrižno kontaminacijo (Bustin, 2002, Ginzinger, 2002, Klein, 2002, Yano in sod., 2002, Wall in Edwards, 2002).

Dandanes se Q-PCR uporablja tako za DNA kot za RNA kvantifikacijo na različnih področjih raziskovanja, na primer na področju prehrambene industrije (Brodmann in sod., 2002), mikrobiologije (Mackay, 2004) in humane medicine (Giulietti in sod., 2001).

Q-PCR je namenjen številnim aplikacijam in ena izmed pomembnejših je merjenje količine mRNA. Metoda se masovno uporablja za detekcijo izražanja genov in ugotavljanja vzorcev izražanja genov (Czechowski in sod., 2004). Metoda omogoča primerjanje izražanja tarčnih mRNA med različnimi vzoreci (Leutenegger in sod., 1999). V zadnjih letih se metoda vse pogosteje uporablja v rastlinski molekularni biologiji za določanje števila kopij transgena (Ingham in sod., 2001; Song in sod., 2002), analize zigotnosti transgenih rastlin (Schmidt in Parrott 2001; German in sod., 2002), določanje izražanja GUS (Schaart in sod., 2002) in izražanja transgenov (Toplak in sod., 2004).

Za ugotavljanje nastalih produktov PCR lahko uporabljamo nespecifično ali specifično detekcijo.

#### 2.7.1.1 Nespecifična detekcija nastalih produktov PCR

V tem primeru gre za uporabo nespecifičnih barvil, ki se vgradijo v dvoverižno DNA (dsDNA). Eno izmed dalj časa uporabljenih takšnih barvil je etidijev bromid (EtBr), ki se uporablja pri detekciji produktov PCR na agaroznem gelu. V današnjem času se v Q-PCR uporablja barvilo imenovano SYBR Green I, ki pri enaki količini dsDNA oddaja močnejši

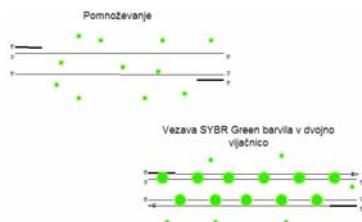
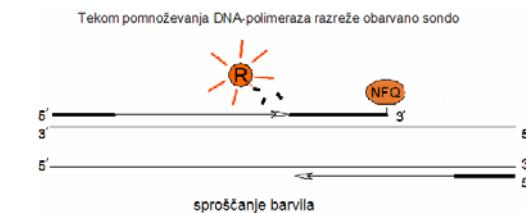
signal. Nevezan SYBR Green I ima v prosti obliki nezaznavno fluorescenco, ob vgradnji v dvovijačno DNA pa ob ekscitaciji močno fluorescira. Tekom Q-PCR reakcije oziroma v fazi podaljševanja se SYBR Green I vgradi v nastajajočo dvočleno DNA in fluorescira (slika 4a). Količina fluorescence je prenosorazmerna količini nastale dvočlene DNA. Slabost uporabe barvila SYBR Green I je, da se vgradi v vsako nastalo dvočleno DNA in tako detektiramo specifične in nespecifične produkte PCR. Nastanek nespecifičnih produktov PCR in dimerov oligonukleotidnih začetnikov preverimo z uporabo disociacijske krivulje. Disociacijska krivulja je dodatna stopnja, ki se izvaja po končanem Q-PCR protokolu in predstavlja spremembo fluorescenčnega signala v odvisnosti od temperature taljenja ( $T_m$ ) (melting temperature). Disociacijsko krivuljo dobimo z merjenjem fluorescence med postopnim dviganjem temperature od 60 °C do 95 °C. Pri določeni  $T_m$  pride do disociacije dvočlennega produkta PCR in sproščanja barvila SYBR Green I. Fluorescensa pada zaradi sproščanja barvila SYBR Green I. Če tekom reakcije Q-PCR nastane več produktov PCR, lahko na grafu disociacijske krivulje ločimo več različnih produktov PCR z različnimi  $T_m$ . Ključnega pomena pri uporabi barvila SYBR Green I je optimizacija reakcijske mešanice, tako da zmanjšamo nastanek nespecifičnih produktov in dimerov oligonukleotidnih začetnikov (Giulietti in sod., 2001). Uporaba reakcije nespecifične detekcije z barvilo SYBR Green I je iz ekonomskega stališča upravičena ob natančni optimizaciji vseh stopenj reakcije.

#### 2.7.1.2 Specifična detekcija nastalih produktov PCR

Specifična detekcija poteka z uporabo hidrolizirajočih sond, ki jih v reakciji uporabljamо poleg klasičnih začetnih oligonukleotidov. Vezavno mesto za sondu se nahaja na tarčni molekuli DNA med mestoma vezave obeh oligonukleotidnih začetnikov. Najpogostejša je uporaba hidrolizirajočih sond ali TaqMan® kemijske metode (Lovatt, 2002). TaqMan sonda je kratek, umetno sintetiziran oligonukleotid, ki je na 5' in 3' terminalnem koncu označena z fluorofori. Barvilo, vezano na 5' terminalnem koncu imenujemo reportersko barvilo (reporter), barvilo vezano na 3' terminalnem koncu pa dušilec (quencher). Med potekom Q-PCR reakcije merimo fluorescenco receptorske molekule, ki se povečuje

sorazmerno s količino nastalega produkta PCR. Kadar sta dva fluorofora, katerih ekscitacijski in emisijski spekter se prekrivata, dovolj blizu, se svetloba, ki jo po eksitaciji emitira receptorska molekula, absorbira z dušilcem. V primeru TaqMan sonde je to takrat, ko je sonda nerazgrajena, v raztopini ali vezana na tarčno molekulo. V tem primeru signala donorja ne zaznamo. Mehanizem, s pomočjo katerega dušilec pretvori oziroma odda energijo, ki jo je sprejel od donorja, imenujemo FRET mehanizem oziroma mehanizem fluorescenčnega resonančnega prenosa energije iz donorske na akceptorsko molekulo. Med potekom Q-PCR reakcije se vsi trije oligonukleotidi, oba začetna oligonukleotida in sonda, vežejo na homologna mesta na tarčni molekuli. DNA-polimeraza začne sintetizirati homologno verigo na odseku med obema začetnima oligonukleotidoma. Zaradi 5'-eksonukleazne aktivnosti DNA-polimeraze, pride v tem koraku do razgradnje oziroma hidrolize vezane sonde. Obe barvili, vezani na sondi, se sprostita v raztopino, razdalja med njima se poveča, zato dušilec ne prestreza več fluorescence receptorske molekule. Fluorescenza receptorske molekule se poveča in je sorazmerna količini nastajajočega produkta PCR (Slika 4b). Fluorescenco merimo v vsakem ciklu Q-PCR reakcije.

Na osnovi izmerjenih podatkov (fluorescence reporterskega barvila ali vezanega barvila SYBR Green I) tekom PCR reakcije izrišemo krivuljo, ki podaja odvisnost jakosti fluorescence vzorca od števila ciklov. Izrisana krivulja merjenja sproščene fluorescence po času je nadgradnja klasične PCR reakcije, pri kateri smo merili samo končno količino nastalih produktov PCR.

**Slika 4a****Slika 4b****Slika 4a in 4b: Način detekcije v Q-PCR reakcijah.**

a. SYBR Green I; b. TaqMan

Figure 4a and 4b: Mechanism of detection in Q-PCR reactions.

a. SYBR Green I; b. TaqMan

### 2.7.2 UPORABA MIKROMREŽ

Metode, opisane do sedaj, omogočajo spremljanje izražanja posameznega gena, nova tehnologija mikromrež pa je naravnana k detekciji več tisočih tarčnih genov naenkrat (Schena in sod., 1995).

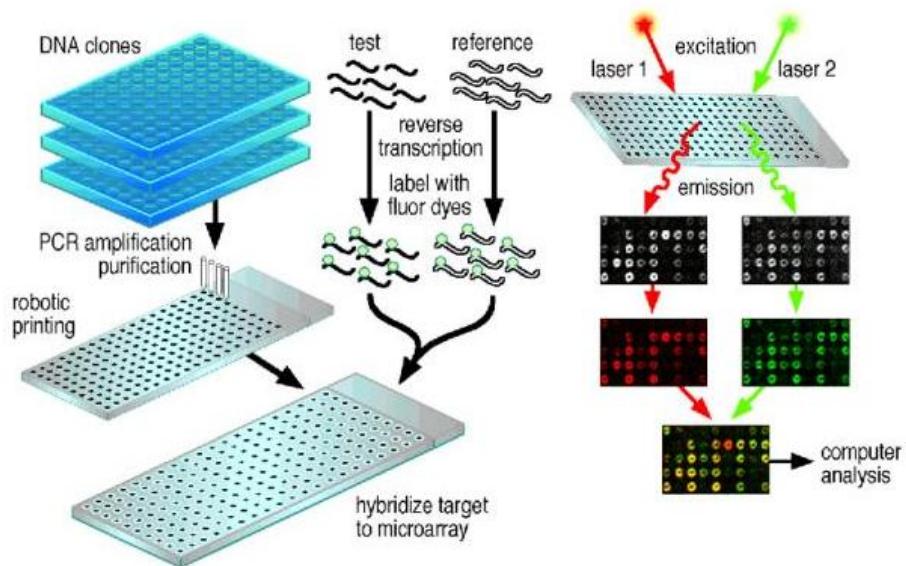
Mikromrežo predstavljajo sistematično urejene molekule (oligonukleotidi, produkti PCR, plazmidi, genomska DNA), ki so pritrjene na podlago. Na eni mikromreži v velikosti objektnega stekelca je lahko nanesenih tudi do 30 000 molekul npr. cDNA. Vsaka nanesena molekula cDNA odgovarja nukleotidnemu zaporedju enega gena. S hibridizacijo cDNA vzorca z molekulami na mikromreži, ugotavljamo količino odgovarjajoče mRNA v vzorcu (Barrett in Kawasaki, 2003). Osnova tehnike je hibridizacija s fluorescentnimi barvili označenih cDNA vzorcev na mikromreže. Ob prisotnosti iskane cDNA v vzorcu, se le-ta veže na homologno zaporedje na mikromreži. Z optimiziranimi postopki hibridizacije, ostane vezana le označena cDNA. Po končani hibridizaciji odčitamo fluorescenco barvil s specifičnim optičnim čitalcem. Končni rezultat hibridizacije predstavlja slika mikromreže, ki jo je potrebno s pravilnimi metodami analizirati (slika 5)

(Aharoni in Vorst, 2002, Venkatasubbarao, 2004).

Trenutno se metoda uporablja večinoma v raziskovalne namene na različnih področjih. Uporablja se za ugotavljanje ekspresijskih profilov tekom določenih bioloških procesov, določevanje točkastih mutacij ali študij interakcij med patogenimi in gostiteljskimi organizmi (Aharoni in Vorst, 2002, Harrington in sod., 2000, Panda in sod., 2003, Gregersen in sod., 2005, Rensink in Buell, 2005).

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

Mikromreže se uporabljajo za študij interakcije rastlina-povzročitelj bolezni, na primer interakcije med *A. thaliana* in virusom TMV (Golem in Culver; 2003), interakcije med *N. benthamiana* in virusom nekrotične pegavosti vodenke INSV (*Impatiens necrotic spot virus*) ali virusom rumene mrežavosti škrbinke SYNV (*Sonchus yellow net virus*) (Senthil in sod., 2005), interakcije med *A. thaliana* in glivo *Alternaria brassicicola* (Schenk in sod., 2000) v zadnjem času pa so vedno bolj priljubljeno orodje za odkrivanje samih interakcij kot rastlinskih obrambnih signalnih poti v različnih rastlinskih vrstah (Wan in sod., 2002).

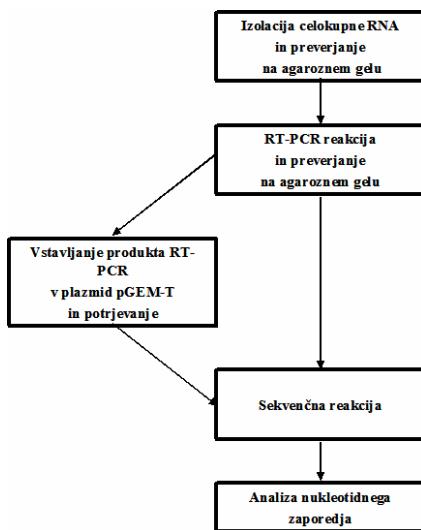


**Slika 5: Model tehnologije mikromrež (Bruvoll, 2006).**

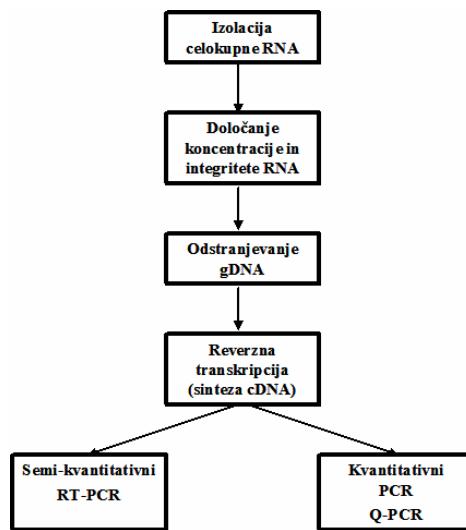
Figure 5: Model of microarrays technique (Bruvoll, 2006).

### 3 MATERIALI IN METODE

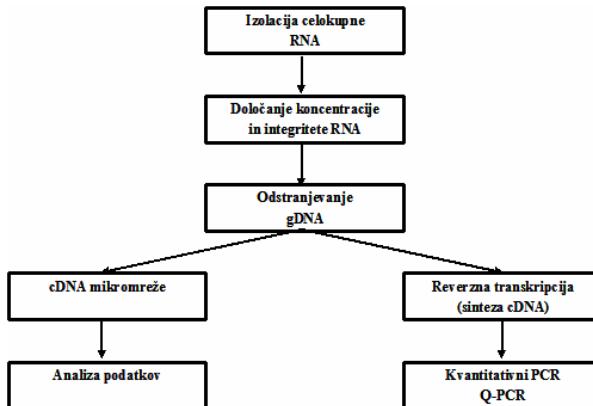
**Slika 6a**



**Slika 6b**



**Slika 6c**



**Slika 6: Shema eksperimentalnega dela.**

- a. Določanje nukleotidnega zaporedja virusa PVY<sup>NTN</sup>-NIB; b. Vzpostavitev Q-PCR metode za kvantitativno določanje izražanja transgena; c. Preučevanje mehanizma utišanja genov v transgenih rastlinah krompirja  
cDNA – komplementarna DNA, gDNA – genomska DNA, PCR – verižna reakcija s polimerazo.

Figure 6: Scheme of the experimental work.

- a. Sequencing of PVY<sup>NTN</sup>-NIB genome; b. Introduction of Q-PCR method for quantitative determination of transgene expression; c. Study of gene silencing mechanism in transgenic potato plants  
cDNA – complementary DNA, gDNA – genomic DNA, PCR – polymerase chain reaction.

### 3.1 MATERIALI

#### 3.1.1 VIRUSI

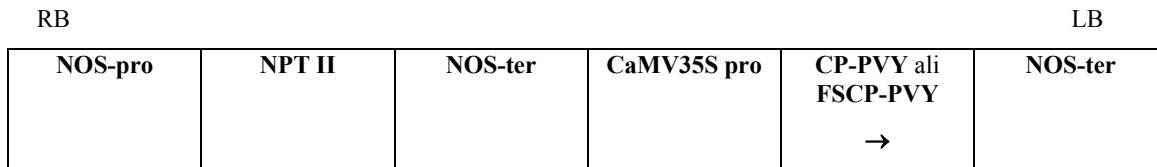
##### 3.1.1.1 VIRUSNI IZOLAT PVY<sup>NTN</sup>-NIB

Slovenski izolat virusa PVY<sup>NTN</sup>-NIB, ki smo ga uporabljali pri raziskovalnem delu, je bil izoliran v Sloveniji, iz gojenega krompirja *S. tuberosum L.* sorte 'Igor' (Kus, 1994). Virusni izolat je vzdrževan na krompirju *S. tuberosum L.* sorte 'Pentland Squire', gojenih v tkivni kulturi v komorah za tkivne kulture v reguliranih pogojih (poglavlje 3.1.8). Virus smo namnožili na tobaku *N. tabacum L.* sorte 'Samsun' (De Bokx in Hutting, 1981). Liste tobaka smo uporabljali kot vir virusa za nadaljnje inokulacije rastlinskega materiala.

#### 3.1.2 RASTLINSKI MATERIAL

##### 3.1.2.1 *Solanum tuberosum L.* sorte 'Igor'

Testiranje mehanizmov odpornosti na PVY<sup>NTN</sup> in uvajanje metode za hitrejše testiranje transgena je potekalo na transgenih linijah krompirja slovenske sorte 'Igor', vzgojenih v okviru diplomskega naloga Demšar (1998) in Štrucl (2000) ter raziskovalnega dela Stanič-Racman in sod. (2001). V rastline krompirja sorte 'Igor' je bil s pomočjo bakterije *A. tumefaciens* (sev LBA 4404) vnesen gen, ki kodira plaščni protein (CP) virusa PVY<sup>NTN</sup> (CP-PVY) ali gen s premaknjениm odprtim bralnim okvirjem, ki kodira nefunkcionalen plaščni protein virusa PVY<sup>NTN</sup> (FSCP-PVY). Blok genov, ki je bil vnesen v *A. tumefaciens*, s katerim so transformirali rastline je prikazan na sliki 7 (Stanič in sod., 1999, Stanič-Racman, 2002).



**Slika 7: Blok genov, ki je bil vnesen v *A. tumefaciens*, s katerim so transformirali rastline krompirja ali tobaka (Stanič-Racman in sod., 1999).**

(LB - levo mejno zaporedje T-DNA; NOS-pro – nopaline sintetazni promotor; NOS-ter – nopaline sintetazni terminator; NPT II – neomicin fosfotransferazni II gen; CaMV 35S pro – 35S promotor virus mozaika cvetače (CaMV); CP-PVY – gen, ki kodira CP virusa PVY<sup>NTN</sup>; FSCP-PVY – gen s premaknjenim odprtim bralnim okvirjem, ki kodira nefunkcionalni CP virusa PVY<sup>NTN</sup>; RB - desno mejno zaporedje T-DNA. Puščica (→) označuje orientacijo gena za CP.

Figure 7: Transgene construct introduced to potato or tobacco plants via *A. Tumefaciens* (Stanič-Racman in sod., 1999).

(LB) T-DNA left border sequence; (NOS-pro) nopaline synthase promoter; (NOS-ter) nopaline synthase terminator; (NPT II) neomycin phosphotransferase II gen; (CaMV 35S pro) cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promotor; (CP-PVY) CP gene of PVY<sup>NTN</sup>; (FSCP-PVY) frame shift CP gene of PVY<sup>NTN</sup>; (RB) T-DNA right border sequence. Arrow (→) indicates orientation of CP gene.

Kot kontrole so bile uporabljene zdrave netransgene rastline krompirja sorte 'Igor' vzgojene in vzdrževane v tkivni kulturi.

Testne rastline krompirja smo namnožili z nodijsko kulturo iz rastlin vzgojenih v tkivni kulturi.

### 3.1.2.2 *Nicotiana tabacum* L. sorte 'Samsun'

Zdrave rastline tobaka *N. tabacum* L. sorte 'Samsun' smo namnožili z nodijsko kulturo iz zdravih rastlin vzgojenih v tkivni kulturi in jih uporabili kot propagacijske rastline za množenje slovenskega izolata PVY<sup>NTN</sup>-NIB (De Bokx in Hutting, 1981). Izvorni material virusa so bile nodijske tkivne kulture krompirja *S. tuberosum* L. sorte 'Pentland Squire'. Karborund smo nanesli na liste tobaka in jih premazali s krompirjevim sokom. Po 14 dneh smo opazovali simtome na tobakovih listih in na ta način potrdili virusno okužbo. V določenih primerih smo potrdili prisotnost virusa še z metodo DAS-ELISA. Listi s simptomimi so nam služili kot izvorni material za izolacijo slovenskega izolata virusa

PVY<sup>NTN</sup>-NIB in za inokulacijo preučevanih transgenih linij krompirja.

Testirali smo transformirane linije rastlin tobaka *N. tabacum L.* sorte 'Samsun' vzgojene v okviru diplomskih nalog Toplak (2000) in Dular (2001). Transformirane rastline tobaka imajo vnesen gen, ki kodira CP virusa PVY<sup>NTN</sup> (CP-PVY) ali gen s premaknjenim odprtим bralnim okvirjem, ki kodira nefunkcionalen CP virusa PVY<sup>NTN</sup> (FSCP-PVY) (slika 7).

Transformirane linije tobaka so bile modelne rastline pri razvoju metode za hitrejšo določanje izražanja transgena v transformiranih rastlinah tobaka s Q-PCR tehniko.

### **3.1.3 BAKTERIJE**

#### **3.1.3.1 Bakterija *Escherichia coli***

V primeru vstavljanja produktov RT-PCR v plazmide, z namenom določanja nukleotidnega zaporedja produktov RT-PCR, smo uporabljali kompetentne celice *E. coli* sev DH5α, ki smo jih dobili iz Instituta Jožef Stefan (IJS), Ljubljana, Slovenija.

### **3.1.4 OLIGONUKLEOTIDNI ZAČETNIKI**

#### **3.1.4.1 Oligonukleotidni začetniki - določanje nukleotidnega zaporedja genoma PVY<sup>NTN</sup>-NIB**

Oligonukleotidni začetniki, uporabljeni v RT-PCR reakcijah in za določanje nukleotidnega zaporedja virusnega izolata PVY<sup>NTN</sup>-NIB, so podani v preglednici 1.

**Preglednica 1: Uporabljeni oligonukleotidni začetniki v RT-PCR reakcijah in sekvenčnih reakcijah z namenom določanja nukleotidnega zaporedja slovenskega izolata PVY<sup>NTN</sup>-NIB.**

Številčna oznaka v imenu začetnega (S) (sense) in končnega (AS) (antisense) oligonukleotidnega začetnika pomeni položaj oligonukleotidnega začetnika v genomu izolata PVY<sup>NTN</sup>-H (Thole s sod., 1993).

Table 1: Primers used for RT-PCR reactions and sequencing reactions in determination of PVY<sup>NTN</sup>-NIB genome sequence.

The number in the name of primer means a position of primer at genome sequence PVY<sup>NTN</sup>-H (Thole s sod., 1993). S – sense primer; AS – antisense primer.

Ime oligonukleotidnega začetnika	5' – 3' orientacija
10 S	ACAACTCAATAACAACATAAGA
3 S (Hu 2)	ATTAAAACAACCTCAATACAACATAAG
570 S	GTCATTCACTACAACCTCCAAG
870 S	AAGGGGTGATAGTGGAGT
1170 S	GCATTGATGACACACAGTAT
1480 S	GCTCGTGAATGGCAG
1585N S	CTATCTGCCAAAGCAAATTGG
1670 S	ACAAAGGGAGTATCATGC
1750 S	TGCATATAACTGCCAGTG
2160 S	CCAAAGCTTGGAACCTGGCAAC
2210 S	TGCTCAAATGAGAATATTCT
2480 S	ATAATGTCTGAGTCGGC
2730 S	GCACAGAGGATTATAATTGA
2900 S (Nat 2900 S)	CGAGCGTCGTACAGATCAT
3280 S	AGTGGCAGTGTGTCAGGCAATAA
3480 S	GGAAGAATATGATGTGCG
3730 S	AGAAATCGAACCGTACT
3825 S	GAGGGGCACTTCATGGAATT
4050 S (koh 3)	CTGATGCGCGAAATAG
4350 S	CAATCATTGTTGATGCAC
4430 S	GTGTCGAGCTACAATGAAGT
4530 S (lang 4)	ACGAAAGGGACTAGTGCA
4840 S	TTGCCAGTGATGACAG
5460 S	GAGAAAGTGAGAAGTCA
5930 S	TTCATCCAATTGTTGATCC
5980 S	GAAGAGAATGTCTATGCTG
5320 S	TATATAGCAAGCATGGCAT
5460 S	GAGAAAGTGAGAAGTCA
5460 S	GAGAAAGTGAGAAGTCA
5930 S	TTCATCCAATTGTTGATCC

se nadaljuje

## nadaljevanje

### **Preglednica 1: Uporabljeni oligonukleotidni začetniki v RT-PCR reakcijah in sekvenčnih reakcijah z namenom določanja nukleotidnega zaporedja slovenskega izolata PVY<sup>NTN</sup>-NIB.**

Številčna oznaka v imenu začetnega (S) (sense) in končnega (AS) (antisense) oligonukleotidnega začetnika pomeni položaj oligonukleotidnega začetnika v genomu izolata PVY<sup>NTN</sup>-H (Thole s sod., 1993).

Table 1: Primers used for RT-PCR reactions and sequencing reactions in determination of PVY<sup>NTN</sup>-NIB genome sequence.

The number in the name of primer means a position of primer at genome sequence PVY<sup>NTN</sup>-H (Thole s sod., 1993). S – sense primer; AS – antisense primer.

Ime oligonukleotidnega začetnika	5' – 3' orientacija
5980 S	GAAGAGAATGTCTATGCTG
6270 S	AGGAGGTGGAGCATGAAG
6438 S (Nat 6438 S)	AGTGTCTGCTGAATATGGAA
7170 S	TTCTTCAGGCCTTGAT
7830 S	TCAGAACACATACATGG
8072 S (Nat 8072 S)	ACTTATTGATTGCTGTGAAT
8380 S	CACCAAATCAGGAGATTC
8812 S (Nat 8812 S)	TCAAATACTCGAGCAACTC
8910 S	CTGTGATGAATGGGCTTA
Nat 9295	CAAGAGGAGAACACAGAGA
9325 S	CACAAGAGGAGAACACA
320 AS	CTAAGCTGCATCTCCAAAC
890 AS UNI	TTCAAGATGACTCCACTATC
1170 AS UNI	GCACGGTAGGATACTGTGTG
1490 AS	TGCCATTGAGCTGTATT
1710 AS UNI	CCTTGCTGGATCAATTCC
2020 AS UNI	CATCTCAGAACCCCCCTTGGTA
2430 AS	GTTGATGAACGAACGTCAA
2465 AS	CATTATAACTCCTCCCTCT
2465 AS UNI	CATTATAACTCCTCCCTCT
2780 AS UNI	GAACCCATCACACGTAG
2850 AS	GGGTATCATCACATTCTTCT
2850 AS UNI	GGGTATCATCACATTCTTCT
2880 AS (Nat 2880 AS)	CCTTGAATAGGGTATCATCA
3355 AS (Nat 3355 AS)	ATCTCATTCTCTATCTGC
3410 AS UNI	CAATGTAACATCCCAGTG
3480 AS	CATCTGCGCTTGAGC
3800 AS	TGTCCCATCTGGATTG

se nadaljuje

## nadaljevanje

### Preglednica 1: Uporabljeni oligonukleotidni začetniki v RT-PCR reakcijah in sekvenčnih reakcijah z namenom določanja nukleotidnega zaporedja slovenskega izolata PVY<sup>NTN</sup>-NIB.

Številčna oznaka v imenu začetnega (S) (sense) in končnega (AS) (antisense) oligonukleotidnega začetnika pomeni položaj oligonukleotidnega začetnika v genomu izolata PVY<sup>NTN</sup>-H (Thole s sod., 1993).

Table 1: Primers used for RT-PCR reactions and sequencing reactions in determination of PVY<sup>NTN</sup>-NIB genome sequence.

The number in the name of primer means a position of primer at genome sequence PVY<sup>NTN</sup>-H (Thole s sod., 1993). S – sense primer; AS – antisense primer.

Ime oligonukleotidnega začetnika	5' – 3' orientacija
4150 N AS	AATGCCATTGCAGAAGGATCTAA
4230 AS	TGTCATTAGCCACTTGAA
4250 AS	CATGCTTGTGATAAACACT
4500 AS UNI	TGCTTCATTGTTCTGCCATC
4665 AS (Samui3)	TGCTCCTATTGTCAATGTCC
4840 AS	AGTTATATGCAAAGCAAGC
4970 AS UNI	TCATGTATGACAGGGATGCATTG
4985 AS (Kawi4)	AGAATGTCATGTATGACAGGA
5420 AS UNI	CGGTGTAATCTTTGCATATCT
5535 AS (Nat 5535 AS)	ATACCTTTATTAAATTTCCT
5830 AS	CAAACCTCCGTTGACATTG
5940 AS UNI	GGATCAACGAACCTGGATGAATGA
6015 AS (Nat 6015 AS)	GCGCTCTGGATGTCT
6270 AS UNI	GATTTAGCTTCATGCTCCAC
6375 AS (Nat 6375 AS)	TTCAGACGTTCCATATTCA
6580 AS UNI	ATTCTGTATAGGAGCTCGGAA
6926 AS (Nat 6926 AS)	AATGGACCCCACAACA
7300 AS	GGTAGATGATAACCCATTGAT
7830 AS UNI	CTTCCATGTATGTGCTTC
7980 AS	CAAGGACGACCATAAGAGAG
8050 AS UNI	AAAGAATACACACGTGCTGTC
8430 AS	TGTTGCAAAAGGTTGCT
8440 AS (Nat 8440 AS)	TGTATGGAGCTTCCCTT
8940 AS	CGAGGTTCCATTTCAT
9060 AS (Nat 9060 AS)	GAAATGTGCCATGATTG
9360 AS	CATGTTCTGACTCCAAG
9700 AS	GTCTCCTGATTGAAGTTA
9700 AS (Nat 9700 AS)	TCCTGATTGAAGTTACAGTC

Vsi oligonukleotidni začetniki so bili proizvedeni pri proizvajalcu MWG Biotech AG, Nemčija.

Uporabljena temperatura naleganja vseh oligonukleotidnih začetnikov pri uporabljeni koncentraciji 0.4 pmol /  $\mu\text{l}$  je bila 55 °C.

### 3.1.4.2 Univerzalni oligonukleotidni začetniki

Univerzalne oligonukleotidne začetnike smo uporabljali za določanje nukleotidnega zaporedja virusnega izolata PVY<sup>NTN</sup>-NIB, v primeru vključitve produktov RT-PCR v plazmidni vektor (pGEM-T plazmid).

**Preglednica 2: Univerzalni oligonukleotidni začetniki.**

Table 2: Universal primers.

Ime oligonukleotidnega začetnika	5' – 3' orientacija
M13	GTAAAACGACGCCAGT
R40	GAATTGTGAGCGGATAAC

Oligonukleotidna začetnika sta bila proizvedena pri proizvajalcu Applied Biosystems, ZDA.

Uporabljena temperatura naleganja univerzalnih oligonukleotidnih začetnikov pri uporabljeni koncentraciji 0.4 pmol /  $\mu\text{l}$  ali 1 pmol /  $\mu\text{l}$  je bila 50 °C.

### 3.1.4.3 Oligonukleotidni začetniki - določanje izražanja transgena in zunanje kontrole *luciferaze*

Oligonukleotidi začetniki in TaqMan® sonde, ki so bili uporabljeni v Q-PCR reakcijah za analizo izražanja transgena v transgenih rastlinah krompirja in transgenih rastlinah tobaka ter eksogene kontrole *luciferaze*, so podani v preglednici 3.

**Preglednica 3: Sonde in oligonukleotidni začetniki uporabljeni v Q-PCR reakcijah za določanje ekspresije transgena CP in zunanje kontrole *luciferaze*.**

Ime je sestavljeno iz imena tarčnega gena, kratice F (začetni oligonukleotidni začetnik) in R (končni oligonukleotidni začetnik). Ime sonde je ime tarčnega gena.

Table 3: Primers and probes used in Q-PCR reactions for detection of expression of transgene or exogene control *luciferase*.

The name of primer: Target gene, forward primer (F), reverse primer (R). The name of the probe (sonda) is the name of the target gene.

Ime oligonukleotidnega začetnika	5' – 3' orientacija
CP F	AATCTGCGCGATGGAAGTTT
CP R	ACCGTCCAACCCGAAAGTC
CP sonda	FAM-CTCGCTATGCTTGACTTTATGAGGTACACATC-TAMRA
Luc F	CTGATTTCCTTGCCTCGAGTT
Luc R	TCAAGTAACAACCGCGAAAAG
Luc sonda	VIC-AGACCTTCGGTACTTCGTCCACAAACACAA-TAMRA

Sondi in oligonukleotidni začetniki so bili proizvedeni pri proizvajalcu Applied Biosystems, ZDA.

Uporabljena temperatura naleganja oligonukleotidnih začetnikov pri 900 nM koncentraciji je bila v obeh primerih 60 °C, sond pri 200 nM koncentraciji pa 70 °C.

### 3.1.4.4 Oligonukleotidni začetniki - določanje izražanja genov vključenih v mehanizem utišanja genov

Oligonukleotidni začetniki, navedeni v preglednici 4, so bili uporabljeni v Q-PCR reakcijah za določitev izražanja posameznih genov vključenih v mehanizem utišanja genov. Kot endogeno kontrolo smo uporabljali PDARs reagente (PreDeveloped Assay Reagents) 18S rRNA (Applied Biosystems, ZDA).

**Preglednica 4: Oligonukleotidni začetniki uporabljeni v Q-PCR reakcijah za določanje ekspresije genov vključenih v mehanizem utišanja genov.**

Ime je sestavljeno iz imena tarčnega gena, F - začetni oligonukleotidni začetnik in R - končni oligonukleotidni začetnik.

Table 4: Primers used in Q-PCR reactions for detection of expression of genes involved in gene silencing.

The name of primer: target gene, forward primer (F) and reverse primer (R).

Ime začetnega oligonukleotida	5' – 3' orientacija
AGO1 F	GGTGGAGATGATAGACAACCTGTTAAA
AGO1 R	GCAAAGCCTCCCTCATTATTCC
SGS3 F	CGGGGCTAGTTGCAAGAAAAA
SGS3 R	TGGTCAGACCAGGATATAAAAAACAT
SDE3 F	ACCCAAGAAATTGGATTGCA
SDE3 R	CAAAACTAATCTTCTATGGTGTACAC

Oligonukleotidni začetniki so bili proizvedeni pri proizvajalcu Applied Biosystems, ZDA.

Uporabljena temperatura naleganja oligonukleotidnih začetnikov pri 900 nM koncentraciji je bila 60 °C.

### 3.1.4.5 Oligonukleotidni začetniki - pomnoževanje gena za plaščni protein virusa PVY<sup>NTN</sup>

Oligonukleotidni začetniki in pogoji PCR reakcije so delo Stanič-Racman, 2002.

Ime oligonukleotidnega začetnika	5' – 3' orientacija
FS-CPY5' (začetni oligonukleotidni začetnik)	GCTCTAGAAATGACACAATTAAATGCAG
S-CPY3' (končni oligonukleotidni začetnik)	GCGGATCCTGACATGTTCTTG

Oligonukleotidna začetnika sta bila proizvedena pri proizvajalcu Applied Biosystems, ZDA.

### 3.1.5 PLAZMIDI

Uporabljali smo komplet Plazmid pGEM®-T Easy (pGEM-T) Vector System proizvajalca Promega (ZDA), (internetni naslov:

<http://www.tcd.ie/Genetics/staff/Noel.Murphy/recombinant%20dna%20ge4021/pgem.pdf>.

### 3.1.6 GOJIŠČA

#### 3.1.6.1 Bakterijska gojišča

##### Tekoč LB medij

10 g bacto tripton (DIFCO, BD, ZDA), 5 g kvasni ekstrakt (DIFCO, BD, ZDA), 5 g NaCl Dopolnilo z bidestilirano vodo (ddH<sub>2</sub>O) do 1000 ml in umerimo pH na 7.5.

Avtoklaviramo in shranimo v hladilnik.

### **Trden LB medij z ampicilinom, IPTG in X-Gal**

- 10 g bacto tripton (DIFCO, BD, ZDA), 5 g kvasni ekstrakt (DIFCO, BD, ZDA), 10 g NaCl, 15 g agarja

Dopolnimo do 1000 ml z ddH<sub>2</sub>O in umerimo pH na 7.5. Avtoklaviramo in v ohlajen medij (50 °C) dodamo:

- 150 mg ampicilina (amp) (raztopimo v 1 ml 0.5 M NaOH), 47.6 mg IPTG (izopropil-β-D-tiogalaktopiranozid) (raztopimo v 1 ml ddH<sub>2</sub>O), 40 mg X-Gal (5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-galaktopiranozid) (raztopimo v 0.5 ml dimetilformamida)

Razlijemo v petrijevke. Ohlajen medij shranimo v hladilnik.

#### 3.1.6.2 Gojišča za rastlinski material

##### **MS gojišče (Murashige in Skoog, 1962)**

- 3% saharoze, 0.7% agarja
- Makroelementi

20.60 mM NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 18.80 mM KNO<sub>3</sub>, 1.25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.99 mM CaCl<sub>2</sub>\*2H<sub>2</sub>O, 1.50 mM MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O

- Mikroelementi

100.00 μM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 29.29 μM ZnSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O, 100.00 μM MnSO<sub>4</sub>\*4H<sub>2</sub>O, 5.00 μM KI, 0.10 μM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>\*2H<sub>2</sub>O, 0.10 μM CuSO<sub>4</sub>\*5H<sub>2</sub>O, 0.11 μM CoCl<sub>2</sub>\*6H<sub>2</sub>O

- Ostale komponente

163.00 μM NaFe EDTA, 4.06 μM nikotinska kislina, 2.43 μM piridoksin HCl, 1.1 μM tiamin HCl, 26.60 μM glicin, 555.00 μM mioinozitol

pH rastlinskih gojišč umerimo na 5.7 - 5.8. Gojišča steriliziramo z avtoklaviranjem (15 min

sterilizacije pri  $T = 121\text{ }^{\circ}\text{C}$  in tlaku 2.4 atm) ohladimo na  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$  in vlijemo v sterilne petrijevke (po 20 ml). Ohlajene shranimo v hladilnik.

### **3.1.7 STERILNA ZEMLJA**

Neuhaus N3 Bio (Neuhaus, Nemčija)

### **3.1.8 RASTNI POGOJI**

Rastna komora za tkivne kulture (»*in vitro*« rastline)

- Temperatura:  $17 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  (tema) in  $19 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  (svetloba).
- Gostota pretoka fotonov:  $70 - 90\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$  (žarnica Osram L36W/77).
- Fotoperioda: 16 ur svetlobe / 8 ur teme.

Rastna komora z vlogo (»*in vivo*« rastline)

- Temperatura:  $20 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  (tema) in  $22 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  (svetloba).
- Gostota pretoka fotonov:  $70 - 90\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$  (žarnica Osram L36W/77).
- Fotoperioda: 16 ur svetlobe / 8 ur teme.
- Relativna vlažnost zraka:  $75 \pm 2\%$ .

Rastlinjak z nadzorovano temperaturo in vlogo

- Temperatura:  $20 - 22\text{ }^{\circ}\text{C}$  (podnevi) in  $12 - 16\text{ }^{\circ}\text{C}$  (ponoči).
- Relativna vlažnost zraka: 60% - 70% .

### **3.1.9 MIKROMREŽE**

cDNA mikromreže, ki smo jih uporabili pri raziskovalnem delu, se imenujejo TIGR potato clone cDNA microarray in so proizvedene na The Institute of Genomic Research (TIGR, ZDA) (internetni naslov: <http://www.tigr.org/tdb/potato>).

cDNA mikromreže so sestavljene iz točkovno nanesenih cDNA, natisnjениh na standardnem objektnem steklu Corning UltraGaps Slide (Corning Incorporated, ZDA). cDNA je nanesena v 48 blokih. Vsak blok je zgrajen iz 25 stolpcov in 26 vrstic. Na cDNA mikromrežah je nanesenih 15 264 različnih cDNA v duplikatih. Od 15 264 je 3 173 cDNA nevalidiranih in 12 091 validiranih. Natisnjene cDNA so pridobili iz organov krompirja (stolona, korenin, dormantnega gomolja, mikro-gomolja, brstečega očesa in zdravega lista) ter iz substrakcijskih knjižnic cDNA krompirja po interakciji z glivo *Phytophthora infestans* (<http://www.tigr.org/tdb/potato>) (Ronning in sod., 2003).

Od proizvajalca smo prejeli še datoteko imenovano GAL (Genepix Allocation). V datoteki GAL so osnovne informacije o posameznih točkovno nanesenih cDNA. Informacija o posamezni točki je sestavljena iz imena klona, številke klona v genski banki, oznake skupnega zaporedja (TC) (tentative consensus sequence) v bazi TIGR StGI in določitve biološke funkcije (putative annotation).

### 3.2 METODE

#### 3.2.1 DELO S TESTNIMI RASTLINAMI

##### 3.2.1.1 Priprava testnih rastlin

Pred testiranjem smo transgene rastline krompirja ali trangene rastline tobaka ter kontrolne (netransformirane) rastline krompirja ali tobaka razmnožili s segmentacijo na nodije v tkivni kulturi. Po 14 dneh (po končanem zakoreninjenju, ki je potekalo v rastni komori za tkivne kulture na gojišču MS) smo rastline presadili v lončke s sterilno zemljo in prestavili v rastno komoro z vlogo. V primeru testiranja izražanja transgena v transgenih rastlinah tobaka pa so rastline rasle v rastlinjaku.

### 3.2.1.1.1 Netransgene in transgene rastline *N. tabacum* L. sorte 'Samsun'

Zdrave netransgene rastline tobaka *N. tabacum* L. sorte 'Samsun' smo namnožili z nodijsko kulturo iz zdravih rastlin, vzgojenih v tkivni kulturi in jih uporabili kot propagacijsko sorto za množenje slovenskega virusnega izolata PVY<sup>NTN</sup>-NIB. Rastline smo gojili v lončkih premera 12 centimetrov (cm) v rastni komori z vlago. Po 14 dneh smo rastline okužili z inokulumom pripravljenim kot je opisano v poglavju 3.2.1.2. Izvorni material virusa so bile nodijske tkivne kulture krompirja *S. tuberosum L.* sorte 'Pentland Squire'. Po 14 dneh smo pregledali simptome na okuženih rastlinah tobaka (jasne nekroze ven na listih okužene rastline) in jih primerjali s kontrolnimi neinokuliranimi rastlinami. Listi s simptomimi so nam služili kot izvorni material za izolacijo slovenskega izolata virusa PVY<sup>NTN</sup>-NIB ali kot izvorni material virusa za nadaljnje inokulacije testnih rastlin.

Testirali smo enajst linij transgenega tobaka, pripravljenih v okviru diplomskega naloge Toplak (2000) in Dular (2001) (preglednica 5). Transgene in netransgene rastline smo gojili en teden v rastni komori z vlago v lončkih premera 12 cm in nadaljnje tri tedne v rastlinjaku. Po štirih tednih smo vzorčili 4 - 5 popolnoma razvitih zdravih listov.

**Preglednica 5: Transgene linije tobaka.**

Table 5: Tobacco transgenic lines.

Linija	Linija
T1	T8
T2	T9
T3	T10
T4	T11
T5	C <sup>+</sup> (netransgen tobak okužen z virusom PVY <sup>NTN</sup> )
T6	C <sup>-</sup> (netransgen tobak)
T7	

### 3.2.1.1.2 Netransgene in transgene rastline *S. tuberosum L.* sorte 'Igor'

#### Testne rastline za izražanje transgena

Testirali smo štirinajst transgenih linij krompirja. Kot kontrolo smo uporabili netransgene rastline krompirja sorte 'Igor'. Transgene in netransgene rastline smo gojili štiri tedne v rastni komori z vlogo v lončkih premera 12 cm. Po štirih tednih smo vzorčili po 4 - 5 popolnoma razvitih zdravih listov. Transgene linije so bile predhodno testirane na odpornost proti virusu PVY<sup>NTN</sup> (Stanič-Racman, 2002) (preglednica 6).

#### Preglednica 6: Transgene linije krompirja.

1.stolpec: transgene linje krompirja; 2. stolpec: O - občutljiva transgena linija; R – rezistentna transgena linija; DR – delno rezistentna transgena linija; 3. stolpec: rezultati testiranja izražanja transgena CP z northern prenosom (C<sup>-</sup> negativna kontrola - netransgena rastlina krompirja *S. tuberosum L.* sorte 'Igor'; C<sup>+</sup> pozitivna kontrola - netransgena rastlina krompirja *S. tuberosum L.* sorte 'Igor' inokulirana z virusom PVY<sup>NTN</sup>).

Table 6: Potato transgenic lines.

1<sup>st</sup>. column: transgenic potato lines; 2<sup>nd</sup>. column: O - susceptible transgenic line; R – resistant transgenic line; DR – partly resistant transgenic line; 3<sup>rd</sup>. column: results of transgene CP expression by Northern Blot analysis (C<sup>-</sup> negative control was non-transgenic potato plants *S. tuberosum L.* cv. Igor; C<sup>+</sup> positive control was non-transgenic potato plants *S. tuberosum L.* cv. Igor infected with PVY<sup>NTN</sup>).

Linija krompirja	Odgovor rastline na okužbo z virusov PVY <sup>NTN</sup>	Ekspresija transgena CP z northern prenosom
	(Stanič-Racman, 2002)	(Stanič-Racman, 2002)
LINIJA 1	DR	+
LINIJA 2	R	+
LINIJA 3	O	+
LINIJA 5	O	+
LINIJA 9	DR	+
LINIJA 19	DR	+
LINIJA 23	O	-
LINIJA 27	O	-
LINIJA 28	O	+
LINIJA 29	O	+
LINIJA 32	DR	+
LINIJA 33	O	-
LINIJA 34	R	-
LINIJA 35	R	-
C <sup>+</sup> (netransgen krompir okužen z virusom PVY <sup>NTN</sup> )	O	+
C <sup>-</sup> (netransgen krompir)	/	-

### Testne rastline za preučevanje mehanizmov utišanja genov

Testirali smo štiri transgene linije krompirja sorte 'Igor' (preglednica 7), ki smo jih izbrali na podlagi rezultatov doktorske naloge Stanič-Racman (2002). Izbrane transgene linije so bile opredeljene za občutljive ali odporne proti virusu PVY<sup>NTN</sup>. Kot kontrolo smo uporabili netransgene rastline krompirja sorte 'Igor'. Posadili smo deset rastlin vsake transgene linije in sicer po dve rastlini iste linije v lonček premera 12 cm. Rastline smo gojili v rastni komori z vlogo. Po štirih tednih smo rastline okužili z virusom PVY<sup>NTN</sup>, kot je opisano v poglavju 3.2.1.2. 4, 8, 12 in 24 ur po inokulaciji smo vzorčili inokulirane liste. Del testnih rastlin krompirja smo inokulirali samo s fosfatnim pufrom za mehansko inokulacijo (slepa inokulacija) in opravili vzorčenje inokuliranih listov v enakih časovnih točkah kot pri okuženih rastlinah.

#### **Preglednica 7: Transgene linije krompirja.**

(O - občutljiva transgena linija; R – rezistentna transgena linija)

Table 7: Potato transgenic lines.

(O- sensitive transgenic line; R – resistent transgenic line)

<b>Linije krompirja</b>	<b>Oblika vnesenega transgena</b>	<b>Odgovor rastline na okužbo z virusov PVY<sup>NTN</sup></b>
	<b>CP</b> <b>(Stanič-Racman, 2002)</b>	<b>(Stanič-Racman, 2002)</b>
Linija 16	S	O
Linija 29	FS	O
Linija 34	FS	R
Linija 35	FS	R
K (netransgena linija krompirja)	/	O

#### 3.2.1.2 Mehanska inokulacija rastlin

##### 3.2.1.2.1 Priprava inokuluma

Za pripravo inokuluma smo uporabili liste, z virusom PVY<sup>NTN</sup> okužene rastline tobaka

sorte 'Samsun'. Okužen rastlinski material (liste tobaka z jasno izraženimi simptomi) smo stehtali, dodali 0.02 M fosfatni pufer za mehansko inokulacijo v razmerju rastlinski material (g) : fosfatni pufer (ml) = 2 : 3 in dobro strli v terilnici. Inokulum smo inkubirali 5 min na sobni temperaturi. Splei inokulum predstavlja čisti fosfatni pufer za mehansko inokulacijo.

#### 0.02 M fosfatni pufer za mehansko inokulacijo

V 100 ml ddH<sub>2</sub>O raztopimo:

- 13 ml 0.2 M raztopine A (0.2 M raztopina A (31.2 g / 1 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>\*2H<sub>2</sub>O (Mr = 156))
- 87 ml 0.2 M raztopine B (0.2 M raztopina B (28.4 g / 1 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Mr = 142))

Umerimo pH na 7.6 in shranimo v hladilnik.

#### 3.2.1.2.2 Inokulacija rastlin

Na posamezni rastlini krompirja, stari štiri tedne, smo izbrali tri polno razvite liste iz spodnjega dela rastline. Liste smo označili in jih po zgornji površini naprašili s karborundom. Preko zgornje površine lista smo nežno potegnili s prstom namočenim v inokulum. Delo smo opravljali v rokavicah in pazljivo, tako da ni prišlo do stika zgornjih listov rastlin s spodnjimi inokuliranimi. Prav tako smo pazili, da nismo virusa prenesli na kontrolne neokužene rastline. Po približno 10 - 15 min smo liste sprali pod tekočo vodo.

V vseh poizkusih smo imeli kontrole in sicer:

- Neinokulirane transgene rastline
- Slepino inokulirane transgene rastline
- Slepino inokulirane netransformirane rastline
- Neinokulirane netransformirane rastline

### 3.2.1.3 DAS ELISA

Encimsko-imunska metoda (DAS ELISA) je serološki test, s katerim smo v določenih primerih potrdili prisotnost virusa v inokuliranih rastlinah tobaka. Test smo izvedli po navodilih proizvajalca protiteles Bioreba AG, Švica. Postopek je naslednji:

- Inkubacija v karbonatnem pufru razredčenih protiteles v mikrotitrski ploščici (BioOne International AG, Avstrija), 4 ure, 37 °C
- Spiranje s pufrom za spiranje
- Inkubacija v ekstrakcijskem pufru razredčenih vzorcev, čez noč v hladilniku (4 °C)
- Spiranje s pufrom za spiranje
- Inkubacija v konjugatnem pufru razredčenih konjugiranih protiteles, 4 ure, 37 °C
- Spiranje s pufrom za spiranje
- Inkubacija substrata (22 mg pNPP (para-nitrofenilfosfat) (Sigma, ZDA) / 20 ml substratnega pufra), 1 uro na sobni temperaturi, v temi
- Odčitanje rezultatov z uporabo čitalca ELISA Reader Dynatech MR500 (Dynatech, ZDA) pri valovni dolžini 405 nm / 490 nm.

#### Protitelesa

Potato virus Y (monoklonska protitelesa) – Mab IgG (Kataloška številka 112511)

Potato virus Y (monoklonska protitelesa) – Mab Conjugate W/AP (Kataloška številka 112521)

#### Karbonatni pufer

15 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 34.8 mM NaHCO<sub>3</sub>, 3 mM NaN<sub>3</sub>; pH 9.6

#### Pufer za spiranje - PBS-Tween

137 mM NaCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.68 mM KCl, 3 mM NaN<sub>3</sub>, 0.5 ml Tween 20; pH 7.2

### *Ekstrakcijski pufer*

19.77 mM TRIS (tris (hidroksimetil) aminometan), 137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 3 mM NaN<sub>3</sub>, 20 g PVP (polivinilpirolidon, MW 24000); pH 7.4

### *Konjugatni pufer*

19.77 mM TRIS, 137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 3 mM NaN<sub>3</sub>, 20 g PVP, BSA (bovine serum albumin) (2 g na 1000 ml), 1 mM MgCl<sub>2</sub>; pH 7.4

### *Substratni pufer*

dietanolamin (97 ml v 1 l ddH<sub>2</sub>O); pH 9.8

### *Substrat*

22 mg pNPP raztopimo v 20 ml substratnega pufra

## **3.2.2 SERIJE POIZKUSOV**

### Določanje nukleotidnega zaporedja slovenskega izolata virusa PVY<sup>NTN</sup>-NIB

Nodijska segmentacija rastlin tobaka: 12.04.2002

Zakoreninjenje in prenos rastlin v komoro z vlago: 26.04.2002

Inokulacija rastlin z virusom PVY<sup>NTN</sup>-NIB: 10.05.2002

Izolacija celokupne RNA: 27.05.2002

### Določanje izražanja transgena v transgenih rastlinah krompirja in transgenih rastlinah tobaka

- Testne rastline krompirja

Nodijska segmentacija rastlin krompirja: 27.03.2002

Zakoreninjenje in prenos rastlin v komoro z vlago: 10.04.2002

Vzorčenje: 08.05.2002

Izolacija celokupne RNA: 27.05.2002

- Testne rastline tobaka

Nodijska segmentacija rastlin tobaka: 27.03.2002

Zakoreninjenje in prenos rastlin v komoro z vlogo: 10.04.2002

Prenos rastlin v rastlinjak: 24.04.2002

Vzorčenje: 08.05.2002

Izolacija celokupne RNA: 19.07.2002

#### Preučevanje mehanizma utišanja genov

Rastlinski material smo pobrali v treh serijah (bioloških ponovitvah).

Serija IV:

Nodijska segmentacija rastlin krompirja: 26.07.2004

Zakoreninjenje in prenos rastlin v komoro z vlogo: 10.08.2004

Inokulacija rastlin z virusom PVY<sup>NTN</sup> in vzorčenje: 07.09.2004

Izolacija celokupne RNA: 10.09.2004

Serija VI:

Nodijska segmentacija rastlin krompirja: 31.01.2005

Zakoreninjenje in prenos rastlin v komoro z vlogo: 14.02.2005

Inokulacija rastlin z virusom PVY<sup>NTN</sup> in vzorčenje: 14.03.2005

Izolacija celokupne RNA: 15.03.2005

Serija VII:

Nodijska segmentacija rastlin krompirja: 31.01.2005

Zakoreninjenje in prenos rastlin v komoro z vlogo: 14.02.2005

Inokulacija rastlin z virusom PVY<sup>NTN</sup> in vzorčenje: 14.03.2005

Izolacija celokupne RNA: 15.03.2005

Razlika med serijo VI in VII je enourni časovni zamik inokulacije rastlin in vir inokuluma (druga inokulirana rastlina tobaka).

### **3.2.3 IZOLACIJA IN ANALIZA RNA**

#### **3.2.3.1 Izolacija RNA**

Pri raziskovalnem delu smo uporabljali različne tipe izolacije celokupne RNA. V večini primerov smo uporabljali izolacijo s kompletom kemikalij RNeasy Plant Mini kit (Qiagen, Nemčija). V primeru analize majhnih molekul RNA smo uporabljali izolacijo celokupne RNA z reagentom TRIzol (Invitrogen, ZDA) ali kombinacijo RNeasy Plant Mini kit in RNeasy MinElute Spin kit (Qiagen, Nemčija).

##### **3.2.3.1.1 Izolacija s kompletom kemikalij RNeasy Plant Mini kit (Qiagen)**

Za izolacijo celokupne RNA iz listov rastlin tobaka ali listov rastlin krompirja smo uporabljali komplet kemikalij RNeasy Plant Mini kit (Qiagen, Nemčija).

Komplet uporabljamo v primeru, ko smo omejeni s količino izhodnega materiala in v primeru, da je za nadaljnje delo pomembna čistost izolirane celokupne RNA. Pri postopku izolacije se držimo protokola proizvajalca Qiagen z manjšimi modifikacijami.

Opis postopka

- Zamrznjeno rastlinsko tkivo homogeniziramo s tekočim dušikom (v terilnici s pestilom) do drobnega prahu

- v 1.5 ml mikrocentrifugirke zatehtamo 0.2 - 0.3 g zmletega rastlinskega prahu in takoj dodamo 800 µl liznega pufra RLT (RNeasy Plant Mini kit), ki smo ga predhodno segreli na 56°C
- zmešamo na ekscentričnem mešalcu
- vzorec inkubiramo na sobni temperaturi 30 min in ga občasno dobro premešamo
- sledi dodatna inkubacija vzorcev 3 min v vodni kopeli na 56 °C
- 400 µl vzorca prenesemo v vijolično kolono (RNeasy Plant Mini kit) in centrifugiramo 2 min pri 10000 g
- filtrat prenesemo v novo 2 ml mikrocentrifugirko
- preostanek lizata ponovno prenesemo na vijolično kolono in ponovno centrifugiramo 2 min pri 10000 g ter filtrat prenesemo k preostalemu filtratu v 2 ml mikrocentrifugirko in zavrhemo vijolično kolono
- prefiltratu dodamo 400 µl 96% etanola (EtOH) in dobro premešamo
- 600 µl pripravljene raztopine prenesemo v roza kolono (RNeasy Plant Mini kit)
- centrifugiramo 15 sekund (s) pri 8000 g
- zavrhemo filtrat in na roza kolono prenesemo še preostalih 600 µl vzorca
- centrifugiramo 15 s pri 8000 g in zavrhemo filtrat
- na membrano roza kolone dodamo 700 µl pufra RW1 (RNeasy Plant Mini kit)
- centrifugiramo 15 s pri 8000 g in zavrhemo filtrat ter zbiralno tubico
- roza kolono prenesemo v novo zbiralno tubico in dodamo 500 µl pufra RPE (RNeasy Plant Mini kit)
- centrifugiramo 15 s pri 8000 g in zavrhemo filtrat ter ponovno na membrano roza kolone dodamo 500 µl pufra RPE
- centrifugiramo 2 min pri 10000 g in zavrhemo filtrat ter zbiralno tubico
- roza kolono prenesemo v novo zbiralno tubico in centrifugiramo 1 min pri 10000 g
- po končanem centrifugiranju prenesemo roza kolono v 1.5 ml mikrocentrifugirko in na membrano dodamo 30 µl ali 50 µl, predhodno na 65 °C segrete, ddH<sub>2</sub>O ter inkubiramo na sobni temperaturi 5 min
- centrifugiramo 1 min pri 8000 g
- po centrifugiranju na membrano kolone ponovno dodamo 30 µl ali 50 µl, predhodno na 65 °C segrete, ddH<sub>2</sub>O ter inkubiramo na sobni temperaturi 10 min

- centrifugiramo 1 min pri 8000 g in vzorec shranimo na -80 °C.

### 3.2.3.1.2 Izolacija celokupne RNA z reagentom TRIzol®

Metodo izolacije celokupne RNA s TRIzolom® (Invitrogen, ZDA) uporabljamo v primeru kadar želimo izolirati večje količine RNA. Ta način izolacije nam omogoča tudi izolacijo krajših molekul RNA.

#### Opis postopka

- Zamrznjeno rastlinsko tkivo homogeniziramo s tekočim dušikom (v terilnici s pestilom) do drobnega prahu
- v 15 ml centrifugirke zatehtamo 0.5 g zmletega rastlinskega prahu in takoj dodamo 5 ml TRIzol® reagenta
- zmešamo na ekscentričnem mešalcu
- centrifugiramo na 4 °C 15 min pri 4200 g
- supernatant prenesemo v novo centrifugirko
- dodamo 0.2X volumen kloroforma (glede na startni volumen dodanega TRIzol reagenta)
- zmešamo na ekscentričnem mešalcu in inkubiramo na sobni temperaturi 5 min
- sledi centrifugiranje na 4 °C 15 min pri 4200 g
- po končanem centrifugiranju pazljivo prenesemo vodno fazo v novo 15 ml centrifugirko in dodamo 0.5X volumen izopropanola in 0.5X volumen 0.8 M natrijevega-acetata in 0.5X volumen 1.2 M natrijevega klorida (glede na volumen dobljene vodne faze)
- dobro premešamo in inkubiramo na sobni temperaturi 10 min
- sledi centrifugiranje na 4 °C 8 min pri 4200 g
- odstranimo supernatant in pelet raztopimo v 6 ml 75% EtOH
- sledi centrifugiranje na sobni temperaturi 15 min pri 4200 g
- odstranimo supernatant in pelet posušimo na zraku

- pelet raztopimo v predhodno na 70 °C segreti ddH<sub>2</sub>O in vzorec shranimo na -80 °C.

### 3.2.3.1.3 Izolacija kratkih molekul RNA

Pri preučevanju mehanizma utišanja genov je potrebna analiza majhnih molekul RNA. Izolacija majhnih molekul RNA je mogoča s kombinacijo dveh kompletov reagentov proizvajalca Qiagen (ZDA) in sicer RNeasy Plant Mini kit ter RNeasy MinElute Spin kit.

Opis postopka:

- Zamrznjeno rastlinsko tkivo homogeniziramo s tekočim dušikom (v terilnici s pestilom) do drobnega prahu
- v 1.5 ml mikrocentrifugirke zatehtamo 0.2 - 0.3 g zmletega rastlinskega prahu in takoj dodamo 800 µl liznega pufra RLT (RNeasy Plant Mini kit), ki ga predhodno segregemo na 56 °C
- zmešamo na ekscentričnem mešalcu
- vzorec inkubiramo na sobni temperaturi 30 min in ga občasno dobro premešamo
- sledi dodatna inkubacija vzorcev 3 min v vodni kopeli na 56 °C
- 400 µl vzorca prenesemo v vijolično kolono (RNeasy Plant Mini kit) in centrifugiramo 2 min pri 10000 g
- Filtrat prenesemo v novo 2 ml mikrocentrifugirko
- Preostanek lizata ponovno prenesemo v vijolično kolono in ponovno centrifugiramo 2 min pri 10000 g ter filtrat prenesemo k preostalemu filtratu v 2 ml mikrocentrifugirko in zavrzemo vijolično kolono
- filtratu dodamo 400 µl 96% EtOH in dobro premešamo
- 600 µl pripravljene raztopine prenesemo v roza kolono (RNeasy Plant Mini kit)
- centrifugiramo 15 s pri 8000 g
- filtrat prenesemo v novo 2 ml mikrocentrifugirko in na roza kolono prenesemo še preostalih 600 µl vzorca
- centrifugiramo 15 s pri 8000 g

- filtrat ponovno prenesemo v 2 ml mikrocentrifugirko
- filtratu dodamo 980 µl 100% EtOH
- zmešamo na ekscentričnem mešalcu
- 700 µl raztopine prenesemo na kolono (RNeasy MinElute spin kit)
- centrifugiramo 15 s pri 8000 g
- filtrat zavržemo in na kolono nanesemo ponovno 700 µl raztopine
- centrifugiramo 15 s pri 8000 g
- na kolono dodamo 500 µl pufra RPE (RNeasy MinElute spin kit)
- centrifugiramo 15 s pri 8000 g
- zavržemo filtrat in dodamo 500 µl 80% EtOH
- centrifugiramo 2 min pri 8000 g
- zavržemo filtrat in zbiralno tubico
- v novi zbiralni tubici centrifugiramo z odprtim pokrovčkom 2 min pri 8000 g
- po centrifugiranju prenesemo kolono v novo 1.5 ml mikrocentrifugirko
- dodamo 15 µl predhodno na 70 °C segrete ddH<sub>2</sub>O
- sledi inkubacija 5 min na sobni temperaturi ter ponovno centrifugiranje 1 min pri 8000 g. Vzorec shranimo na -80 °C.

### **3.2.3.2 Preverjanje integritete, velikosti in količine izoliranih nukleinskih kislin**

#### **3.2.3.2.1 Preverjanje integritete celokupne RNA in produktov PCR na agaroznem gelu**

Agarozne gele uporabljamo za preverjanje integritete, določanje koncentracije izoliranih nukleinskih kislin, testiranja uspešnosti DNaza I tretiranja izolirane celokupne RNA in za analizo produktov PCR po končani PCR reakciji.

#### **Opis postopka**

V našem primeru smo uporabljali 0.8 - 1.2% agarozni gel za preverjanje uspešnosti izolacije celokupne RNA in preverjanje produktov RT-PCR generiranih v RT-PCR

reakcijah (poglavlje 3.2.4.1) ali produktov PCR dobljenih s PCR reakcijo s katero smo dokazovali vključitev produktov RT-PCR v plazmid pGEM-T (poglavlje 3.2.4.3). Agarozni gel smo pripravili s segrevanjem agaroze v 1X TAE puferu, ki smo mu dodali etidijev bromid (EtBr) (končna koncentracija raztopine je 0.00004%). Vzorcem smo pred nanosom na gel dodali še 6X vzorčni pufer za nukleinske kisline. Kot kontrolo smo v eno progo agaroznega gela nanesli 1 µl označevalca velikosti DNA (100 bp) (MBI Fermentas, Litva). Po nanosu vzorcev je elektroforeza potekala v 1X TAE puferu pri stalni napetosti 80 – 100 V, 30 do 40 min, na napajalniku POWER / PAC 1000 (BIO-RAD, ZDA). Nukleinske kisline smo detektirali na UV transluminatorju pri valovni dolžini 312 nm. Za dokumentacijo rezultatov smo gele slikali z GelDocMega sistemom (UVItec Limited, Velika Britanija).

V primeru priprave agaroznih gelov za detekcijo produktov RT-PCR smo 1X TAE pufer zamenjali z 1X modificiranim TAE puferom.

Za preverjanje integritete in določevanje količine celokupne RNA smo na 0.8 - 1% agarozni gel z dodanim EtBr nanesli 2.5 – 7.5% končnega volumna izolata. V primeru preverjanja uspešnosti RT-PCR ali PCR reakcij pa celoten volumen reakcije. Velikost pripravljenih produktov RT-PCR ali PCR smo določili s pomočjo označevalca velikosti, ki smo ga nanesli na agarozni gel.

Relativno koncentracijo RNA smo ocenili glede na primerjavo jakosti intenzitete fluorescence, ki jo oddaja UV<sub>312</sub> svetlobni kompleks EtBr-RNA. Primerjavo smo izvedli s programom GelPro (Media Cybernetics, ZDA). Na podlagi jakosti intenzitete fluorescence smo ocenili razredčitve vzorcev in jih z nadaljnji nanosi na agarozni gel umerili na enako relativno koncentracijo.

#### 10X TAE pufer

400 mM TRIS acetat (pH 8.0), 10 mM EDTA

10X modifíciran TAE pufer

400 mM TRIS acetat (pH 8.0), 1 mM EDTA

6X vzorčni pufer za nukleinske kisline

20% Ficoll 400, 20 mM EDTA, 0.15% BFB (bromfenol modro), 0.15% XCL (ksilen cianol), 30% glicerol

### 3.2.3.2.2 Preverjanje produktov PCR na poliakrilamidnem gelu

Velikost produktov PCR, ki so se sintetizirali tekom Q-PCR reakcije smo preverili na 10% poliakrilamidnem gelu.

#### Opis postopka

10 % poliakrilamidni gel je bil sestavljen iz 10% akrilamida (BIO-RAD, ZDA), 1X TBE pufra, 1% amonijevega persulfata (APS) in 0.1% TEMED (BIO-RAD, ZDA). Vzorcem smo pred nanosom na gel dodali še vzorčni pufer za nukleinske kisline (6X). Kot kontrolo smo v eno progo nanesli 1 µl označevalca velikosti DNA 50 bp (DNA Molecular Weight Marker XIII (Boehringer Mannheim, Nemčija)). Po nanosu vzorcev je elektroforeza potekala v 1X TAE pufru pri stalni napetosti 80 V, 2 – 3 ure. Opravili smo naknadno barvanje z EtBr. Nukleinske kisline smo detektirali na UV transluminatorju pri valovni dolžini 312 nm. Za dokumentacijo rezultatov smo obarvane gele slikali z GelDocMega sistemom (UVItec Limited, VB).

### 3.2.3.2.3 Preverjanje koncentracije celokupne RNA z barvilo RiboGreen<sup>®</sup>

Določanje koncentracije izolirane celokupne RNA je mogoče s pomočjo specifičnega barvila RiboGreen<sup>®</sup> (Molecular Probes, ZDA) na fluorimetru GENIOS 500 (Tecan,

ZDA). Pri nanosu in analizi vzorcev smo uporabili komplet RiboGreen® RNA Quantitation Kit (Molecular Probes, ZDA) in originalni protokol proizvajalca kemikalij.

#### 3.2.3.2.4 Preverjanje koncentracije z inštrumentom Agilent 2100 Bioanalyzer

Na inštrumentu Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, ZDA) smo v določenih primerih določali koncentracijo in integriteto izolirane celokupne RNA. Osnovni princip temelji na ločevanju fragmentov RNA na osnovi velikosti, s pomočjo kapilarne elektroforeze. Analizator za vsak vzorec izriše elektroferogram, določi faktor, ki meri kvaliteto RNA in izračuna delež molekul rRNA v vzorcih mRNA. Podatke smo analizirali s programom 2100 Expert software (Agilent Technologies, ZDA).

Pri nanosu in analizi vzorcev smo uporabili komplet RNA 6000 Nano LabChip® (razpon kvantifikacije je med 25 – 500 ng / µl) (Agilent Technologies, ZDA) in originalni protokol proizvajalca.

#### 3.2.3.2.5 Preverjanje koncentracije z inštrumentom NanoDrop 1000

V določenih primerih smo merili koncentracijo celokupne RNA na inštrumentu NanoDrop 1000 (NanoDrop Technologies, ZDA) in originalni protokol proizvajalca. Za nanos in analizo smo uporabili 1 µl koncentriranega vzorca.

### 3.2.4 KLONIRANJE IN DOLOČANJE NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA

#### 3.2.4.1 Reverzna transkripcija (sinteza cDNA) s specifičnimi oligonukleotidnimi začetniki

Celokupno RNA smo v postopku reverzne transkripcije prepisali v komplementarno verigo mRNA, imenovano komplementarna DNA (cDNA). Uporabljali smo specifične oligonukleotidne začetnike, ki so komplementarni objavljenim nukleotidnim zaporedjem sorodnih izolatov virusa PVY ali pa so bili načrtovani na novo. S pomočjo različnih kombinacij oligonukleotidnih začetnikov smo generirali več različno dolgih produktov RT-PCR, ki smo jih kasneje uporabili za direktno določanje nukleotidnega zaporedja ali pa za posredno določanje nukleotidnega zaporedja (predhodna integracija produktov RT-PCR v pGEM-T plazmid).

Uporabljali smo komplet Titan One Tube RT-PCR kit (Roche Applied Science, ZDA).

#### Reakcijska mešanica

5X RT PCR Buffer (7.5 mM MgCl <sub>2</sub> , DMSO) (Roche Applied Science, ZDA)	1X
MgCl <sub>2</sub> (25 mM) (Roche Applied Science, ZDA)	1.5 mM
DTT (100 mM) (Roche Applied Science, ZDA)	5 mM
Začetni oligonukleotidni začetnik (100 pmol / µl)	25 pmol
Končni oligonukleotidni začetnik (100 pmol / µl)	25 pmol
RNasni inhibitor (20 U / µl) (Applied Biosystems, ZDA)	10 U
dNTP (10 mM) (Applied Biosystems, ZDA)	0.8 mM
Enzyme Mix (Roche Applied Science, ZDA)	0.5 µl
celokupna izolirana RNA	~500 ng

Dopolnimo z ddH<sub>2</sub>O do končnega volumena 25 µl

Pogoji PCR reakcije v cikličnem termostatu GeneAmp 9700 PCR cyclerjem (Applied Biosystems, ZDA) so bili naslednji:

50 °C 35 min reverzne transkripcije, 94 °C 2 min začetne denaturacije, sledi 30 ciklov in pri vsakem četrtem ciklu podaljšan čas podaljševanja verige za 5 s (94 °C 40 s (čas denaturacije), 55 °C 40 s (čas prileganja oligonukleotidnih začetnikov), 68 °C 2 min (čas podaljševanja verige)), sledi še končna ekstenzija in sicer 68 °C 10 min in nato končna inkubacija na 4 °C.

Koncentracijo in velikost nastalih produktov RT-PCR smo preverjali na agaroznem gelu, pripravljenem iz modificiranega 1X TAE pufra.

### 3.2.4.2 Izolacija produktov RT-PCR iz agaroznega gela

Iz agaroznega gela očistimo produkte RT-PCR po končani PCR reakciji v primeru, da se v reakciji pomnožijo dodatni nespecifični produkti in za odstranjevanje preostalih oligonukleotidnih začetnikov, prostih nukleotidov, DNA-polimeraze, soli, agaroze in EtBr.

Opis postopka:

Iz 0.8 - 1% agaroznega gela, pripravljenega iz 1X modificiranega TAE pufra, smo s skalpelom izrezali iskani produkt RT-PCR in ga s pinceto prestavili v Millipore UltraFree-DA kolono iz kompleta DNA Gel Extraction Kit (Millipore, ZDA). Kolono smo prestavili v 1.5 ml mikrocentrifugirke in centrifugirali 10 min pri 8000 g. Po končanem centrifugiranju smo kolono zavrgli in očiščen produkt RT-PCR, ki je bil zbran v centrifugirki, ponovno preverili na agaroznem gelu. Očiščene produkte RT-PCR smo uporabili za direktno določanje nukleotidnega zaporedja s specifičnimi oligonukleotidnimi začetniki ali pa smo jih integrirali v plazmid pGEM-T in izvedli določanje nukleotidnega zaporedja s pomočjo univerzalnih oligonukleotidnih začetnikov.

### 3.2.4.3 Vstavitev produkta RT-PCR v plazmidni vektor

V določenih primerih smo očiščen produkt RT-PCR vstavili v plazmidni vektor pGEM-T. Uporabljali smo vektorski sistem pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector System (Promega, ZDA) in navodila proizvajalca. Ligacijo smo opravili čez noč v hladni sobi na 4 °C. 2 µl ligacijske mešanice smo uporabili za transformacijo kompetentnih celic *E. coli* (DH5α).

### 3.2.4.3.1 Transformacija bakterij in selekcija transformant

2 µl ligiranega produkta smo zmešali s 50 µl kompetentnih celic *E. coli* (shranjenih pri -80 °C) in mešanico inkubirali 20 min na ledu. Po inkubaciji smo jih prenesli v vodno kopel (42 °C) za približno 45 s in jih takoj prestavili na led za 2 min. Dodali smo 950 µl LB medija in mešanico inkubirali (na mešalniku) na 37 °C 90 min. Bakterijsko suspenzijo (približno 100 µl) smo enakomerno razmazali na selektivno gojišče (LB + amp + IPTG (induktor gena za β-galaktozidazo v bakteriji *E. coli*) + X-gal (substrat za encim β-galaktozidazo)) in inkubirali čez noč na 37 °C. Naslednji dan smo preverili prisotnost belih kolonij. Prisotnost plazmida z vstavljenim produktom RT-PCR smo potrdili s PCR reakcijo z univerzalnimi oligonukleotidnimi začetniki (poglavje 3.2.4.3.2).

Uspešno transformirane kolonije smo namnožili v tekočem gojišču (medij LB z dodanim amp (150 mg / l)) čez noč na 37 °C.

### 3.2.4.3.2 PCR reakcija za preverjanje uspešnosti insercije produkta RT-PCR v plazmid

Protokol reakcije in pogoji so opisani v Pompe-Novak (2002).

Reakcijska mešanica	
10X Buffer II (Applied Biosystems, ZDA)	1X
MgCl <sub>2</sub> (25 mM) (Applied Biosystems, ZDA)	2.5 mM
dNTP (10 mM) (Applied Biosystems, ZDA)	0.7 mM
oligonukleotidni začetnik M13 (10 pmol / µl)	0.2 pmol
oligonukleotidni začetnik R40 (10 pmol / µl)	0.2 pmol
Dopolnilno z ddH <sub>2</sub> O do končnega volumna 30 µl	

V reakcijsko mešanico, ki jo pripravljamo na ledu, z ezo pikiramo kolonije.

V cikličnem termostatu GeneAmp 9700 izvedemo PCR reakcijo pri naslednjih pogojih:  
začetna denaturacija 99 °C 10 min, v posamezno reakcijo dodamo 0.5 U DNA-polimeraze

(AmpliTaq polimerase (5 U / µl) (Applied Biosystems, ZDA)), sledi 30 ciklov: 94 °C 30 s (čas denaturacije), 50 °C 30 s (čas prileganja oligonukleotidnih začetnikov), 72 °C 60 s (čas podaljševanja verige) in končna inkubacija na 4 °C.

Uspešnost pomnoževanja in velikost produktov PCR smo preverili na agaroznem gelu.

### 3.2.4.3.3 Izolacija plazmida z vstavljenim produktom RT-PCR in sekveniranje

Ko so se bakterije v tekočem gojišču (z dodanim amp) primerno namnožile (začetek stacionarne faze rasti), smo iz njih izolirali plazmide z insertom. Za izolacijo plazmida smo uporabljali komplet JETQUICK Plasmid Miniprep Spin Kit (Genomed GmbH, Nemčija) in originalna navodila proizvajalca. Uspešnost izolacije smo preverili na agaroznem gelu in jih do uporabe shranili na -20 °C.

### 3.2.4.4 Določanje nukleotidnega zaporedja

#### 3.2.4.4.1.1 Sekvenčna reakcija

Kot vzorec smo uporabljali ali iz gela očiščene produkte RT-PCR ali očiščene plazmide.

#### Reakcijska mešanica

BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, ZDA)	4 µl
oligonukleotidni začetnik (100 pmol / µl)	10 pmol
produkt RT-PCR ali plazmidna DNA	200 – 500 ng

Dopolnimo z ddH<sub>2</sub>O do končnega volumena 10 µl

Uporabljeni pogoji v cikličnem termostatu GeneAmp 9700 PCR so bili:

25 ciklov 96 °C 20 s (čas denaturacije), 50 - 55 °C 10 s (čas prileganja oligonukleotidnih začetnikov), 60 °C 4 min (čas podaljševanja verige) in končna inkubacija na 4 °C.

Pri določanju zaporedja nukleotidov v plazmidih z vključenim produktom RT-PCR, smo uporabljali univerzalne oligonukleotidne začetnike (R40 in M13).

Pri določanju zaporedja nukleotidov produktov RT-PCR pa oligonukleotidne začetnike s katerimi smo namnožili produkte RT-PCR tekom RT-PCR reakcije.

#### 3.2.4.4.2 Čiščenje DNA po sekvenčni reakciji

Vzorcem smo dodali 1 µl natrijevega acetata (pH = 4.8) in 25 µl 96% EtOH. Mešanico smo inkubirali na sobni temperaturi 15 min in nato centrifugirali pri sobni temperaturi 20 min pri 10000 g. Supernatant smo odstranili in oborino sprali z 125 µl 70% EtOH, dobro premešali ter ponovno centrifugirali pri sobni temperaturi 5 min pri 10000 g. Supernatant smo odstranili in pelet posušili v cikličnem termostatu (1 min na 90 °C). Pelet smo do nanosa na instrument shranili na -20 °C.

#### 3.2.4.4.3 Kapilarna elektroforeza

Pelet smo raztopili v 17 ul Template suppression reagent (TSR) (Applied Biosystems, ZDA), inkubirali 2 min na 95 °C in nanesli na aparaturo ABI PRISM 310 (Applied Biosystems, ZDA), kjer je potekala ločba fluorescentno označenih fragmentov DNA s kapilarno elektroforezo. Po končani elektroforezi smo rezultate analizirali s programom Sequence Analyzer v3.7 (Applied Biosystems, ZDA).

#### 3.2.4.4.4 Analiza nukleotidnih zaporedij

Za analizo nukleinskih zaporedij (lepljenje dobljenih nukleotidnih zaporedij v enotno

zaporedje, prevajanje v reverzno komplementarno zaporedje, iskanje odstotkov identičnih nukleotidov in aminokislin med zaporedji, risanje filogenetskih dreves) smo uporabljali orodja, ki so prosto dostopna na internetu. Tako smo dobljena nukleotidna zaporedja produktov RT-PCR in plazmidov, z vključenimi produkti RT-PCR, zložili, glede na prekrivajoča se zaporedja, v skupno nukleotidno zaporedje celotnega genoma virusa PVY<sup>NTN</sup>-NIB in opravili primerjavo dobljenega zaporedja genoma z ostalimi objavljenimi nukleotidnimi zaporedji virusov PVY s pomočjo programa BioEdit v7.0.5, ki se nahaja na internetni strani <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/page2.html>. Poravnave nukleotidnih in aminokislinskih zaporedij smo naredili s ClustalW 1.8, ki je del programa BioEdit v7.0.5.

Filogenetska drevesa smo izrisali s programom TreeView v1.6.6, ki se nahaja na internetnem naslovu <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>.

Za iskanje podobnih nukleotidnih in aminokislinskih zaporedij v bazah podatkov GenBank na strani National Center of Biotechnology Information (NCBI) (internetni naslov: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) smo uporabili program BLAST (Basic Local Alignment Tool), ki se nahaja na internetnem naslovu <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>.

### **3.2.5 DOLOČANJE IZRAŽANJA GENOV Z RAZLIČNIMI IZVEDBAMI PCR REAKCIJE**

#### **3.2.5.1 Razgradnja genomske DNA oziroma tretiranje z DNaza I**

Izolirano celokupno RNA (poglavje 3.2.3.1.1) smo pred nadaljnjam testiranjem s Q-PCR metodo tretirali z encimom DNaze I. Encim razgraje enoverižno in dvoverižno genomsko DNA (gDNA), ki jo izoliramo kot stranski produkt ter predstavlja kontaminacijo izolirane celokupne RNA. gDNA, ki je navzoča v izoliranem vzorcu, moti

nadaljnje delo s cDNA mikromrežami in analizo s Q-PCR reakcijami.

### Opis postopka

Pri delu smo uporabljali sistem Deoxyribonuclease I (Invitrogen, ZDA) in originalni protokol proizvajalca. Edina spremembra, ki smo jo uvedli v protokolu je količina uporabljenega encima. Količino DNaze I encima smo znižali na 0.02 U na 1 µg izolirane celokupne RNA.

Uspešnost tretiranja z DNaze I encimom smo preverjali na agaroznem gelu (poglavje 3.2.3.2.1) ali v določenih primerih s Q-PCR negativno metodo.

#### 3.2.5.2 Reverzna transkripcija z nespecifičnimi naključnimi oligonukleotidnimi začetniki

Pred izvedbo Q-PCR reakcije smo sintetizirali cDNA verige, ki so komplementarne celokupni izolirani RNA. Sintezo smo izvedli z nespecifičnimi naključnimi oligonukleotidnimi začetniki (random hexamer), ki omogočajo prepisovanje celotne RNA, neodvisno od nukleotidnega zaporedja matične RNA.

Kot zunanjo kontrolo smo v vsako reakcijo dodali še 50 pg ali 100 pg kontrolne mRNA luciferaze (*luc*) (*Luciferase Control RNA* (koncentracija 20 mg / ml), Promega, ZDA). Kot pozitivno kontrolo za preverjanje inhibicije v reakciji reverzne transkripcije in kot zunanjo kontrolo smo uporabili 50 pg ali 100 pg *luc* mRNA razredčene v vodi.

Uporabljali smo komplet High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, ZDA) ter modificiran protokol proizvajalca.

Reakcijska mešanica	
10X RT Buffer (Applied Biosystems, ZDA)	1X
25X dNTP mix (100 mM) (Applied Biosystems, ZDA)	4 mM
10X RT random primers (Applied Biosystems, ZDA)	1X
MultiScribe reverse transcriptase (50 U / µl) (Applied Biosystems, ZDA)	150 U
<i>luciferase (luc)</i> RNA (Promega, ZDA)	50 pg ali 100 pg
RNasni inhibitor (20 U / µl) (Applied Biosystems, ZDA)	40 U
Celokupna RNA	1.3 - 2 µg
Dopolnimo z ddH <sub>2</sub> O do končnega volumna 50 µl	

Pogoji reakcije v cikličnem termostatu GeneAmp 9700 so bili:

25 °C 10 min in nato inkubacija na 37 °C 120 min ter inkubacija na 4 °C. Po končani reakciji smo reakcijsko mešanico shranili na -20 °C.

### 3.2.5.3 Načrtovanje oligonukleotidnih začetnikov

Oligonukleotidne začetnike in sonde, ki smo jih uporabili v Q-PCR reakcijah in v semi-kvantitativni PCR metodi, smo načrtovali s programom PrimerExspress™ 2.0 (Applied Biosystems, ZDA). Pri načrtovanju smo upoštevali pogoje in parametre proizvajalca. Dodatno smo preverili še nastajanje sekundarnih struktur in dimerov oligonukleotidnih začetnikov ter specifičnost nanovo načrtovanih zaporedij s primerjavo z znanimi zaporedji v bazah podatkov GenBank s pomočjo programa BLAST (internetni naslov [www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)).

Kot osnovno nukleotidno zaporedje za načrtovanje oligonukleotidnih začetnikov uporabljenih v študiji PTGS smo uporabili nukleotidna zaporedja iz podatkov StGI (TIGR Potato Gene Index, [www.tigr.org/tigr-scripts/tgi/T\\_index.cgi?species=potato](http://www.tigr.org/tigr-scripts/tgi/T_index.cgi?species=potato)). Za posamezne gene AGO1, SGS3 in SDE3 smo poiskali odgovarjajoča TC zaporedja (za gen AGO1 TC74552, za gen SGS3 TC85172 in za gen SDE3 TC89180). V primeru načrtovanja specifičnih oligonukleotidnih začetnikov za gen SGS3 in za gen SDE3 smo

izbrali tako imenovano unikatno regijo (unique oligomer) izbranega TC zaporedja ter ga uporabili kot matrico za načrtovanje oligonukleotidnih začetnikov. V primeru načrtovanja specifičnih oligonukleotidnih začetnikov za analizo gena AGO1 smo izbrali del nukleotidnega zaporedja, ki leži na 5' terminalnem koncu odgovarjajočega TC zaporedja. Za ta del smo se odločili, ker predstavlja proteinsko domeno PAZ (internetni naslov:

([http://www.tigr.org/tigr-scripts/tgi/tc\\_report.pl?tc=TC74552&species=Potato](http://www.tigr.org/tigr-scripts/tgi/tc_report.pl?tc=TC74552&species=Potato)).

Pri načrtovanju oligonukleotidnih začetnikov in sonde za analizo *luc* smo uporabili originalno nukleotidno zaporedje iz GenBank baze številka X65316, za analizo gena CP virusa PVY<sup>NTN</sup> pa smo uporabili objavljeno nukleotidno zaporedje iz GenBank baze številka AF321554.

### 3.2.5.4 Semi-kvantitativni PCR

Za vsak vzorec smo pripravili šest samostojnih reakcijskih mešanic.

Reakcijska mešanica	
2X Universal Master Mix (2X UMM) (Applied Biosystems, ZDA)	1X
začetni oligonukleotidni začetnik (10 pmol / µl)	18 pmol
končni oligonukleotidni začetnik (10 pmol / µl)	18 pmol
cDNA vzorca (poglavje 3.2.5.2)	2 µl (40 ng)
Dopolnimo z ddH <sub>2</sub> O do končnega volumna 20 µl	

Pogoji reakcije v cikličnem termostatu Gene Amp 9700 so bili:

50 °C 2 min (inkubacija), 95 °C 10 min (začetna denaturacija) in 45 ciklov 95 °C 15 s (čas denaturacije), 60 °C 60 s (čas prileganja oligonukleotidnih začetnikov in podaljševanja verige).

Po 20, 25, 30, 35, 40 in 45 ciklu smo iz cikličnega termostata odstranili eno izmed pripravljenih PCR reakcij za isti vzorec. Po končanem PCR protokolu smo vseh šest PCR reakcij istega vzorca analizirali na agaroznem gelu. Iz slike smo določili potrebno število ciklov (C<sub>t</sub>) za posamezni vzorec, ki so potrebni, da je bil produkt PCR viden na agaroznem gelu. Število potrebnih ciklov PCR reakcije za posamezen vzorec je v razmerju s količino startne količine tarčne cDNA v vzorcu. Tako je končen rezultat podan v številu ciklov (C<sub>t</sub>).

### 3.2.5.5 Kvantitativni PCR v realnem času (Q-PCR)

Pri izvedbi kvantitativnega PCR v realnem času (Q-PCR) smo uporabljali specifično TaqMan® kemijsko metodo ali pa manj specifično SYBR Green I kemijsko metodo. Obema kemijskima metodama je skupno merjenje nastalega produkta PCR tekom reakcije na račun sproščene fluorescence, ki je lahko generirana s procesom hidrolize sond ali pa vezave SYBR Green I barvila v dvoverižne DNA. Z nastajanjem produktov PCR narašča tudi fluorescentni signal, ki je sorazmeren količini nastalih produktov PCR v eksponentni fazi PCR reakcije. PCR reakcijo in merjenje fluorescenčnega signala smo opravljali v ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems, ZDA).

#### Detekcija transgena CP in zunanje kontrole *luc*

##### Reakcijska mešanica

2X UMM (Applied Biosystems, ZDA)	1X
začetni oligonukleotidni začetnik (10 pmol / µl)	18 pmol
končni oligonukleotidni začetnik (10 pmol / µl)	18 pmol
označena sonda (10 pmol / µl)	4 pmol
cDNA vzorca (poglavje 3.2.5.2)	2 µl (40ng)

Dopolnimo z ddH<sub>2</sub>O do končnega volumna 20 µl

### Detekcija genov AGO1, SGS3 in SDE3

#### Reakcijska mešanica

2X Universal SYBR Green I Master Mix (Applied Biosystems, ZDA)	1X
začetni oligonukleotidni začetnik (10 pmol / µl)	9 pmol
končni oligonukleotidni začetnik (10 pmol / µl)	9 pmol
cDNA vzorca (poglavlje 3.2.5.)	2 µl

Dopolnimo z ddH<sub>2</sub>O do končnega volumna 10 µl

### Detekcija genov 18S rRNA

#### Reakcijska mešanica

2X UMM (Applied Biosystems, ZDA)	1X
20X PDARs 18S rRNA (Applied Biosystems, ZDA)	1X
cDNA vzorca (poglavlje 3.2.5.)	2 µl

Dopolnimo z ddH<sub>2</sub>O do končnega volumna 10 µl

V vseh primerih so bili pogoji Q-PCR reakcije v cikličnem termostatu ABI PRISM 7900HT:

50 °C 2 min (inkubacija), 95 °C 10 min (začetna denaturacija) in 45 ciklov 95 °C 15 s (čas denaturacije), 60 °C 60 s (čas prileganja oligonukleotidnih začetnikov in podaljševanja verige). V primeru SYBR Green I kemije smo dodali še disociacijski protokol (95 °C 15 s, 60 °C 15 s, 95 °C 15 s).

V različnih Q-PCR reakcijah smo uporabljali različne redčitve cDNA vzorcev.

Specifičnost Q-PCR reakcije za detekcijo transgena (CP) smo potrdili še s določitvijo nukleotidnega zaporedja produkta PCR.

### 3.2.5.5.1 Analiza podatkov Q-PCR

Podatke dobljene iz Q-PCR reakcij smo analizirali s programom SDS v2.2 (Applied Biosystems, ZDA). Fluorescensa reporterske molekule je po reakciji normalizirana glede na fluorescenco ozadja inštrumenta, glede na interno referenčno barvilo ROX, ki je dodano v reakcijsko mešanico in glede na bazno linijo (base line) (šum metode). Normalizirana fluorescensa je podana je kot  $\Delta R_n$ .

Program izriše graf pomnoževanja produkta PCR, pri katerem je število ciklov naneseno na x-os in vrednost  $\Delta R_n$  na y-os. Na eksponentnem delu krivulje določimo linijo fluorescenčnega praga (threshold), ki predstavlja intenziteto fluorescence, ki je značilno večja od fluorescence ozadja. Linija fluorescenčnega praga determinira, število ciklov (Ct) (cycle threshold) pri katerem signal fluorescence, generiran z vzorcem, preseže linijo fluorescenčnega praga. Pri večjem številu tarčnih DNA molekul, fluorescenčni signal prej preseže prag in tako dobimo nižjo vrednost Ct. Torej so vrednosti Ct obratno-sorazmerne s količino tarčnih molekul in na osnovi le-teh primerjamo vzorce med seboj.

V programu SDS smo pregledali podatke in jim določili linijo fluorescenčnega praga. Prag je bil določen v začetni fazi eksponentnega pomnoževanja. Pri določanju relativne ekspresije tarčnih genov, ki so vpleteni v mehanizem utišanja genov, smo uporabili enako vrednost linije fluorescenčnega praga za vse amplikone. Vrednosti Ct smo nato prenesli v program Microsoft Excel, v katerem smo izračunali učinkovitost pomnoževanja posameznega amplikona in določili nivo ekspresije tarčnih genov.

Učinkovitost pomnoževanja posameznega amplikona smo izračunali iz naklona (s) linearne regresijske krivulje v grafu, kjer so vrednosti Ct funkcije  $\log_{10}$  začetne koncentracije tarčnega zaporedja. Učinkovitost (E) pomnoževanja posameznega amplikona smo izračunali z enačbo (1).

$$E = 10^{(l-s)} \quad \dots (1)$$

Iz enačbe linearne regresijske krivulje dobimo tudi koeficient determinacije  $R^2$ , ki je merilo za ujemanje podatkov z linearno regresijsko krivuljo. Minimalna vrednost  $R^2$ , ki nam je bila merilo za dobro prileganje podatkov linearni regresijski krivulji je bilo 0.98.

Končno relativno kvantifikacijo izražanja transgena CP v transformiranih rastlinah krompirja in transformiranih rastlinah tobaka smo izračunali z metodo  $\Delta\Delta Ct$  (Livak in Schmittgen, 2001). Kot referenčni gen, smo v tem primeru, uporabljali zunanjou kontrolo *luc*, amplikon CP pa je predstavljal tarčni gen. Za vsak posamezen vzorec smo izračunali (enačba 2):

$$\Delta Ct = Ct_{(\text{referenčnega gena})} - Ct_{(\text{tarčnega gena})} \quad \dots (2)$$

Kot kalibrator smo uporabili liniji z najvišjo ekspresijo (transgeno linijo krompirja 19 in transgeno linijo tobaka T3).  $\Delta\Delta Ct$  posameznega vzorca proti kalibratorju smo izračunali z enačbo 3:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(\text{kalibratorja})} - \Delta Ct_{(\text{vzorca})} \quad \dots (3)$$

Končno relativno izražanje transgena smo nato izračunali z enačbo 4:

$$\text{Razmerje} = 2^{\Delta\Delta Ct} \quad \dots (4)$$

Prav tako smo izračunali še standardni odklon (SD) za vsak vzorec.

V primeru analize izražanja genov AGO1, SDE3 in SGS3 smo uporabljali metodo, ki jo je v svoji študiji predstavil Pfaffl leta 2001. Metoda temelji na korekciji učinkovitosti za

tarčni gen (tar) in endogeno kontrolo (ref) za vsak posamezen vzorec. Za vsak vzorec in za vsak amplikon smo pripravili po dve redčitvi cDNA in sicer ali 10X in 100X, ali 100X in 1000X, ali 1000X ali 10000X. Določili smo povprečno vrednost Ct (<sub>ave</sub>Ct) za vsako redčitev vsakega amplikona ter ΔCt za vsak amplikon posebej po enačbi 5:

$$\Delta C = {}_{ave}Ct_{višje \ redčitve} - {}_{ave}Ct_{nižje \ redčitve} \quad ... (5)$$

Izračunane ΔCt za posamezne vzorce oziroma amplikone smo uporabili v enačbi 1 za izračun učinkovitosti. Kot kalibrator smo za vsak vzorec inokuliran z PVY<sup>NTN</sup> in vzorčen po določenem času, uporabili enak vzorec, ki je bil tretiran samo s fosfatnim pufrom za mehansko inokulacijo (slepa inokulacija) in vzorčen po enakem času po inokulaciji (na primer vzorec linije 16 inkuliran s PVY<sup>NTN</sup> vzorčen po 4h po inokulaciji, normaliziran z vzorcem linije 16 tretiran samo s fosfatnim pufrom za mehansko inokulacijo, vzorčen po 4 urah). Za končni izračun razmerja smo uporabili enačbo 6:

$$Razmerje = (E_{tar \ vzorca})^{\Delta C t \ tar \ (aveCt \ tar \ kalibratorja - aveCt \ tar \ vzorca)} \div (E_{ref \ vzorca})^{\Delta C t \ ref \ (aveCt \ ref \ kalibratorja - aveCt \ ref \ vzorca)} \quad .. (6)$$

Dobljena razmerja smo preračunali v log<sub>2</sub> vrednosti in opravili statistični test analize variance (ANOVA).

### 3.2.6 DOLOČANJE IZRAŽANJA GENOV V TRANSFORMIRANIH RASTLINAH KROMPIRJA S cDNA MIKROMREŽAMI

Tehnologija mikromrež nam omogoča detekcijo več tisoč genov naenkrat. Metoda se uporablja pri preiskovanju različnih bioloških mehanizmov in regulatornih poti.

Pri našem delu smo uporabljali krompirjeve cDNA mikromreže, imenovane TIGR potato clone cDNA microarray.

Za hibridizacijo cDNA mikromrež smo uporabili sistem kemikalij 3DNA Array 900<sup>TM</sup> Kit (Genisphere, ZDA). Sistem kemikalij temelji na indirektnem označevanju z dendrimeri, ki dodatno okrepijo fluorescentni signal. Osnovni princip kompleta kemikalij je sinteza cDNA vzorca s specifičnimi adapterji, na katere se med hibridizacijo vežejo fluorescentna barvila v obliki dendrimerov (3DNA capture reagent).

Pri delu smo sledili navodilom proizvajalca z manjšimi modifikacijami.

### 3.2.6.1 Hibridizacija krompirjeve cDNA mikromreže

Postopek hibridizacije cDNA mikromrež je sestavljen iz večih posameznih korakov.

Izolirali smo celokupno RNA kot je opisano v poglavju 3.2.3.1.1. Določili smo koncentracije izoliranih celokupnih RNA, ki smo jih hibridizirali na isto cDNA mikromrežo (uravnavanje na agaroznem gelu ali s pomočjo inštrumenta Agilent 2100 Bioanalyzer). Z encimom DNaze I smo razgradili gDNA iz izolirane celokupne RNA (poglavje 3.2.5.1).

Za uspešno hibridizacijo na cDNA mikromreže je potrebno odstranit ostanke encima DNaze I iz vzorca izolirane celokupne RNA. V ta namen smo uporabljali komplet kemikalij RNeasy MinElute kit (Qiagen, ZDA) in originalni protokol proizvajalca. Edina sprememba protokola je bila v koraku spiranja celokupne RNA iz kolon. V omenjenem koraku smo spirali vezano RNA s segreto (65 °C) ddH<sub>2</sub>O in kolone dodatno inkubirali na sobni temperaturi 5 min.

cDNA mikromreže smo hibridizirali s pari vzorcev iste linije, kjer je bil en vzorec inokuliran z virusom in vzorčen po določenem času, drug pa slepo inokuliran in vzorčen po istem času. Pri vsaki hibridizaciji smo en vzorec v paru označili s fluorescentnim barvilom Cy3 (cyanine3), drugega pa s fluorescentnim barvilom Cy5 (cyanine5). Barvila

smo med vzorci naključno menjavali (dye swap).

Opis postopka (Baebler in sod., 2005):

- sinteza cDNA

Uporabili smo originalni protokol proizvajalca. Osnovna strategija je bila, da smo 10 µl vzorca dodali 1000 pg *luciferaze* mRNA. Glede na to, katera dva vzorca smo nanesli na isto cDNA mikromrežo, smo enemu izmed vzorcev dodali oligonukleotidni začetnik z dodanim adapterjem, na katerega se kasneje veže barvilo Cy3. Drugemu vzorcu pa smo dodali oligonukleotidni začetnik z dodanim adapterjem, na katerega se kasneje veže barvilo Cy5. Po končani sintezi smo vzorce kombinirali tako, da smo na isto cDNA mikromrežo nanesli isto transgeno linijo krompirja, le da je bil en vzorec inokuliran z virusom PVY<sup>NTN</sup> in označen z adapterjem za eno barvilo, drugi vzorec pa slepo inokuliran ter označen z adapterjem za drugo barvilo. Po končani sintezi cDNA smo uspešnost reverzne transkripcije preverili na agaroznem gelu.

- koncentriranje cDNA vzorcev

Za koncentriranje in čiščenje z adapterji označene cDNA smo uporabljali kolone Microcon YM-30 Centrifugal Filter Devices (Millipore, ZDA). Pri delu smo sledili originalnemu protokolu proizvajalca.

- predpriprava cDNA mikromrež pred hibridizacijo

Predhibridizacija cDNA mikromrež v predhibridizacijski raztopini z dodanim BSA pomaga zmanjšati nekatere vrste nespecifičnih vezav, ki so glavni razlog za visoko ozadje. Tako smo cDNA mikromreže inkubirali v predhibridizacijski raztopini 45 min na 42 °C. Po končani inkubaciji smo sprali cDNA mikromreže v ddH<sub>2</sub>O in 100% izopropanolu ter jih centrifugirali 2 min pri 1000 g. Centrifugirano cDNA mikromrežo smo, do nanosa vzorcev, spravili na termoblok segret na 55 °C.

- nanos vzorcev na cDNA mikromrežo

Vzorce smo raztopili v formamidnem hibridizacijskem pufu pripravljenem iz uporabljenega kompleta reagentov. Hibridizacijski pufer smo pripravili po protokolu proizvajalca. Pripravljeni hibridizacijski pufer smo nanesli na segrete cDNA mikromreže, pokrite s posebnimi krovnimi stekli LifterSlip (Erie Scientific Company, ZDA) in jih položili v hibridizacijsko komoro (GeneMachines, ZDA). V hibridizacijski komori smo žlebičke napolnili z 10X SSC raztopino. Hibridizacijske komore s cDNA mikromrežami smo inkubirali preko noči v vodni kopeli na 45 °C.

- spiranje cDNA mikromrež

Po inkubaciji smo cDNA mikromreže spirali po 5 min v treh različnih raztopinah: 1. raztopina: 1X SSC in 0.1% SDS; 2. raztopina: 0.1X SSC in 0.1% SDS in 3. raztopina: 0.1X SSC. Po končanem spiranju smo cDNA mikromreže centrifugirali 2 min pri 1000 g. Centrifugirano cDNA mikromrežo smo, do nanosa vzorcev, spravili na termoblok segret na 55 °C.

- sekundarna hibridizacija z dendrimeri

Pripravili smo formamidni hibridizacijski pufer po protokolu proizvajalca. V hibridizacijski pufer smo dodali fluorescentna barvila: Cy3 dendrimeri in Cy5 dendrimeri iz uporabljenega kompleta reagentov. Zaradi občutljivosti uporabljenih barvil smo delo izvajali v zatemnjenem laboratoriju. Hibridizacijski pufer smo nanesli na segrete cDNA mikromreže, jih pokrili s krovniki LifterSlips in položili v hibridizacijsko komoro. V hibridizacijski komori smo žlebičke napolnili z 10X SSC raztopino. Hibridizacijske komore s cDNA mikromrežami smo inkubirali 4 ure v vodni kopeli na 45 °C.

- spiranje cDNA mikromrež

Po inkubaciji smo cDNA mikromreže spirali po 5 min v treh različnih, predhodno segretih raztopinah in sicer: 1. raztopina: 1X SSC, 0.1% SDS, 0.01 M DTT; 2. raztopina (segreta na 55 - 60 °C): 0.1X SSC, 0.1% SDS in 0.01 M DTT; in 3. raztopina (segreta na 55 - 60 °C):

0.1X SSC. Po končanem spiranju smo cDNA mikromreže centrifugirali 2 min pri 1000 g. Centrifugirane cDNA mikromreže smo spravili v zatemnjene škatle.

V raztopino 1. in 2. smo pri spiranju dodali DTT. DTT je 0.1 M ditiotreitol (Sigma, ZDA) in deluje kot antioksidant ter tako prepreči bledenje fluorescentnih barvil.

- optično branje cDNA mikromrež

Fluorescenco barvil Cy3 in Cy5, vezanih na cDNA mikromreže, smo izmerili z optičnim čitalnikom LS200 scanner (TECAN, ZDA) v kombinaciji s programom ArrayPro Analyzer® (Media Cybernetics, ZDA).

Zaznali smo moč svetlobe, ki jo oddajata fluorescentni barvili. Fluorescenco barvil smo vzbujali z laserjem z valovno dolžino 633 nm za barvilo Cy5 (672 - 712 nm, rdeči del vidnega spektra) in z laserjem z valovno dolžino 543 nm za barvilo Cy3 (573 – 613 nm, zeleni del vidnega spektra). Pri merjenju fluorescence barvil smo sledili protokolu proizvajalca. Nastavili smo le osnovne geometrijske parametre uporabljenih cDNA mikromrež in jakost spodbujevalne laserske svetlobe (gain). Jakost spodbujevalne laserske svetlobe smo prilagajali glede na jakosti dobljenega signala barvila (v našem primeru smo okno nastavili v razponu od 180 - 200).

Optični čitalnik prebere cDNA mikromeže dvakrat, za vsako barvilo posebej, tako da odčita: optično branje emitirane svetlobe barvila Cy5 (laser = 633 nm, filter = 670 nm) in optično branje emitirane svetlobe barvila Cy3 (laser = 543 nm, filter = 590 nm). Vsako točko odčita dvakrat (oversampling), pri ločljivosti 10 µm. Po končanem odčitavanju smo dobili rezultate za vsako cDNA mikromrežo v obliki dveh slik (eno za Cy5 in drugo za Cy3) v formatu \*.tiff.

#### Predhibridizacijska raztopina

5X SSC, 0.1% SDS, 1% BSA

### 20X SSC pufer

3 M NaCl, 0.3 M natrijev citrat; pH = 7

### 1X TE

10 mM TRIS-HCl, 1 mM EDTA; pH = 8.0

### Pufer za posthibridizacijsko spiranje 1

1X SSC, 0,1% SDS

### Pufer za posthibridizacijsko spiranje 2

0.1X SSC, 0.1% SDS

### Pufer za posthibridizacijsko spiranje 3

0.1X SSC

### DTT

0.1 M ditiotreitol, 3 M natrijev acetat; pH = 5.2

### 3.2.6.2 Analiza podatkov cDNA mikromrež

Rezultati cDNA mikromrež so ogromne količine podatkov, ki jih moramo obdelati s primerno računalniško statistično metodo, kar nam omogoča lažjo predstavitev rezultatov (Alba in sod., 2004).

Osnovno obdelavo slik cDNA mikromrež, dobljenih z optičnim branjem, opravimo s programom za analizo slik ArrayPro (Media Cybernetics, ZDA) (Baebler in sod., 2005). S programom smo na sliko cDNA mikromreže postavili mrežo, s čimer smo definirali območje, kjer je nanesena cDNA. Vsaki točkovno naneseni cDNA smo pripisali podatke iz datoteke GAL. S programom ArrayPro smo nato izračunali naslednje parametre: Rf, Gf, Rb, Gb in standardni odklon (SD), ki so nam služili za nadaljnja preračunavanja. Rf (red foreground) je intenziteta signala Cy5 v posamezni točki in Gf (green foreground) je intenziteta signala Cy3 v posamezni točki. Rf oziroma Gf je modificirana aritmetična sredina (trimmed mean) (izločimo 5% najmanjših in največjih vrednosti) signala slikovnih

elementov (pixel) na celotni površini posamezno točkovno nanesene cDNA. Rb (red background) je ozadje posamezne točke za Cy5 in Gb (green background) je ozadje posamezne točke za Cy3. Gb oziroma Rb je modificirana aritmetična sredina (trimmed mean) signala v lokalnih kotih posamezne cDNA točke mikromreže. S pomočjo danih parametrov smo nato izločili točke z neprimerno kvaliteto (Alba in sod., 2004). Osnovno informacijo o kvaliteti določene točke in uspešnost hibridizacije smo določili glede na naslednje kriterije:

- Mesta na cDNA mikromreži, kjer cDNA ni bila nanesena (ID = null)
- Točke, kjer cDNA ni validirana (ID = 0)
- Točke nepravilnih oblik (na primer oblika obroča)

Pogoj:  $Rf/Rf\_SD < 1$  in hkrati  $Gf/Gf\_SD < 1$

- Točke z nizkim razmerjem med signalom in šumom (signal to noise)

Pogoj:  $Rf/Rb\_SD < 3$  in hkrati  $Gf/Gb\_SD < 3$

- Točke z nizkim signalom glede na ozadje na obeh kanalih

Pogoj:  $Rf/Rb < 1.5$  in hkrati  $Gf/Gb < 1.5$

Če posamezna točka ni zadostila danim kriterijem smo jo označili.

Za nadaljnjo obdelavo podatkov smo za vsako točko posebej izvozili naslednje vrednosti: ime gena, ki ga predstavlja odgovarjajoča točka, oznako klona, Gf, Rf, Gb, Rb in osnovno informacijo o kvaliteti same meritve.

Tako popravljene in označene podatke smo shranili v obliko, ki je primerna za nadaljnjo analizo v programskem okolju R (internet naslov <http://www.r-project.org>, R Development Core Team (2005). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.).

V programskem okolju R smo uporabljali knjižnice »limma« in »base« (Smyth in sod., 2005). Pripravili smo še poseben dokument, ki nam je služil za uvoz podatkov v

programsко okolje R in se imenuje »phenodata«. Dokument je vseboval vse osnovne podatke o cDNA mikromrežah, ki smo jih žeeli analizirati.

Naslednji korak je bila normalizacija podatkov. Pomen normalizacije je v odstranjevanju lokalne in sistemsko napake jakosti dobljenih signalov zaradi neenakomerne vključevanja fluorescentnih barvil ali zaradi uporabljenih neenakih količin nanesenih vzorcev. Obstaja več različnih tipov normalizacij z določenimi prednostmi in slabostmi (Zhao in sod., 2005). V našem primeru smo se odločili za tip normalizacije imenovan »LOWESS« (locally weighted linear regression) z 10 iteracijami (Quackenbush, 2002). Uporabljen sistem normalizacije predpostavlja, da večina genov ni značilno različno izražena oziroma, da je število genov s povečanim ali znižanim izražanjem enako. Pred normalizacijo smo popravili signal (Rf ali Gf), tako da smo od fluorescence signala odšteli ozadje za vsako valovno dolžino posebej (Rb ali Gb) in dobili vrednosti R in G (Smyth in sod., 2003). Izračunali smo vrednost M (enačba 7) in vrednost A (enačba 8) za posamezno točkovno naneseno cDNA, ki so definirane kot:

$$M = \log_2 (R / G) \quad \dots (7)$$

$$A = 0.5 \log_2 (R * G) \quad \dots (8)$$

Nato smo povprečili A in M vrednosti med paralelkami klonov cDNA. V primeru, da smo, zaradi slabe kvalitete, eno izmed paralelk v predhodni analizi izključili, smo upoštevali le vrednost dobre paralelke. Pri tako pripravljenih podatkih smo upoštevali še izbiro označevanja z določenim barvilm (dye swap) in če je v našem primeru bil kontrolni vzorec označen z barvilm Cy5 smo vrednosti M cDNA mikromrež pomnožili z -1. Podatke smo pred nadaljnjo analizo ponovno filtrirali in sicer odločili smo se, da iz nadaljnje analize izvzamemo gene, katerih M vrednost je v območju med -0.3 do 0.3 in gene, pri katerih je bila neuspešna hibridizacija v več kot 42 % hibridiziranih cDNA mikromrež (kar pomeni pri 10 cDNA mikromrežah od 24 cDNA mikromrež). Končne

podatke smo shranili v obliki tabele in jih pripravili za nadaljnji statistični test analize variance (ANOVA).

Izvedli smo več analiz. Analiza variance (ANOVA) se ukvarja z razčlenitvijo skupne variabilnosti, merjene z vsoto kvadratov odklonov opazovanih vrednosti od aritmetične sredine, z upoštevanjem delov, ki so opredeljeni z različnimi viri variiranja, kar pomeni, da v poizkusu primerjamo več različnih pogojev. Uporabili smo dva modela ANOVE upoštevajoč različne parametre (L linije; C čas; R odziv posamezne linije na okužbo; B biološka ponovitev). Prvi model je bila gnezdena oblika ANOVA metode in sicer ( $x \sim (R/L)*C + \text{Error}(B)$ ) in drugi model ( $x \sim L*C + \text{Error}(B)$ ). Končne podatke statističnega testa analize variance smo prikazali in grupirali s pomočjo programa MeV 3 ([MultiExperiment Viewer](http://www.tigr.org/software/microarray.shtml)) (<http://www.tigr.org/software/microarray.shtml>). S programom MapMan (Thimm in sod., 2004) smo dodatno statistično značilno izraženim genom pripisali biološko vlogo v rastlini.

### **3.2.7 DOLOČANJE PRISOTNOSTI siRNA MOLEKUL V TRANSFORMIRANIH RASTLINAH KROMPIRJA**

#### **3.2.7.1 Detekcija siRNA z radioaktivnim označevanjem**

Detekcija siRNA je ključnega pomena pri dokazovanju nastanka siRNA molekul, ki so vodilne molekule v mehanizmu utišanja genov.

Opis postopka:

Izvorni material za detekcijo je lahko izolirana celokupna RNA ali pa izolirane majhne molekule RNA (siRNA).

- Priprava poliakrilamidnega gela

Ločevanje molekul RNA po velikosti je potekalo na 15% poliakrilamidnem gelu. Sestava gela: 7.5 M urea, 15% akrilamid (40% v razmerju 19:1) (ROTH, Nemčija), 1X TBE pufer, 10% amonijev persulfat (APS) in 0.1% TEMED (Kodak, ZDA).

- Nanos vzorcev

Po končani polimerizaciji poliakrilamidnega gela, smo na gel nanesli 30 µg celokupne RNA ali 1 µg izolirane siRNA, raztopljene v 2X pufru za nanašanje. Pufer za nanašanje je sestavljen iz 2 ml glicerola, 8 ml 0.5 M EDTA (pH = 8), barvil BFB, XC, 10 µl DEPC in 1.8 ml deioniziranega formamida (Sigma, ZDA) na 1 ml prvočne raztopine. Vzorce smo pred nanosom denaturirali 5 min na 95 °C.

- Ločevanje na gelu

Ločevanje na poliakrilamidnem gelu je potekalo v 1X TBE pufru 16 ur na napetosti 70 V in nato še dodatno 2 uri na napetosti 300 V.

- Preverjanje integritete nanesene RNA

Poliakrilamidni gel smo obarvali z EtBr in preverili nanos celokupne RNA z UV-transluminatorjem.

- Prenos RNA na membrano

Pri prenosu RNA na najljonsko membrano Hybon N (Amersham Pharmacia Biotech, Francija) smo uporabili semi-suhi način prenosa s pomočjo instrumenta Semi-Dry blotter II (Biozym, Nemčija). V instrument smo naložili 3 kose, v 0.5X TBE pufer namočen, Whatman papirja (Whatman, Velika Britanija), Hybon N membrano, poliakrilamidni gel z vzorci in ponovno 3 kose omočenega Whatman papirja. Prenos RNA na membrano je tekel eno uro pri napetosti 5 do 6 V.

- Fiksiranje RNA na Hybon N membrano

Fiksiranje RNA na najlonsko membrano smo izvedli s pomočjo ultra-vijoličnega žarčenja z energijo 150 mJoules v inštrumentu GS Gene Linker UV Chamber (BIO-RAD, ZDA) in dodatnim segrevanjem membrane na 80 °C 30 min v inštrumentu HB-1000 Hybridizer (UVP Inc., ZDA).

- Prehibridizacija

Za prehibridizacijo smo uporabljali hibridizacijski pufer, ki sestoji iz 5X SSC, 20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH = 7.2), 7% SDS, 2X Denhardts raztopine. Prehibridizacijsko mešanico smo segregali na 50 °C. Membrano smo vstavili v hibridizacijski cilinder, dodali hibridizacijsko raztopino, ki smo ji naknadno dodali še 1.6 mg gDNA lososovih testisov (Salmon Testis DNA (10 mg / ml) (Sigma, ZDA)). Prehibridizacija je potekala 4 ure na 50 °C v hibridizacijski pečici Hybridiser HB-1D (Techne, Velika Britanija).

- Priprava produkta PCR za hibridizacijsko sondu

S PCR reakcijo smo pripravili produkt PCR, ki nam je služil kot osnova za hibridizacijsko sondu. Uporabili smo oligonukleotidne začetnike, ki ležijo na 5' in 3' terminalnem koncu transgena CP in PCR protokol, delo Stanič-Racman, 2002.

Reakcijska mešanica

10X Buffer II (Applied Biosystems, ZDA)	1X
MgCl <sub>2</sub> (25 mM) (Applied Biosystems, ZDA)	2.5 mM
dNTP (10 mM) (Applied Biosystems, ZDA)	0.7 mM
FS-CPY5' (10 pmol / µl)	2 pmol
S-CPY3' (10 pmol / µl)	2 pmol
cDNA (poglavlje 3.2.5.2 (transgena linija krompirja 35))	2 µl

Dopolnimo z ddH<sub>2</sub>O do končnega volumna 30 µl

Pogoji reakcije v cikličnem termostatu GeneAmp 9700 so bili:

94 °C 2 min (začetna denaturacija), dodamo 0.5 U DNA-polimerze (AmpliTaq polimerase

(5 U /  $\mu$ l) (Applied Biosystems, ZDA), nato sledi 30 ciklov: 94 °C 40 s (denaturacija), 55 °C 40 s (naleganje oligonukleotidnih začetnikov), 68 °C 2 min (podaljševanja verige), sledi še končna ekstenzija in sicer 72 °C 7 min in nato inkubacija na 4 °C.

Produkt PCR smo preverili na agaroznem gelu in ga očistili (poglavje 3.2.3.2.1 in 3.2.4.2).

- Označevanje hibridizacijske sonde

Uporabljali smo sistem reagentov Rediprime random prime labeling kit (Promega, ZDA) in originalni protokol proizvajalca. Kot izvorni material nam je služilo 25 ng produkta PCR CP virusa PVY<sup>NTN</sup>. Produkt PCR smo prvotno denaturirali 5 min na 95 °C in mu dodali komponente iz sistema Rediprime random prime labeling kit. Dodali smo 5  $\mu$ l nukleotida dCTP označenega s  $^{32}\text{P}$ . Mešanico smo inkubirali 60 min na 37 °C. Po končani inkubaciji smo očistili sondu s setom kemikalij Bio-Spin p30 Columns (BIO-RAD, ZDA) po navodilih proizvajalca.

- Hibridizacija

Prehibridizacijski pufer smo zamenjali z novim hibridizacijskim pufrom. Hibridizacijski pufer smo segreli na 50 °C in mu dodali 1.6 mg, predhodno denaturirane (5 min na 95 °C) gDNA lososovih testisov. V hibridizacijski cilinder s hibridizacijskim pufrom smo dodali še radioaktivno označeno sondu. Hibridizacija je potekala preko noči na 50 °C v hibridizacijski pečici.

- Spiranje in detekcija

Membrano smo spirali 3 krat na 50 °C po 10 min v raztopini (3X SSC, 5% SDS, 25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH = 7.5), 10X Denhardts raztopini) in enkrat 5 min na 50 °C v raztopini (1X SSC, 1% SDS). Po končanem spiranju smo najlonsko membrano prenesli v kasete za detekcijo radioaktivnosti. Detekcija, v kasetah Phosphorscreen Molecular Dynamics (Molecular Dynamics, ZDA), je potekala preko noči. Končno detekcijo smo opravili v instrumentu Phosphor Imager 445 SI (Molecular Dynamics, ZDA).

### 10X TAE pufer

400 mM TRIS borat (pH 8.0), 10 mM EDTA

### 100X Denhartova raztopina

2% Ficoll (MW 400) (Sigma, ZDA), 2% BSA (Sigma, ZDA), 2% PVP (Merck, Nemčija)

## 3.3 VARNO DELO Z GENSKO SPREMENJENIMI ORGANIZMI

### **3.3.1 DELO S TRANSGENIMI BAKTERIJAMI**

Tekom določanja nukleotidnega zaporedja genoma virusa PVY<sup>NTN</sup> smo pridobili več transgenih bakterij *E. coli*. Delovne površine, na katerih smo delali, smo pred in po delu očistili s 70% EtOH, prav tako smo pri delu uporabljali zaščitne rokavice, ki smo jih po uporabi avtoklavirali.

Ves uporabljen material in embalažo smo po končanem raziskovalnem delu avtoklavirali in zavrgli.

### **3.3.2 DELO S TRANSGENIMI RASTLINAMI**

Rastline smo gojili v rastnih komorah, kjer je onemogočen vstop prenašalcem virusov.

Ves uporabljen rastlinski material, gojišča, petrijevke, zemljo in lončke smo po končanem delu avtoklavirali in zavrgli.

## 4 REZULTATI

### 4.1 DOLOČANJE NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA GENOMA VIRUSA PVY<sup>NTN</sup>-NIB

Namen raziskovalnega dela je bila natančna določitev nukleotidnega zaporedje celotnega genoma virusa PVY<sup>NTN</sup>-NIB in filogenetska primerjava dobljenega nukleotidnega zaporedja z ostalimi objavljenimi nukleotidnimi zaporedji virusov PVY.

#### 4.1.1 KLONIRANJE GENOMA VIRUSA PVY<sup>NTN</sup>-NIB

Za izolacijo celokupne RNA iz listov okuženih rastlin tobaka z jasno izraženimi nekrozami (slika 8) smo uporabljali komplet kemikalij RNeasy Plant Mini kit.



**Slika 8: Razvoj bolezenskih znamenj po okužbi tobaka sorte 'Samsun' z virusom PVY<sup>NTN</sup>.**

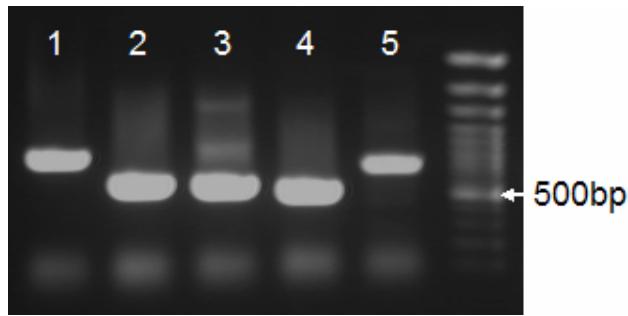
Sistemski simptomi 14 dni po inokulaciji. Levo je rastlina inokulirana z virusom PVY<sup>NTN</sup>, desno pa kontrolna neinokulirana rastlina tobaka.

Figure 8: Symptom development after mechanical inoculation of tobacco cv. Samsun with PVY<sup>NTN</sup>.

Systemic symptoms 14 days post inoculation (DPI). Tobacco inoculated with PVY<sup>NTN</sup> (left) and uninoculated tobacco (right).

Izolirano celokupno RNA smo s postopkom reverzne transkripcije prepisali v komplementarno verigo RNA imenovano cDNA (komplementarna DNA). Odločili smo se za izvedbo enostopenjske RT-PCR reakcije z uporabo specifičnih oligonukleotidnih začetnikov, ki so komplementarni že znanim objavljenim nukleotidnim zaporedjem sorodnih izolatov virusa PVY. S pomočjo različnih kombinacij specifičnih oligonukleotidnih začetnikov (preglednica 4) smo generirali več različno dolgih fragmentov (preglednica 8), ki smo jih kasneje uporabili za direktno ali posredno določanje nukleotidnega zaporedja.

Po končani RT-PCR reakciji smo celoten volumen reakcije nanesli na agarozni gel (pripravljen iz modificiranega 1X TAE pufra), kjer smo preverili velikost dobljenih produktov RT-PCR (slika 9). Velikost produktov smo določili s pomočjo označevalca velikosti. Če so bili produkti RT-PCR prave velikosti, smo jih izrezali iz agaroznega gela in očistili. Očištene produkte RT-PCR smo ponovno nanesli na agarozni gel in glede na jakost obarvanosti fragmenta približno določili njegovo koncentracijo.



**Slika 9: Elektroforeza produktov RT-PCR za določanje nukleotidnega zaporedja virusa PVY<sup>NTN</sup>-NIB.**

1. uspešno pomnožen fragment 1 (10S in 890AS); 2. uspešno pomnožen fragment 2 (570S in 1170AS); 3. uspešno pomnožen fragment 3 (870S in 1490AS); 4. uspešno pomnožen fragment 4 (1170S in 1710AS); 5. uspešno pomnožen fragment 5 (1670S in 2465AS); 6. označevalec velikosti.

Figure 9: RT-PCR products used for sequencing of PVY<sup>NTN</sup>-NIB.

1. amplified RT-PCR product 1 (10S and 890AS); 2. amplified RT-PCR product 2 (570S and 1170AS); 3. amplified RT-PCR product 3 (870S and 1490AS); 4. amplified RT-PCR product 4 (1170S and 1710AS); 5. amplified RT-PCR product 5 (1670S and 2465AS); 6. MW marker.

**Preglednica 8: Rezultati pomnoževanja genoma PVY<sup>NTN</sup>-NIB z različnimi kombinacijami oligonukleotidnih začetnikov z RT-PCR metodo.**

Stolpec 1: ime fragmenta RT-PCR; Stolpec 2: Začetni oligonukleotidni začetnik (S); Stolpec 3: Končni oligonukleotidni začetnik (AS); Stolpec 4: Dolžina fragmentov RT-PCR v bp. Stolpec 5: Uspešnost RT-PCR reakcije (+ pozitiven rezultat; - negativen rezultat); Stolpec 6: Kloniranje fragmentov RT-PCR v vektorski sistem pGEM-T (+ kloniran fragment RT-PCR v plazmid).

Številčna oznaka v imenu začetnega in končnega oligonukleotidnega začetnika pomeni položaj oligonukleotidnega začetnika v genomu izolata PVY<sup>NTN</sup>-H (Thole s sod., 1993).

Table 8: RT-PCR amplification of genome sequence of virus PVY<sup>NTN</sup>-NIB using different combinations of primers for RT-PCR.

Column 1: Name of RT-PCR product; Column 2: Forward primer (S); Column 3: Reverse primer (AS); Column 4: size of RT-PCR product; Column 5: successful multiplication by RT-PCR (+ positive result; - negative result); Column 6: cloning of RT-PCR product into the pGEM-T system (+ inserted RT-PCR product in pGEM-T plasmid).

The number in the name of primers indicates a position of primer in PVY<sup>NTN</sup>-H genome sequence (Thole s sod., 1993).

Produkt RT-PCR	Začetni oligonukleotidni začetnik	Končni oligonukleotidni začetnik	Dolžina fragmentov RT-PCR v bazah	Uspešnost RT-PCR reakcije	Kloniranje v pGEM-T vektor
Fragment 1, 30, 65	10 S	890 AS	870	+/-/+	Ø
Fragment 2	570 S	1170 AS	600	+	Ø
Fragment 3	870 S	1490 AS	520	+	Ø
Fragment 4, 77	1170 S	1710 AS	540	+/-	+
Fragment 5	1670 S	2465 AS	795	+	+
Fragment 6	2210 S	2780 AS	570	+	Ø
Fragment 7, 9,	2480 S	2780 AS	300	-/-	Ø
Fragment 8	1750 S	2780 AS	1030	+	+
Fragment 10	2480 S	2850 AS	460	+	Ø
Fragment 11, 78	2730 S	3410 AS	680	+/-	+
Fragment 12	3480 S	4500 AS	1020	+	+
Fragment 13	4050 S (Koh 3)	4665 AS (Samui 3)	615	+	+
Fragment 14	4530 S (Lang 4)	4985 AS (Kawi 4)	455	+	Ø
Fragment 15	3730 S	4230 AS	510	+	+
Fragment 16	3890 s	4250 AS	360	-	Ø
Fragment 17	5320 S	5830 AS	510	+	Ø
Fragment 19	5460 S	6270 AS	810	+	+
Fragment 20	5930 S	6270 AS	340	+	+
Fragment 21	6270 S	7300 AS	1030	+	+
Fragment 24	7170 S	8050 AS	880	+	+
Fragment 25	7830 S	8430 AS	600	+	+
Fragment 26	8380 S	8940 AS	560	+	+
Fragment 27	8910 S	9360 AS	450	+	+

se nadaljuje

nadaljevanje

**Preglednica 8: Rezultati pomnoževanja genoma PVY<sup>NTN</sup>-NIB z različnimi kombinacijami oligonukleotidnih začetnikov z metodo RT-PCR.**

Stolpec 1: ime fragmenta RT-PCR; Stolpec 2: Začetni oligonukleotidni začetnik (S); Stolpec 3: Končni oligonukleotidni začetnik (AS); Stolpec 4: Dolžina fragmentov RT-PCR v bp. Stolpec 5: Uspešnost RT-PCR reakcije (+ pozitiven rezultat; - negativen rezultat); Stolpec 6: Kloniranje fragmentov RT-PCR v pGEM-T (+ kloniran fragment RT-PCR v plazmid).

Številčna oznaka v imenu začetnega in končnega oligonukleotidnega začetnika pomeni položaj oligonukleotidnega začetnika v genomu izolata PVY<sup>NTN</sup>-H (Thole s sod., 1993).

Table 8: RT-PCR amplification of genome sequence of virus PVY<sup>NTN</sup>-NIB using different combinations of primers for RT-PCR.

Column 1: Name of RT-PCR product; Column 2: Forward primer (S); Column 3: Reverse primer (AS); Column 4: size of RT-PCR product; Column 5: successful multiplication by RT-PCR (+ positive result; - negative result); Column 6: cloning of RT-PCR product into the pGEM-T system (+ inserted RT-PCR product in pGEM-T plasmid).

The number in the name of primers indicates a position of primer in PVY<sup>NTN</sup>-H genome sequence (Thole s sod., 1993).

Produkt RT-PCR	Začetni oligonukleotidni začetnik	Končni oligonukleotidni začetnik	Dolžina fragmentov RT-PCR v bazah	Uspešnost RT-PCR reakcije	Kloniranje v pGEM-T vektor
Fragment 28	9325 S	9700 AS	375	+	+
Fragment 31	2160 S	2780 AS	620	+	Ø
Fragment 32	2160 S	2430 AS	270	-	Ø
Fragment 33	3825 S	4500 AS	675	+	Ø
Fragment 34	3825 S	4250 AS	425	+	Ø
Fragment 35	5320 S	5940 AS	620	-	Ø
Fragment 36	5460 S	5940 AS	480	+	Ø
Fragment 37	7170 S	7980 AS	810	+	Ø
Fragment 40	1670 S	2465 AS	760	-	Ø
Fragment 41	1480 S	2430 AS	950	+	Ø
Fragment 42	2730 S	3800 AS	1070	-	Ø
Fragment 43	4350 S	4840 AS	490	-	Ø
Fragment 44	4530 S	4970 AS	440	+	Ø
Fragment 45	4430 S	5420 AS	990	+	Ø
Fragment 46	5460 S	6270 AS	810	+	Ø
Fragment 47	6270 S	7300 AS	1030	+	Ø
Fragment 48	6270 S	6580 AS	310	+	Ø
Fragment 50	870 S	2780 AS	1910	+	Ø
Fragment 51	870 S	2850 AS	1980	+	Ø
Fragment 52	570 S	2780 AS	2210	+	Ø

se nadaljuje

nadaljevanje

**Preglednica 8: Rezultati pomnoževanja genoma PVY<sup>NTN</sup>-NIB z različnimi kombinacijami oligonukleotidnih začetnikov z metodo RT-PCR.**

Stolpec 1: ime fragmenta RT-PCR; Stolpec 2: Začetni oligonukleotidni začetnik (S); Stolpec 3: Končni oligonukleotidni začetnik (AS); Stolpec 4: Dolžina fragmentov RT-PCR v bp. Stolpec 5: Uspešnost RT-PCR reakcije (+ pozitiven rezultat; - negativen rezultat); Stolpec 6: Kloniranje fragmentov RT-PCR v pGEM-T (+ kloniran fragment RT-PCR v plazmid).

Številčna oznaka v imenu začetnega in končnega oligonukleotidnega začetnika pomeni položaj oligonukleotidnega začetnika v genomu izolata PVY<sup>NTN</sup>-H (Thole s sod., 1993).

Table 8: RT-PCR amplification of genome sequence of virus PVY<sup>NTN</sup>-NIB using different combinations of primers for RT-PCR.

Column 1: Name of RT-PCR product; Column 2: Forward primer (S); Column 3: Reverse primer (AS); Column 4: size of RT-PCR product; Column 5: successful multiplication by RT-PCR (+ positive result; - negative result); Column 6: cloning of RT-PCR product into the pGEM-T system (+ inserted RT-PCR product in pGEM-T plasmid).

The number in the name of primers indicates a position of primer in PVY<sup>NTN</sup>-H genome sequence (Thole s sod., 1993).

Produkt RT-PCR	Začetni oligonukleotidni začetnik	Končni oligonukleotidni začetnik	Dolžina fragmentov RT-PCR v bazah	Uspešnost RT-PCR reakcije	Kloniranje v pGEM-T vektor
Fragment 53	570 S	2850 AS	2280	+	Ø
Fragment 54	570 S	3410 AS	2840	+	Ø
Fragment 55	10 S	3410 AS	3410	+	Ø
Fragment 56	6270 S	8050 AS	1780	+	Ø
Fragment 57	8380 S	8940 AS	560	+	+
Fragment 58	8910 S	9700 AS	790	+	Ø
Fragment 60	10 S	320 AS	310	+	Ø
Fragment 61	1585 S (DJN 1585 S)	2020 AS	435	+	Ø
Fragment 62	3280 S	3480 AS	200	+	Ø
Fragment 63	3825 S	4150 AS	325	+	+
Fragment 64	7170 S	7830 AS	660	+	Ø
Fragment 66	570 S	890 AS	320	+	Ø
Fragment 67	2480 S	Nat 2880 AS	400	+	Ø
Fragment 68	Nat 2900 S	Nat 3355 AS	455	+	Ø
Fragment 69	4840 S	Nat 5535 AS	695	+	Ø
Fragment 70	5980 S	Nat 6375 AS	395	+	+
Fragment 71	Nat 6483 S	Nat 6926 AS	443	+	+
Fragment 72	Nat 8072 S	Nat 8440 AS	368	+	Ø
Fragment 73	Nat 9295 S	Nat 9700 AS	405	+	+
Fragment 74	Nat 8812 S	Nat 9060 AS	248	+	Ø

se nadaljuje

nadaljevanje

**Preglednica 8: Rezultati pomnoževanja genoma PVY<sup>NTN</sup>-NIB z različnimi kombinacijami oligonukleotidnih začetnikov z metodo RT-PCR.**

Stolpec 1. ime fragmenta RT-PCR; Stolpec 2. Začetni oligonukleotidni začetnik (S); Stolpec 3. Končni oligonukleotidni začetnik (AS); Stolpec 4. Dolžina fragmentov RT-PCR v bp. Stolpec 5. Uspešnost RT-PCR reakcije (+ pozitiven rezultat; - negativen rezultat), Stolpec 6. Kloniranje fragmentov RT-PCR v pGEM-T (+ kloniran fragment RT-PCR v plazmid).

Številčna oznaka v imenu začetnega in končnega oligonukleotidnega začetnika pomeni položaj oligonukleotidnega začetnika v genomu izolata PVY<sup>NTN</sup>-H (Thole s sod., 1993).

Table 8: RT-PCR amplification of genome sequence of virus PVY<sup>NTN</sup>-NIB using different combinations of primers for RT-PCR.

Column 1. Name of RT-PCR product; Column 2. Forward primer (S); Column 3. Reverse primer (AS); Column 4. size of RT-PCR product. Column 5. successful multiplication by RT-PCR (+ positive result; - negative result), Column 6. cloning of RT-PCR fragments into the pGEM-T system (+ inserted RT-PCR in plazmid).

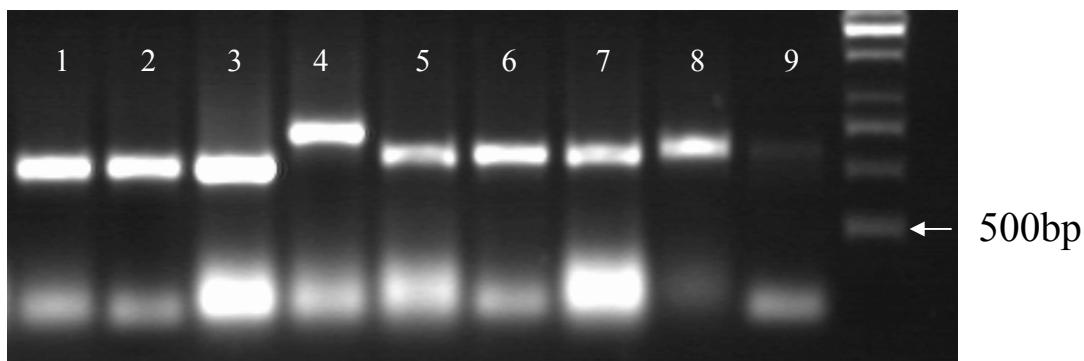
The number in the name of primers indicates a position of primer in PVY<sup>NTN</sup>-H genome sequence (Thole s sod., 1993).

Produkt RT-PCR	Začetni oligonukleotidni začetnik	Končni oligonukleotidni začetnik	Dolžina fragmentov RT-PCR v bazah	Uspešnost RT-PCR reakcije	Kloniranje v pGEM-T vektor
Fragment 75	5460 S	Nat 6015 AS	555	+	Ø
Fragment 76	3 S (Hua 2)	890 AS	887	+	Ø
Fragment 79	Nat 2900 S	3480 AS3	580	+	+
Fragment 80	3280 S	4150 AS	870	+	+
Fragment 81	3730 S	4150 AS	420	-	Ø
Fragment 82	4050 S	4665 AS	615	+	Ø
Fragment 83	5320 S	Nat 6015	695	-	Ø
Fragment 84	7170 S	7830 AS	660	+	+
Fragment 85	7170 S	8050 AS	880	+	+
Fragment 86	7830 S	Nat 8440 AS	610	+	Ø
Fragment 87	8072 S	8940 AS	868	+	+
Fragment 88	9325 S	Nat 9700 AS	375	-	Ø
CP	CP8380 S	9700 AS	1320	+	Ø

#### 4.1.2 SEKVENIRANJE PRIDOBLEJENIH FRAGMENTOV RT-PCR

Uspešnost vključitve produkta RT-PCR v plazmidni vektor smo preverjali na agaroznem gelu po PCR reakciji z univerzalnimi oligonukleotidnimi začetniki (slika 10). Kolonije, ki

so bile uspešno transformirane smo naknadno namnožili v tekočem gojišču in po inkubaciji očistili plazmide. Čistost in obliko plazmida smo preverjali na agaroznem gelu (slika 11).

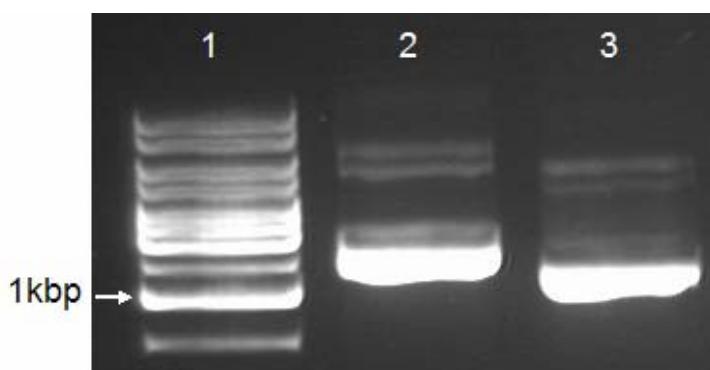


**Slika 10: Analiza rekombinacijskih plazmidov.**

1-3. uspešno pomnožen fragment 11 (2730 S in 3410 AS); 4. uspešno pomnožen fragment 24 (7170 S in 8050 AS); 5-8. uspešno pomnožen fragment 84 (7170 S in 7830 AS); 9. neuspešno pomnožen fragment 84 (7170 S in 7830 AS); 10. označevalec velikosti.

Figure 10: Analysis of recombination plasmids.

1-3. amplification of inserted RT-PCR product 11 (2730 S and 3410 AS); 4. amplification of inserted RT-PCR product 24 (7170 S and 8050 AS); 5-8. amplification of inserted RT-PCR product 84 (7170 S and 7830 AS); 9. Unsuccessful amplification of inserted RT-PCR product 84 (7170 S and 7830 AS); 10. MW marker.



**Slika 11: Elektroforeza plazmidov pGEM-T z vstavljenim fragmentom RT-PCR.**

1. označevalec velikosti; 2. plazmid pGEM-T z vstavljenim fragmentom RT-PCR 70 (5980S in Nat6375AS); 3. plazmid pGEM-T z vstavljenim fragmentom RT-PCR 71 (Nat6483S in Nat6926AS).

Figure 11: pGEM-T plasmids with inserted RT-PCR product.

1. MW marker; 2. pGEM-T with inserted RT-PCR product 70 (5980S and Nat6375AS); 3. pGEM-T with inserted RT-PCR product 71 (Nat6483S and Nat6926AS).

Nukleotidno zaporedje genoma virusa PVY<sup>NTN</sup>-NIB smo določili z direktno ali posredno sekvenčno reakcijo.

#### **4.1.3 ANALIZA PRIDOBLEJENIH SEKVENC**

Dobljena nukleotidna zaporedja fragmentov RT-PCR in plazmidov z vključenimi produkti RT-PCR smo sestavili, glede na prekrivajoča se zaporedja, v skupno nukleotidno zaporedje celotnega genoma virusa PVY<sup>NTN</sup>-NIB.

Določili smo nukleotidno zaporedje celotnega genoma virusa PVY<sup>NTN</sup>-NIB; (nukleinska oznaka (NK) v GenBank bazi je AJ585342, aminokislinska oznaka (AK) v GenBank bazi pa CAE51230. Nukleotidno zaporedje, ki smo ga določili je dolgo 9647 baz (slika 12). Zaporedje je, v primerjavi z objavljenim nukleotidnim zaporedjem izolata PVY<sup>NTN</sup>-H (Thole in sod., 1993), za 37 nukleotidov krajše na 5' terminalnem koncu in za 18 nukleotidov na 3' terminalnem koncu.

## Nukleotidno zaporedje virusa PVY<sup>NTN</sup>-NIB (AJ585342)

<5' UTR

GCAAAACACTCACAAAGCTTCAACTCTAATTCAAACAATTGTTAGTTCAATTTCGATCTCATCAAACAAACTCTTCAATTCA  
GTGTAAGCTATCGTAATTCAAGTTCAACTCTCGTAAATTGAGAAGATCATCC

<P1

ATGGCAACTTACACATCAACAATCCAGTTGGTCCATTGAATGCAAACCTTCCATACTCACCGCTCCTTTGGCTAGTTCGGGGAAAC  
GAGAAGTTCAACCACCACTGACCCCTTCGCAAGTTGGAGATGCAGCTTAGTGCGCGATTACGAAGGCAAGAGTTGCAACTATTGCAAC  
ATCCAAGAATGGTACTTGCATGTACAGAACGCCATGTCAGATTGCGCCATTCAAAAAGAACGCCAGGGAGAGAAAAGAGGGAA  
TATAATTCCAATGGCTGCTCAAGTGTGTGCAAGATCACTATTGCTGGTGGAGAGGCCACCTTCAAAACTTGAATCACAGTGGCA  
GGGGTGTCTCACACCAACTCCAAGGATGCGCACAGCAAAACATACACGCCAAAGTTGACAGGGACAATGAACCCATTCTAA  
GCAGGTGAAGCAAATTATGTCACCAAAAGGAGGGTCTGTTCAACTGATTGCAAGAAAAGTACCCATGTCACTATAAAAGAGTTTGGGA  
TCACATCGCGCAGTTGTTGACTGCACATATGAGAGGTTTACGAAAGAGAGTGGAATTTCGCGTGTATAATGGACCGTGTGCGCTAC  
AGCATCTGCCAGGACGGACAAGTGGACTAACCAAGTTCGCTACTGATCTACGCAGGGCGATAGTGGAGTTATTGAGTAATGCTAA  
TCTCAAGGAAACTTGGAGAAGCTGGAGGGCTATTCAAGTGCCTGGGTCGACGAAGGAAAATCTATGATGCACGTTCAAGGTT  
ACTCAA

<Hc-Pro

GGGGTTATGGATTCAATGGTTCAGTCTCAAGCGTGAAGCTTTGGAAGGGATTGGACGCCATTGGCACAATGAGATATCCTACAG  
ATCATACATGTGTCGCAGCTTACAGTGAAGACTGTGCGAGAGTTCAGCGATAATGACACACAGTATTCTACGGCTATAAGATAAC  
CTGGCCCTACCTGTGCCAACATAATGCTAACTTGTGCCAGCGACTTACCTAAGAGATTACACAGCAGCAGTGTGTTTAAATCGA  
TTGGGCCAGAACAAAGATCGCTTGTGATGCTTAAAGAGATTCTGACAACTTGTAGAGCAGTGTGTTTAAATCGA  
TTTCAATGAAGTATTCAAGTCTATAGGGAGAAGCAACAACTCACCTTCAAAAACGTAATATTCTGAATAATTCTTTGAAAGAAA  
GGAAAATACAGCTGTGAATGGCAGGGCTCAATTAGCTTACTTGAATTGGCAAGATTCAAAGAACAGAACGGATAATATCAGGAAA  
GGAGACATCTGCTTCTTAAAGAAATAACATCTGCCAACAGCAATTGGAACTTGTATCTGTCATGTGATAACCGACTGGATAAGATC  
ACTTCCCTGGGGCACAGAGAAATATCATGCTAACGCTTGTGAGGAAATTGATCCAGCGAAGGGTATTACGACA  
CGAAAATCGTTGATCGGAATGGGACAAGAAAATCTGCAATTGGCAATTGTACCAACTTGTGATTGGCTGAGTTAGCGCGAAGATG

AAAGGTGATTATAAAAAGACAGCCAGGGTGAGTAAGAAGTGCAGCAGCTCGAAGGATGGAAACTACGTGTATCCCTGTTGTCAGTACAC TTGATGATGGCTCAGCTGTTGAATCAACATTACCCGAACTAAGAACGACCTCGTAATAGGTAATAGTGGCATCAAAGTATGTTGA CTTACCAAAAGGGATTCTGAGATGTTATATATGCCAGGCAAGGTTCTGTTACATTAACATTCTCGCATGTTGATTAACATTAGT GAGGAAGATGCAAAGGATTCACTAAAGGTTCTGACATGTTGTCAGACTGCTAGAATACTAGTCGATCACGAAACGCAGACATGCCATGT CTTGCTCAAATGAAATATTCTACCCGATGTTCATGTCAGACTGCTAGAATACTAGTCGATCACGAAACGCAGACATGCCATGT GGTTGACTCGTTGCTCACAAACAACGGGATCATATTGAAAGCATCTAGCGTGTCCAACCTATTGTTGCTAAATGATGAGTTG GAGTCTGACATTAAGCACTATAGAGTTGGT

&lt;P3

GGTATTCCATGCGCTGAACTGGGTCTACAATATCACCTTCAGAGAAGGGAGTTATAATGTCAGTCGGCAGCGCTGAAAC TGCTTGAAAGGAATTTCAGACCTAAAGTGATGAGACAGTCGTTAGATGAGCCTTACCTGTTGATCTATCAATATTATCCCTGG CATACTGATGGCTATGTACAATAATGGGATTTCAGTCAACTGCGGTAAGGTTGATTAATGAGAAACAATCCATAGCTATGATAGCATCG CTACTATCAGCTTAGGCCCTACGAGTGTAGCGGAGAACACACTCGTCGACAGAGGATTATAATTGATACTGCAGCTACAGATCTCCTG ATGCTACGTGCGATGGGTTCAACCTACATTGAACTGACCCACTGCGTTGATGTTGCAAGGTTGATGAAATGAAATGATGATGTA TACCTATTCAAGGGGGTTTCAGTTACACACAGGCGCTGAGCATGATGAAACAGGAAATTCTAGATCTTGAACCGATGCTGG AAAGACTTAATTGGGGGGAAATTCTCGCAACATGGTACTCATACAGAGAAACAGCTATCCTGGTACATAAAACCCACAGGAA GGGCAGATTGAAAGGGTTATAACACATATCACCAACAGATTCTGGGCCAGGCGCCAGGTGGTCAAGGGCACTGCTCAGGATTGAG CGAGCAGTTAATAATTATTCAACTAAGTGTGAAATATTTCATCCTTTTCTCGTACAATCTTGGCAGTGTGTCAGGAAATAATTGAGTCAAGGAGTATAGGA GAGAAATCGAGTTGATGAGATAGAGAAGATGAGATCGTCATGAGGCTATATGCAAGTTACACGCAAACCTGAAACCGATTTCAC ATGGATGAGTACATTGAGTATTGAACTGAGTCAAGTAAACCCCTAGATAGTTCAGTTGCTCAAGCGCAGATGGAAGAATATGATGCGACAC CAG

&lt;6k1

CGTCCACACCAGGTGTTAAAATTGAAACAAGTGGTAGCATTTATGGCTTACTCATGGTGTGCTGAAAGGAGTGATTGCG TGTTCAAAACTCTCAATAAATTAAAGGTGTCCTTCCTACTGGACCATGAAAGTACAGATCAG

&lt;CI

TCCTAGACGATGATCAAGAATTGATGATAGGAATGAGACTATTGATTGAAATTGAGTGGAGGACACAATTGAAACATCATCAGTC TAGATACAAAGTTAGTGAATTGGGACCGACAAATCCAGATGGGACATACACTTCCACATTACAGAACCGAGGGCACTTCATGGAAAG CACAAGAGCAACTGCTGTCAGGGTAATGATATCGCCACAGCGAACACCTAGACTTCTAGTAAGGGGAGTGTGGGCTGGAAAG TCAACTGGGTTGCCTGTTCATCTAGTGTAGCCGATCTGCTTAAATTGAAACCAACGCGACCGCTAGCGGAGAACGTTTCAAACAGC TATTCAGTGAACCAATTCTCAAGGAAACACAATGCGTAGCTGGTAAGGAAATTGATATTGGCTCTTCACATCCGCTAGTACTAGCGG ATTGCGCTACACTTCGCAATATCGCTCAATTAGCTCAGTTGATGTTGATATTGAGTGGCATGTTCTGGATCCTTC GCAATGGCGTCCCGAGTTGCTGAGTTGTTATCATCAAGCATGAAAGTATTAAAGTGTAGCTACTCAGTGGAAAGAGGTTGAAT TTACAACACAGAACCAAGCTCAAGTTAATAGTGGAGGACACACTGTTCAATCATTTGATGACAAGGTTCTAAACAAATGCTGA TGTTGTCAGTTGTTCAATGTAATTGTCAGTGTGAGCTACAATGAAGTTGACACCTGGCTAACAGCTCTAACAGACAAGAATATG ATTTGACACAAAGCTGATGCGAACAAATGAAGCACCGGTTGCTAGAAATTGTCACAAAAGGAAACAGTGCAGGACACATTGTTGAG CAACAAACATAATTGAGAATGGAGTGACTTGGACATGAGCTGGTTGAGATTGGGTTGAGGAAAGTCTCAGGTTCTGGACATTGACAA TAGGAGCATTGCTTACAATAAGGTGAGTTGAGCTATGGTGAAGAAATTCAAGGCTGGGTGTTGAGCCTTCAAGAAAGGAGTAGCA TTGCGCATTGGACACACTGAGAAGGGATTATTGAAATTCAACAGCATGATCGCTACAGAGCGGCTTGTGTTGCTTGCATATAACTTGC CAGTGTGACAGGGCGTCTCAACTAGTCTGATTGCAATTGACTGTGCGCAAGTTAAACAAATGCGACAATTGAAATTGAGTCCCTT CTTTATCCAGAAATTGCTGTCCTCCAGATGGCATCTGTCATACATGACATTCTTAAAGTATAAACTTCGAGATTGATGACA CCTTTGCGATGCTTACATCCACATAGGGCATCGAGCACTGGTTATGTTGAGATTGAGCGAGCTGGGCTTAGAAATT CAAAGAAGTCAAATGCAATTCCACATCAAGAGATCTCCAAAGGAAATGCTTGGGAAACGGTTGTCAGTACAAGAACAGT TTGCTTATTTCACAGCATTGAGCATGTCATCAGCAAATCGCATACACATGCGTACAGACCTTCTGCCATCCAAACACTCTAA ATA TTGGTGGAGAGACTGCTGAGAGGGAGCAGTGAGGAGCAGCAATTGAGCTCATGACGAAGGATGCTCAAGCATGTTCAATTG TCAACTTGACAAATACTCTCAGAGCTAGATATGCAAAAGATTACACCCGAGAGAATATAACAAACTTGAGAAAGTGAAGTCAATTGAA AGAATTCTCAATTGGATGGTCTGATGAGGAAATTAAAGAGGTATGAGTTGCTTGCAGTTGCTTACACCAA

&lt;6k2

GCTGCGACGTCATTGCAAAGGACTCAAGTGAAGGGGACTTGGAGAAGTCAATTAGTGGCAAAGACTTAATCATAGCAGCGCTGTTG CAATTGGTGGAAATAGGACTCATATATAGTGGTTCACACAATCAGTTGAGACTGTCACCCAA

&lt;NIa

GGGAAAAATAATCAGGAAATTCAAGGCTTGAAGTTCCCATGCTCGACAAAAGGGCTGGTTGAAATTGACAAACAAATGATGACA CAATAGAGGAATTCTGGATCTGCATACAGGAGAAGGGAAAGGTTAAGGGCACCCTGTTGATGGGCAAGTCAGCAGGGTTGT TAATATGATGGATTGACCCAAAGATAATTCTCATCCATTCTGCTGATGGCTACTGGAGCTAAATTGAAAGAGAACGCTATGCT GATAATTAGAGACATCCAAGAGCGCTTGTAGTGTGCGAAGAAAATGGTAGAGGATGATGAAATGAAATTGCAAGCATTGGCAGAACAA CAACCATCATGCTTACCTCAGGAAAGATTGGCTGACAAGGGCTCTAAAATTGATTGATGTCAGGCCACACAACCCACTCAAATCTGATAA ATCGAATGGCATTGCTAAGTTCTGAAAGAGAACTTGAGGAGCAGGAAACTGGGCCAGCAATAGAGGTTGATGAGAACGACATTCCAAA CAGGAAGTGGAGCATGAAGCCAAATCACTCATGAGAGGTTAAGGGATTCAATCCAATTGCTCAAACAGTTGCGAGAGTAAAGTGTCTG TTGAATATGGAACGCTGAAATGTTGGGTTGGCTGCTATATTAGTAAACCCACATATTCAAGAGTTCAATGGGATCCAT GGAAGTGGCATATGCAAGGAACTCAGAGTGAAGAAATTGCTGAGCTTGGAGCTTACCGATCAAAGGAGAGACATTATCATATA AAGATGCCAAAGGATTCCCTGTTTCCCACAAAAACTGCACCTCCGAGCTCAGTGCAGAATGAGAGGATTGTTGGTGGAACTAATT TTCAGAAAAACATGCTCATCAATCATCACAGAAACGAGTACTACATACAATGATCAGGGCAGCATTGGAAAGCATTGATTGAAAC AAATGATGGGATTGTTGAGTACAGCTAGTGAAGTACAGCTGATGGATGTCAGTTGGAATACACGCTTGGCAATAATGTCACAAACCG AATTATTATTCAGCCTTCGATGAGGATTGAAAGTAAGTATCTCGAACTATGAGCATGATGAGTGGGACCAATCTGGGATATAACC CAGATACTGTTGTTGGGTCATTGAAAGCTCAAGGAGAGTGCCCTAAAGGCTGTTAAAGACAACAAACTTGACAGGATTAAATTG

TCATGATGTTGGTAGAGCAA

<N1b

GCTAACACATTCTCGTGGATGAGGCTCTAACAGGAATTGCAAGCTGGCGTCAATGAAGAGTCAGCTGGTACAAGCACGTGG TCAAAGGGAGTCGCGACTTAAAGAGTCTTAACGTGCGATTCTCAGGCCCTTGATGGATGCTTATGGAA GAGCTGTTAATAGAGCATATAAAGGACATAATGAAATACTCAAAGCTATTGATGTTGAAAGACTAGTGTGATGCATTGAA GAGGCTATCAATAGGGTTATCATTATCTGAAAGTGCATGCCCTCCAGAAATGCAATTACATCACCAGTGGAGCAAGAAATTTCAAAGCTC TCAATATGAAAGCTGCTGGAGCTATGAGGAGCTAGTGTGAGGAGAGAAAGACTACTTCGAGCATTACTGAGGCGATAAAGAGGAATTGT TATGAAAGCTGCTGGAGCTATGAGGAGCTAGTGTGAGGAGAGAAAGACTACTGGGTTAATGAGGAGATACTT GCAAAATAAGACAAGGACATTCACTGCTGACCTTATGAAATGCAATTGAGATCATTGAAAGAGAAACTTCCGTCAGAAAGAGATACTT CGAAGAACATTGAATGCTGGACTGGAAAGACTAAAGTTATGGAGGTTGGGACAATTACTTCGGCTTACCTGAAAATTGGGT GTACTCGATGCCGATGGTCACAATTGATAGTCACTCACCACCTAAATGCTGTTCTCATCATCAGAACATACATGGAA GATTGGGACTTGGGTTGCAAATGTTGCGCAATTGACAGAAATAATTACGCAACTCTCAGATGGAACAATTGTCAGA AGTTTAGAGGTAATAGCGCTCACCTTCTACCGTTGCGATATTCTCTCATGCTGCTTGTGATGACTTATGATTGCTGAAATCCGAGAAAGAGGC ATTCTCGATAGAATGTCACAACATTCTCAGATCTGGTTGAACTATGATTTCGTCAGAACAAGAGGAGGAAATTGTTCA TGTCATAGAGGCTGCTAATCGAGGTATGTACGTGCAAAGCTGAGAAGAGAGAATTGATCCATTGCACTGGGATAGAGCTGA TCTGCGAGCACAGATTAGAGGATTGTGAGCAATGATAATCCTGGGTTATTGAGTTAACGCAACAAATCAGGAGATTCTAC TCATGTTGTTGCAACAGAACCTTTCAACGATAGCACAGGAAGGAAAGCTCATACTAGCGAGCATGGCATTGAAAGACTGTACA TGGATAGGACAGTAGATGAGGAGGAACTAAGGCTTCACTGAAATGATGTTGCGCTTGGATGATGAACTTGAGTCAGTGCATACTTGAAGT GCACCATCAA

<CP

GGAAATGACACAATCGATCCAGGAGGAAGCACTAAGAACGATGCAAACAAAGCAAGGTAGCATTCAACCAAATCTCAACAAAGGAAAGG AAAAGGACGTGAATGTTGAAACATCTGAACTCATACTGTGCAACGAAATTAAAGCTTACGTCACGAAATTGAGAATGCCAAGAGTAAGG TGCAACTGTAATAATTGGAAACACTTACTCGATCGCTCCACAGAAATTGACATCTCAAATACTCGAGCAACTCAATCACAGTTGAT ACCTGCTATGGACGGTACAACCTGATCACGACATAGGAGAAACTGAAATGCCAAGTGTGATGAATGGCTTATGTTGTCATTGAAA ATGGAACCTGCCAACATCAACGGAGTTGGGTTATGATGGATGGAGATGAAACAGTCGAATACCCACTGAAACCAATCGTGGAGATGC AAAACCAACACTAGGCAAATCATGCCACATTCTCAGATGTTGCAAGCGTATATAGAAATGCGAACAAAAGGAACCATATATGCCA CGATATGGTTAGTCGAATCTGCGCGATGGAAGTTGGCTCGTATGTTTACTGAGGTACATTGAGGTACATCACGAACACCGAGGG CTAGGGAAGCGCACATTCAAATGAAGGCCGAGCATTGAAATCAGCCAACCTCGACTTTGGGTTGGACGGTGGCATCAGTACACAAGA GGAGAACACAGAGAGGACACCACCGAGGATGTCCTCCAAGTATGCATACTTACTGGAGTCAGAACATG

<3' UTR

TGATGAGTGTCTCCGAGATATATAAGTATTACATATGAGTATTGCTTCTGTACTACTTTATCATAATTAAATAAATCAGTTGATGAAATTACTAAATGAGGTTGGCAGGGTATTGCTATTGTTGACTCTATCTTTAATTCCCATTATTAAGTCTTAG ATAAAAGTGCCTGGTTGCTGGATGATTGATGATTGATGAGGTATGTTGCGATTGCTGAGTGTGACTATGCTGGATCTAC TGCTTGGGTGGCTTGTGATTGCTCATACAGTGA

### Slika 12: Nukleotidno zaporedje virusa PVY<sup>NTN</sup>-NIB (AJ585342).

Rekombinacijska mesta; značilno nukleotidno zaporedje PVY<sup>NTN</sup> (Thole in sod., 1993); značilen nukleotid za PVY<sup>NTN</sup> (Moravec in sod., 2003)

Figure 12: The nucleotide sequence of PVY<sup>NTN</sup>-NIB (AJ585342).

Recombination points; nucleotide sequence specific for PVY<sup>NTN</sup> (Thole et al., 1993); specific nucleotide for PVY<sup>NTN</sup> (Moravec et al., 2003)

Genom virusa PVY<sup>NTN</sup>-NIB ima en sam odprt bralni okvir. Genom kodira 3061 aminokislin dolg poliprotein (slika 13).

### Aminokislinsko zaporedje predvidenega poliproteina virusa PVY<sup>NTN</sup>-NIB (CAE51230)

>P1

MATYTSTIQFGSIECKLPYSPAPFGLVAGKREVSTTDPFASLEMQLSARLRRQEFATIRTSKNGTMYRYKTDVQIARIQKKREERERE EYNFQMAASSVVSKITIAGGEPPSKLESQVRGGVIHTTPRMRATAKYHTPKLTERGMNHLIKQVKQIMSTKGSVQLISKKSTHVHYKRVLG SHRAVVCTAHMRGLRKRVDFRCDKWTVVRLQHLARTDKWTNQVRATDLRGDSGVILSNANLKGNFGRSSEGLFIVRGSHEGKIYDARSKV TQ

>Hc-Pro

**GVMDSMVQFSSAESFWKG LDGNWAQMRYPTDHTCVAGLPVEDCGRVAAIMTHSILPCYKITCPTCAQQYANLPASDLLKILHKHASDGLNR**  
LGADKDRFVHKFKLTILEHLTEPVDSLSEIFNEVFKSIGEKQQSPFKNLNILNNFFLKGKENTAREWQVAQLSLELARFQKNRTDNIRK  
GDISFRNKLSAKANWNLYLSCDNQLDKNANFLWGQREYHAKRFFSNYFEEDPAKGYSAYENRLHPNGTRKLAIGNLIVPLDLAEFRKRM  
KGDYKRQPGVSKKCTSSKDGNVYVPPCCCTLDDGSAVESTFYPPTRKHLVIGNSGDQKYVDPKGNSEMLYIARQGFCYINIFLAMLINIS  
EEDAKDFTKKVRDMCVPKLGWTPTMMDLATTCAQM**K**IFYPDVDAELPRILVDHE**T**QTCHVVDSFGSQTTGYHILKASSVSQSQLFANDEL  
ESDIKHYRVG

>P3

**GIPNACPELGSTISPFR**EGGVIMSESALKLLKGIFRPKVPMQRQLLDEPYLLLILSPGILMAMYNNIGFELA VRLWINEKQS IAMIAS  
LLSALALRVSAETLVQAQRIIIDTAATDLDATCDGFNLHLYPTALMVLQVVKNRNECDTTLFKAGFPYSNTSVQIMEKNYL DLLNDAW  
KDLTWRKLSATWYSYRAKRSITRYIKPTGRADLKLYNISPQAFLGRGAQVVKGTASGLSERFNNYFNTKCVNISSFFIRRI FRRLPFV  
TFVNSLLVISMLTSVVAVCQAIILDQKRYREIELMQIEKNEIVCMELYASLQRKLERDFTWDEYIEYLKSVNPQIVQFAQAMEEYDVRH  
Q

>6k1

RSTPGVKNLEQVVA FMALVIMV FDAERSDCVFKTLNKFKGV LSSLDHEVRHQ

>CI

SLDDVIKNFDDRNETIDFELSED TIRTSSVLDKFSDWWDRQIQMGHTLPHYRTEGHFMFETRATAVQVANDIAHSEHLDLFLVR**GAVGSGK**  
**S**TGLPVHLSVAGSVLLIEPTRPLAENVFKQLSEPFFKKPTL RMRGNSIFGSSPISVMTSGFALHYFANNRSQLAQFNFVIFDECHVLDPS  
AMAFRSLLSVYHQACKVLKV SATPVGREVEFTTQPVKLIVEDTLSFQSFDQGSKTNADVVQFGNSNVLYVSSSYNEVDTLAKLLDKNM  
MVTVKDGRTMKHGCLEI VTKGTSARPHVVATNI IENGVTLDIDVVDFGLKVS PFLDIDNRSIAYNKVS VSYGERIQRLLGRVGRFKKGVA  
LRIGHTEKGIIIEIPS MIAEAALCAFAYNLPVMTGGVSTS LIGNCNTRQVKTMQQFELSPFFIQNFVAHDGSMHPVIHDILKKYKL RD CMT  
PLCDQSIPYRASSTWLSVSEYERLGVALEIPKQVKIAFHKEIPPKLHEMLWETVVVKYKDVLFSIRASSIS KIA YTLR DLF AIPR TL  
LVERLLEEERVKQS QFRSLIDE GCSSMFSIVNLT NTL RARYAKD YTAENI QKLEK VRSQ LKEFSNLDGSACEENLIK RYESLQFVHHQ

>6k2

AATSLAKDLKLKG TWKKSLVAKDLIIAGAVAIGGIGLIYSWFTQS VETVSHQ

>NIa

GK NKS KRIQALKFR HARDK RAGF EIDNNDDTIEEFFG SAYRKKGK GKT TVGMGKSSRRFVN MYGFDPT EYSF IQF VDPLTGAQIEENVYA  
DIRD I QER FSDV RKM VED DEI E IEL QALG SNTT I HAYFRK DWSD KALK IDLM PHNPL KICDKS NGIA KFPER ELE LRQ TGP AIEVDV KDI PK  
QE VEHEAK SLMR GLR DFNP IA QT C R V KV VS EY GT SE M YGF GFG AY I VN HHL FKS FNGS MEV RSM HGTF RVK NLH LS VLP I KGR D II  
KMP KDFPV FPQK LH FRAP VQ NER I CL VGT NFQ EKH ASS I I TET STT NV PG ST FWK HWE IT ND GH G L P V V STAD G CL VGI HSL ANN V QTT  
NYY SA F D E F E SKY L R T NE H D E W T K SW V Y N P D T V L W G P L K L K E S A P K G L F K T K L V Q D L I D H D V V V E Q

>NIb

AKHS AWMYEALTGNLQAVASMKS QLVT KHVVKGE CRHFKEFLTV DSEAEAFFRPLMDAYGK SLLN REAYIKD IMKYSKP IDVGT VDC DAFE  
EAIN RVIIY LQVHGFQKCN YID E Q E I F K ALN MK AAVG AMYGGKKD YF E HFT EAD KEE I VM Q SCL RLY KGS LGI WNGS LKA ELC KEK I L  
ANK T RFT APLDT L LGGKVCV DDFN NQF YSKNIE CCWT VGM T KF YGGWD KLL RRL PEN W VY C DAD GS QFD SLL TPY LIN A VL I IR STYME  
DW D L G L Q M L R N LY TE II Y TPI ST P DGT I V K K F R G N N S G Q P S T V V D N S L M V V I A M H A L I K E C V E F E E I D S T C V F F V N **GDD** L LIA VN PEKES  
I L D R M S Q H F S D L G L N Y D F S S R T R K E E L W F M S H R G L L I E G M V P K L E E R I V S I L Q W D R A D L P E H R L E A I C A M I E S W G Y F E L T H Q I R R F Y  
SW LL QQ PF STIA QEG K A P Y I A S M A L K K L Y M D R T V D E E L K A F T E M M V A L D E L C D T Y E V H Q

>CP

**GNDTIDAG** GSTKKDAKQEQGS I QPNL NKEKEKD VNV GVTSG TH T V P R K I A T S K M R M P K S K G AT V L N LEH LLEY A P Q Q I D I S N T R A T Q S Q F D  
TWYGA V QL AY D I G E T E M P T V M N G L M V W C I E N G T S P N I N G V W V M M D G D E Q V E Y P L K P I V E N A K P T L R Q I M A H F S D V A E A Y I E M R N K K E P Y M P  
R Y G L V R N L R D G S L A R Y A F D Y E V T S R T P V R A R E A H I Q M K A A L K S A Q P R L F G L D G G I S T Q E E N T E R H T T E D V S P S M H T L L G V K N M

### Slika 13: Aminokislinsko zaporedje predvidenega poliproteina virusa PVY<sup>NTN</sup>-NIB (CAE51230).

Rekombinacijska mesta; značilno aminokislinsko zaporedje PVY<sup>NTN</sup> (Thole in sod., 1993); značilne aminokisline (Tribodet in sod., 2005)

Figure 13: The aminoacid sequence of predicted polyprotein of PVY<sup>NTN</sup>-NIB (CAE51230).

Recombination points; amino acid sequence specific for PVY<sup>NTN</sup> (Thole et al., 1993); specific amino acids (Tribodet et al., 2005)

S pomočjo programa BioEdit smo opravili primerjavo dobljenga nukleotidnega zaporedja z različnimi celotnimi in posameznimi deli objavljenih nukleotidnih zaporedij genomov. Za primerjavo smo uporabili nukleotidna zaporedja (preglednica 9) dobljena na internetni

strani NCBI.

**Preglednica 9: Objavljena nukleotidna in aminokislinska zaporedja celotnega genoma različnih virusov PVY.**

NK – številka nukleinskega zaporedja v bazi GenBank, AK številka aminokislinskega zaporedja v bazi GenBank

Table 9: Published nucleotide and amino acid genome sequence of different PVY.

NK- accession number of nucleic acid sequence in GenBank, AK – accession number of amino acid sequence in GenBank

NK oznaka	virus	AK oznaka	vir
M95491	PVY <sup>NTN</sup> -H	AAB59762	Thole in sod., 1993
U09509	PVY <sup>O</sup> -139	AAB50573	Singh M in Singh RP, 1996
X97895	PVY-N605	CAA66472	Jakab in sod., 1997
AY166866	NA-PVY <sup>NTN</sup> Tu 660	AAN87843	Nie in Singh RP, 2003b
AY166867	NA-PVY <sup>N</sup> N-Jg	AAN87844	Nie in Singh RP, 2003b

Nukleotidno zaporedje našega izolata smo primerjali z ostalimi objavljenimi zaporedji, tako na nukleotidni kot na aminokislinski ravni (preglednica 10).

Rezultat primerjav je podan kot odstotek (%) enakosti PVY<sup>NTN</sup>-NIB z ostalimi objavljenimi zaporedji (preglednica 10) glede na celoten genom, na celoten odprt bralni okvir in po posameznih genih.

**Preglednica 10: Primerjava nukleotidnega in aminokislinskega zaporedja virusa PVY<sup>NTN</sup>-NIB z ostalimi objavljenimi nukleotidnimi zaporedji virusov PVY.**

Preglednice enakosti glede na celoten genom in po posameznih delih genoma.

Table 10: Comparison of PVY<sup>NTN</sup>-NIB and other published nucleotide and amino acid sequence PVY sequences.

Table of identity for genome and for specific genes.

<b>% enakosti</b>					
<b>nukleotidno zaporedje / aminokislinsko zaporedje</b>					
<b>PVY<sup>NTN</sup> - NIB</b>	<b>PVY<sup>NTN</sup></b>	<b>PVY</b>	<b>PVY<sup>O</sup></b>	<b>NA</b>	<b>NA-PVY<sup>N</sup> N-Jg</b>
	-	-	-	<b>PVY<sup>NTN</sup> Tu 660</b>	
	<b>H</b>	<b>N605</b>	<b>139</b>		
<b>Celoten genom</b>	99.2	93.2	87.6	90.6	90.7
<b>Celoten ORF</b>	99.2/99.0	93.4/97.2	87.8/91.9	91.0/95.8	91.1/95.8
<b>Primerjava po posameznih regijah genoma</b>					
<b>5'-UTR</b>	100	100	56.8	83.8	82.5
<b>P1</b>	98.0/97.4	98.6/98.9	69.5/70.5	91.3/91.2	91.6/90.5
<b>Hc-Pro</b>	99.5/99.2	96.9/98.9	84.5/90.9	91.5/97.0	91.3/96.7
<b>P3</b>	99.0/99.4	84.6/92.6	97.0/98.6	84.7/92.3	84.3/92.3
<b>6k1</b>	100/100	82.0/84.6	97.4/98.0	82.6/86.5	82.6/86.5
<b>CI</b>	99.3/99.5	83.8/95.5	97.1/99.0	83.8/95.2	83.4/95.5
<b>6k2</b>	99.3/100	93.9/90.3	96.1/100	80.7/92.3	80.7/90.3
<b>N1a</b>	99.3/99.3	98.6/99.5	87.3/92.3	96.3/97.6	96.6/98.3
<b>N1b</b>	99.1/98.8	99.1/98.8	83.1/93.4	98.0/98.8	98.0/97.7
<b>CP</b>	99.1/98.5	97.2/98.5	90.6/92.5	96.3/98.1	96.2/97.7
<b>3'-UTR</b>	99.6	83.8	98.3	82.5	83.8

Prav tako smo naredili primerjavo enakosti nukleotidnih in aminokislinskih zaporedij odprtih bralnih okvirjev (ORF) vseh virusov med seboj (preglednica 11) in izrisali filogenetsko drevo (slika 13).

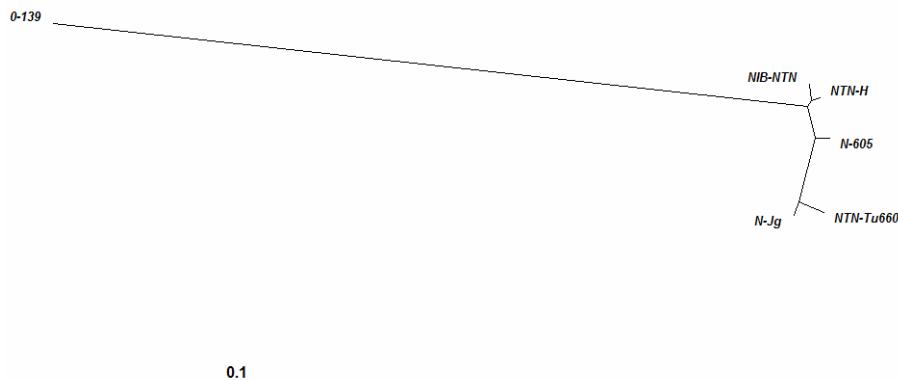
**Preglednica 11: Primerjava nukleotidnega in aminokislinskega zaporedja virusov PVY<sup>NTN</sup>-NIB, NA-PVY<sup>NTN</sup> Tu 660, NA-PVY<sup>N</sup> N-Jg, PVY<sup>NTN</sup>-H, PVY<sup>O</sup>-139 in PVY-N605.**

Table 11: Comparison of ORF nucleotide and amino acid sequence identity between PVY<sup>NTN</sup>-NIB, NA-PVY<sup>NTN</sup> Tu 660, NA-PVY<sup>N</sup> N-Jg, PVY<sup>NTN</sup>-H, PVY<sup>O</sup>-139 and PVY-N605.

% enakosti						
nukleotidno zaporedje / aminokislinsko zaporedje						
	PVY <sup>NTN</sup> - NIB	PVY <sup>NTN</sup> -H	PVY- N605	PVY <sup>O</sup> - 139	NA-PVY <sup>NTN</sup> Tu 660	NA-PVY <sup>N</sup> N-Jg
<b>PVY<sup>NTN</sup>-NIB</b>	ID	99.2/99.0	93.4/97.2	87.7/91.9	91.0/95.8	91.1/95.8
<b>PVY<sup>NTN</sup>-H</b>	99.2/99.0	ID	93.4/97.1	87.9/91.9	91.1/95.7	91.2/95.7
<b>PVY<sup>N</sup>-605</b>	93.4/97.2	93.4/97.1	ID	82.9/90.1	96.4/97.8	96.5/98.0
<b>PVY<sup>O</sup>-139</b>	87.8/91.9	87.9/91.9	82.9/90.1	ID	82.7/90.0	82.8/89.9
<b>NA-PVY<sup>NTN</sup></b>	91.0/95.8	91.1/95.7	96.4/97.8	82.7/90.0	ID	99.0/99.1
<b>Tu 660</b>						
<b>NA-PVY<sup>N</sup> N-Jg</b>	91.1/95.8	91.2/95.7	96.5/98.0	82.8/89.9	99.0/99.1	ID

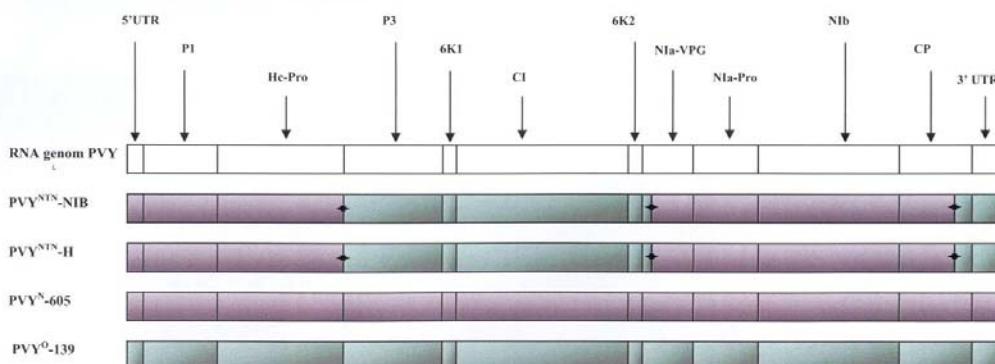
Zaradi visoke homologije celotnega genoma izolata PVY<sup>NTN</sup>-NIB in PVY<sup>NTN</sup>-H (99.2% / 99.0%) smo se odločili za nadaljnje študije rekombinacijskih mest v preiskovanem nukleotidnem zaporedju glede na že objavljena mesta v genomu izolata PVY<sup>NTN</sup>-H (Glais in sod., 2002).

Analiza nukleotidnih zaporedij (filogenetsko drevo – primerjava ORF (slika 14)) je razdelila nukleotidna zaporedja v različne skupine in sicer »O« tip (npr. PVY<sup>O</sup>-139), »N« tip (npr. PVY-N605) ter rekombinacijski tip, kamor spadata virusa PVY<sup>NTN</sup>-H in PVY<sup>NTN</sup>-NIB z izmenjujočimi se deli genomov skupine »O« in »N« (slika 15). Homologija med »O« in »N« je 82.9% / 90.1% (preglednica 11).



**Slika 14: Filogenetsko drevo ORF.**

Figure 14: Phylogenetic tree of ORF.



**Slika 15: Shematski prikaz genomov štirih različnih PVY izolatov (PVY<sup>NTN</sup>-NIB, PVY<sup>NTN</sup>-H, PVY-N605, PVY<sup>O</sup>-139).**

■ Tip »N«; ■ Tip »O«; ↗ rekombinacijska točka

Slika 15: Schematic genome map of different PVY isolates (PVY<sup>NTN</sup>-NIB, PVY<sup>NTN</sup>-H, PVY-N605, PVY<sup>O</sup>-139).

■ Type »N« ■ Type »O«; ↗ recombination point

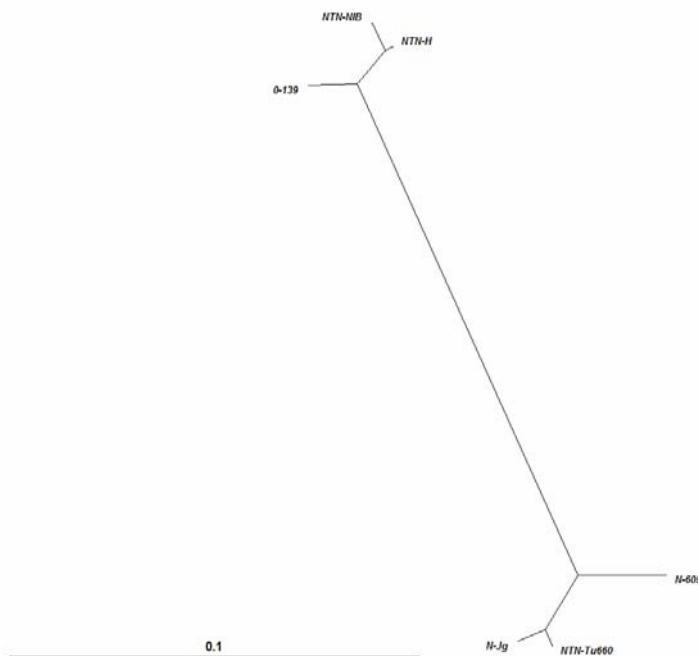
Objavljena rekombinacijska mesta so bila testirana še z nadaljnji filogenetskimi analizami. Prva rekombinacijska točka je mesto, kjer se genom iz »N« spremeni v »O« in leži tik za genom Hc-Pro, na 5' terminalnem delu gena P3 (med 6 in 15 nukleotidom). Naslednja rekombinacijska točka je mesto, kjer se genom iz »O« spremeni v »N« in sicer na 5' terminalnem delu gena NIa (za 110 nukleotidom gena NIa). Zadnja rekombinacijska točka je mesto, kjer se genom iz »N« spremeni v »O« tip in leži na 3' terminalnem delu gena CP (za 610 nukleotidom) (slika 12).

Glede na primerjavo nukleotidnih zaporedij smo izrisali filogenetska drevesa v območjih, kjer so rekombinacijske točke med obema genomoma (Hc-Pro, P3 in NIa) (slika 16, slika 17 in slika 18).



**Slika 16: Filogenetsko drevo gena, ki kodira protein Hc-Pro.**

Figure 16: Phylogenetic tree of gene Hc-Pro



**Slika 17: Filogenetsko drevo gena, ki kodira protein P3.**

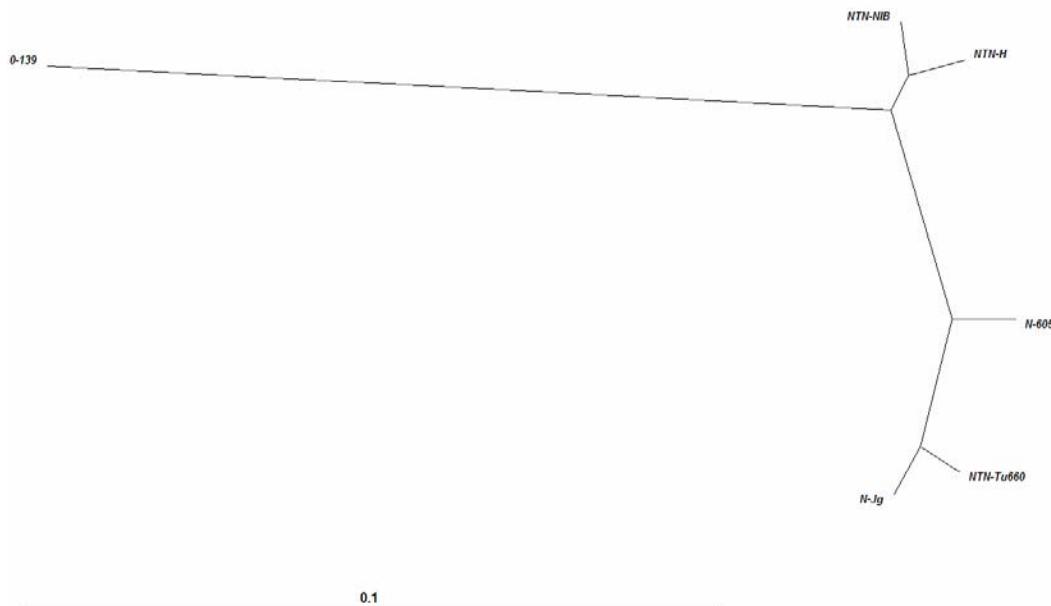
Figure 17: Phylogenetic tree of gene P3.



**Slika 18: Filogenetsko drevo gena, ki kodira protein N1a.**

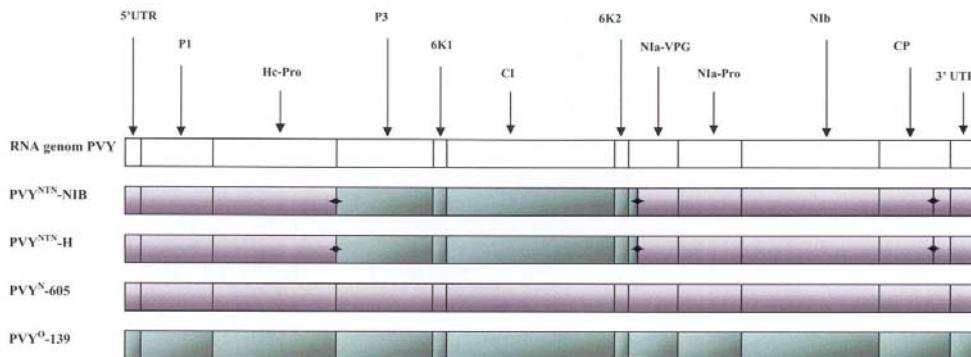
Figure 18: Phylogenetic tree of gene N1a.

Podobno porazdelitev izolatov smo dobili s primerjavo aminokislinskih zaporedij vseh objavljenih zaporedij (slika 19). Glede na primerjavo aminokislinskih zaporedij smo določili dve rekombinacijski mesti in sicer na N terminalnem delu proteina P3 ter na N terminalnem delu proteina NIa (slika 13), ne pa znotraj proteina CP (slika 20).



**Slika 19: Filogenetsko drevo poliproteina PVY.**

Figure 19: Phylogenetic tree of PVY polyprotein.



**Slika 20: Shematski prikaz poliproteina štirih različnih PVY izolatov (PVY<sup>NTN</sup>-NIB, PVY<sup>NTN</sup>-H, PVY-N605, PVY<sup>O</sup>-139).**

■ Tip »N«; ■ Tip »O«; ♦ rekombinacijska točka.

Figure 20: Schematic polyprotein map of four different PVY isolates (PVY<sup>NTN</sup>-NIB, PVY<sup>NTN</sup>-H, PVY-N605, PVY<sup>O</sup>-139).

■ Type »N«; ■ Type »O«; ♦ recombination point.

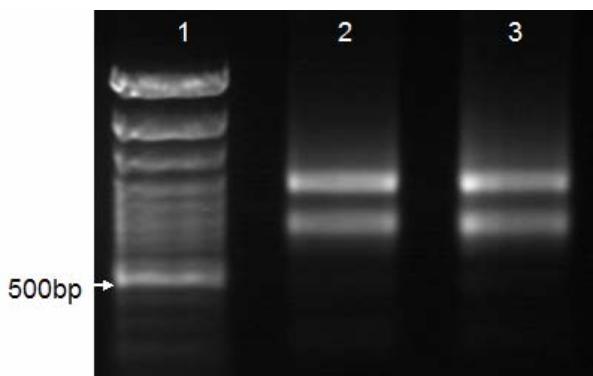
Primerjava nukleotidnih in aminokislinskih zaporedij NA-PVY<sup>NTN</sup> Tu 660 in NA-PVY<sup>N</sup> N-Jg je pokazala izredno visok odstotek medsebojne enakosti in prav tako enakosti s PVY-N605. Tako bi lahko v novo skupino spadala nukleotidna zaporedja NA-PVY<sup>NTN</sup> Tu 660 in NA-PVY<sup>N</sup> N-Jg, katerih nukleotidno in aminokislinsko zaporedje je izredno podobno zaporedjem skupine tipa »N«. Nižja homologija je le v območju od 5' terminalnega konca nukleotidnega zaporedja do konca gena Hc-Pro (preglednica 11, slika 14).

## 4.2 DOLOČEVANJE IZRAŽANJA TRANSGENA

Namen raziskovalnega dela je bila vzpostavitev hitre, občutljive in natančne metode primerne za detekcijo in analizo izražanja genov kot transgenov.

### 4.2.1 IZOLACIJA CELOKUPNE RNA

Za izolacijo celokupne RNA iz listov rastlin tobaka ali listov transgenih rastlin krompirja smo uporabljali komplet kemikalij RNeasy Plant Mini kit. 5% izolirane celokupne RNA smo nanesli na agarozni gel (slika 21).



**Slika 21: Izolacija celokupne RNA transgenih rastlin krompirja.**

1. označevalec velikosti; 2. celokupna RNA linije 34; 3. celokupna RNA linije 35.

Figure 21: Isolation of total RNA from transgenic potato lines.

1. MW marker; 2. total RNA transgenic line 34; 3. total RNA transgenic line 35.

Koncentracijo izolirane celokupne RNA smo določili s kompletom kemikalij RiboGreen® RNA Quantitation Kit. Po določitvi koncentracije celokupne RNA smo razgradili ostanke gDNA z encimom DNazo I. Uspešnost razgradnje gDNA smo preverili na agaroznem gelu.

Pri uspešno opravljeni DNazni I reakciji na agaroznem gelu ne vidimo več ostankov gDNA, a kljub temu ostane intaktna in nerazgrajena RNA z jasno vidnimi ribosomalnimi fragmenti.

Učinkovitost razgradnje gDNA smo še dodatno preverili s Q-PCR negativno metodo. V običajno pripravljeno Q-PCR reakcijo smo zamešali z DNazo I tretirano celokupno RNA (pred reakcijo reverzne transkripcije). Rezultat je bil v vseh primerih negativen, kar pomeni uspešno razgradnjo ostankov gDNA.

Iz tako pripravljene celokupne RNA (2 µg), smo sintetizirali cDNA. Vsakemu vzorcu smo dodali še *luc* mRNA, ki je predstavljala zunanjo kontrolo. Isto cDNA vzorcev smo uporabljali tudi v reakcijah semi-kvantitativne RT-PCR metode.

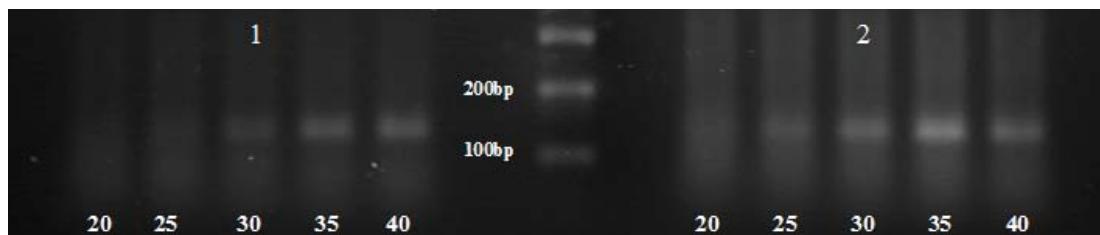
#### **4.2.2 ANALIZA IZRAŽANJA TRANSGENA**

##### **4.2.2.1 Semi-kvantitativni RT-PCR**

Vseh štirinajst transgenih linij krompirja je bilo testiranih s semi-kvantitativno RT-PCR metodo. Izražanje transgena CP je bilo dokazano v enajstih izmed štirinajstih testiranih linij.

PCR reakcijo smo izvajali tako, da je bil vsak vzorec (enaka količina) razdeljen v šest reakcij. PCR reakcijo smo v posameznih epicah ustavili po 20., 25., 30., 35., in 40. ciklu PCR protokola. Po končanem PCR protokolu smo produkte PCR nanesli na agarozni gel (poglavlje 3.2.3.2.1) (slika 22). Za vsak vzorec smo določili potrebno število ciklov (C<sub>t</sub>), ki je pomenilo število ciklov PCR protokola, ki je potrebno, da je bil specifičen produkt PCR viden na agaroznem gelu. Postavljena je bila groba semi-kvantitativna analiza izražanja transgena CP s pomočjo korelacije količine startnega materiala in števila potrebnih PCR

ciklov (Ct) (preglednica 12).



**Slika 22: Elektroforeza produktov PCR transgena CP (semi-kvantitativni RT-PCR).**

1. transgena linija 9; 2. transgena linija 19.

Figure 22: PCR products of CP transgene (semi-quantitative RT-PCR).

1. transgenic line 9; 2. transgenic line 19.

**Preglednica 12: Določanje mRNA transgena CP v transgenih linijah krompirja s semi-kvantitativno RT-PCR metodo.**

(C<sup>-</sup> negativna kontrola – netransgen krompir *S. tuberosum L.* sorte 'Igor'; C<sup>+</sup> pozitivna kontrola - netransgen krompir *S. tuberosum L.* sorte 'Igor' inokuliran z virusom PVY<sup>NTN</sup>; NA ni amplifikacije; - ni vidnega produkta PCR po 40. ciklu; + viden produkt PCR po 30. ciklu; ++ viden produkt PCR pri 25. ciklu; +++ pozitivna kontrola).

Table 12: Quantification of CP mRNA in transgenic potato lines by semi-quantitative RT-PCR. Numbers denote transgenic lines of potato plants. The threshold cycle was determined as the cycle where the visible band of specific PCR product first appeared on the agarose gel.

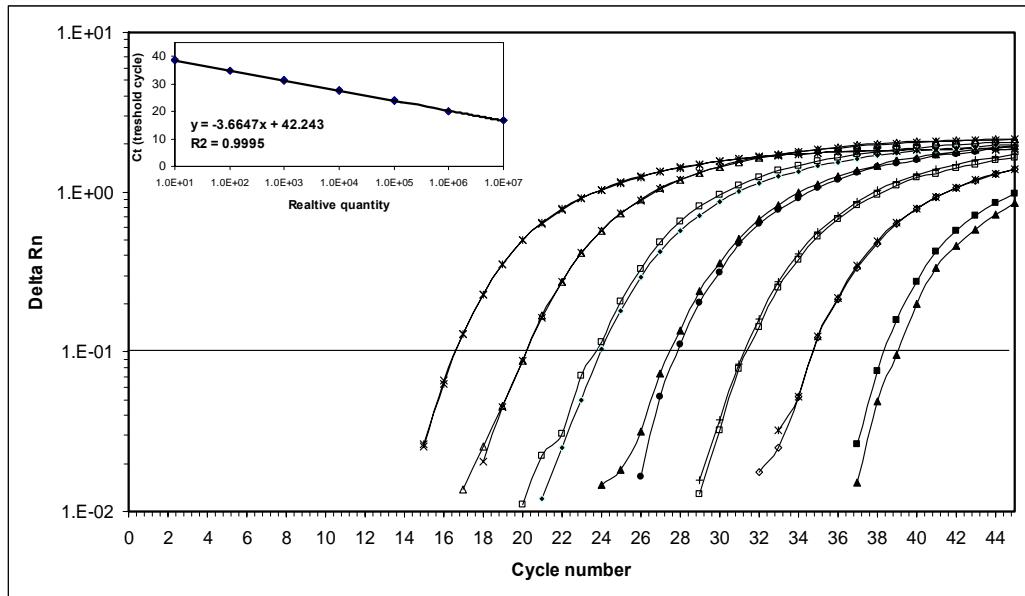
(C<sup>-</sup> non-transgenic potato plants *S. tuberosum L.* cv. Igor represented negative control; C<sup>+</sup> non-transgenic potato plants *S. tuberosum L.* cv. Igor infected with virus PVY<sup>NTN</sup> represented positive control; NA no amplification; - no appearance of visible band after the 40<sup>th</sup> cycle, + visible band appeared at 30<sup>th</sup> cycle; ++ visible band appeared at 25<sup>th</sup> cycle; +++ positive control).

Transgena linija	Število ciklov (Ct)	Nivo izražanja transgena CP	Transgena linija	Število ciklov (Ct)	Nivo izražanja transgena CP
1	30	+	28	30	+
2	30	+	29	30	+
3	30	+	32	25	++
5	30	+	33	NA	-
9	30	+	34	30	+
19	25	++	35	30	+
23	NA	-	C+	20	+++
27	NA	-	C-	NA	-

#### 4.2.2.2 Q-PCR

V prvem delu vpeljave Q-PCR metode smo preverili primernost načrtovanih amplikonov tako, da smo pripravili standardne krivulje iz osmih serijskih 10X redčenj. Vzorec iz katerega je bila pripravljena standardna krivulja, je bil pozitivna kontrola (netransformirana rastlina krompirja ali netransformirana rastlina tobaka, okužena z virusom PVY<sup>NTN</sup>).

Izračunali smo učinkovitost pomnoževanja transgena CP in interval linearnosti, ki je prikazan na sliki 23.



**Slika 23: Logaritemski prikaz pomnoževanja transgena CP.**

Figure 23: Amplification plot of amplification of transgene CP.

Dokazana je bila linearost kvantifikacije amplikona CP preko šestih logaritemskih območij. Nagib krivulje (s) je bil  $-3.665$  in učinkovitost pomnoževanja (E) je bila  $1.84$ . Pri zadnji uporabljeni razredčitvi je bila Ct vrednost približno 39 in je imela visok standardni odklon. S pomočjo upoštevanja učinkovitosti lahko predvidevamo, da je bilo pri tej redčitvi vzorca približno od  $1 - 10$  tarčnih molekul. Sipanje rezultatov je posledica zajemanja vzorcev iz startne raztopine.

Območje kvantifikacije za amplikon zunanje kontrole (amplikon *luc*) je bilo določeno na podoben način. Območje kvantifikacije sega preko štirih logaritemskih območij. Nagib krivulje (s) je bil  $-3.590$  in učinkovitost pomnoževanja amplikona *luc* (E) je bila  $1.89$ .

Specifičnost pomnoženega produkta transgena (transgene linije 19), dobljenega s Q-PCR reakcijo, smo določili s sekvenčno reakcijo. Uporabili smo pristop direktnega sekveniranja z oligonukleotidnimi začetniki CP F in CP R. S programom BioEdit smo po končanem

sekveniranju primerjali nukleotidno zaporedje dobljenega produkta PCR in sekvenco teoretičnega amplikona. Teoretični produkt je bil dolg 147 baz, s sekvenčno reakcijo pa smo določili zaporedje 115 nukleotidov, s čimer smo potrdili identiteto nastalega produkta PCR.

Nato smo vseh štirinajst transgenih linij krompirja in enajst transgenih linij tobaka analizirali s Q-PCR metodo. V Q-PCR reakciji smo uporabljali oligonukleotidne začetnike in sonde za transgen CP in zunanjo kontrolo *luc* (poglavlje 3.1.4.3).

Po končanem Q-PCR protokolu smo za vsak vzorec izračunali relativno izražanje transgena CP. Pravilnost rezultata smo ovrednotili s preverjanjem inhibicije v postopku reverzne transkripcije z naključnimi oligonukleotidnimi začetniki. Kot pozitivno kontrolo za preverjanje inhibicije smo uporabili cDNA luciferaze, ki smo jo dobili z reakcijo reverzne transkripcije z naključnimi oligonukleotidnimi začetniki vzorca *luc* mRNA razredčenega v vodi. Za končen izračun smo uporabljali  $\Delta\Delta Ct$  metodo. Kot kalibrator smo uporabili linijo z najvišjo ekspresijo transgena, v primeru transgenih rastlin krompirja smo uporabili linijo 19, v primeru transgenih rastlin tobaka pa linijo T3 (preglednica 13) (slika 24).

**Preglednica 13: Določanje ekspresije transgena CP s Q-PCR metodo v transgenih linijah krompirja in tobaka.**

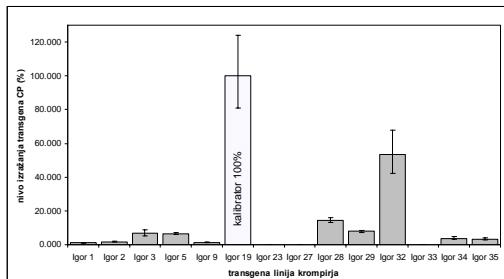
(C<sup>+a</sup> pozitivna kontrola - netransgen krompir *S. tuberosum L.* sorte 'Igor' okužen z virusom PVY<sup>NTN</sup>; C<sup>-b</sup> negativna kontrola netransgen krompir *S. tuberosum L.* sorte 'Igor'; C<sup>+c</sup> pozitivna kontrola - netransgen tobak *N. tabacum L.* sorte 'Samsun' okužen z virusom PVY<sup>NTN</sup>; C<sup>-d</sup> negativna kontrola netransgen tobak *N. tabacum L.* sorte 'Samsun'; Ct – število ciklov; SD standardni odklon; kalibrator pri testiranju transgenih linij krompirja je linija 19 pri testiranju transgenih linij tobaka pa linija T3)

Table 13: Quantification of transgene CP expression by Q-PCR in transgenic potato or tobacco lines.

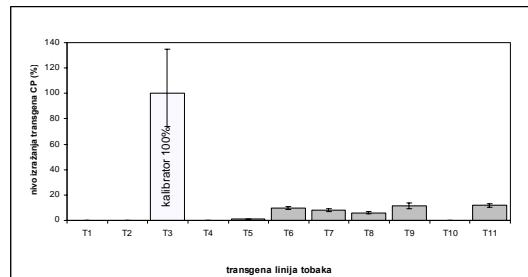
(C<sup>+a</sup> non-transgenic potato *S. tuberosum L.* cv. Igor infected with virus PVY<sup>NTN</sup> represented positive control; C<sup>-b</sup> non-transgenic potato *S. tuberosum L.* cv. Igor represented negative control; C<sup>+c</sup> non-transgenic tobacco *N. tabacum L.* cv. Samsun infected with virus PVY<sup>NTN</sup> represented positive control; C<sup>-d</sup> non-transgenic tobacco *N. tabacum L.* cv. Samsun represented negative control; Ct – cycle threshold; SD standard deviation; calibrator for transgenic potato lines was line 19 and for transgenic tobacco lines line T3).

Transgena linija krompirja	Povprečno število ciklov Ct ± SD	Nivo izražanja transgena CP (%)	Transgena linija tobaka	Povprečno število ciklov Ct ± SD	Nivo izražanja transgena CP (%)
1	28.8 ± 0.92	1.06 (0.85-1.32)	T1	42.39 ± 0.29	0
2	28.3 ± 0.08	1.70 (1.60-1.81)	T2	43.00 ± 0.00	0
3	25.1 ± 0.32	6.68 (5.08-8.78)	T3	22.85 ± 0.42	100.00 (134.95-74.10)
5	26.2 ± 0.57	6.54 (5.83-7.3)	T4	38.32 ± 0.24	0.00 (0.003-0.002)
9	27.2 ± 0.49	1.34 (1.13-1.59)	T5	29.99 ± 0.03	0.88 (0.99-0.78)
19	21.6 ± 0.6	100 (80.76-123.83)	T6	26.15 ± 0.14	9.55 (10.59-8.61)
23	37.8 ± 1.23	0	T7	26.50 ± 0.03	7.85 (9.16-6.72)
27	41.0 ± 0.00	0	T8	26.68 ± 0.17	5.83 (6.72-5.06)
28	25.1 ± 0.09	14.409 (13.17-15.77)	T9	25.74 ± 0.29	11.12 (13.57-9.11)
29	25.3 ± 0.02	7.911 (7.38-8.49)	T10	43.28 ± 0.08	0
32	24.2 ± 0.34	53.403 (42.07-67.79)	T11	25.57 ± 0.07	11.67 (13.11-10.39)
33	38.8 ± 0.03	0	C <sup>+c</sup>	11.21 ± 0.05	+
34	27.2 ± 0.24	3.755 (3.06-4.61)	C <sup>-d</sup>	42.35 ± 0.23	-
35	27.0 ± 0.26	3.326 (2.75-4.03)			
C <sup>+a</sup>	11.2 ± 0.12				
C <sup>-b</sup>	45.0 ± 0.00				
povprečna SD CP 0.17			povprečna SD CP 0.16		
povprečna SD luc 0.12			povprečna SD luc 0.10		
povprečna Ct luc 18.77			povprečna Ct luc 18.78		

Slika 24a



Slika 24b



**Slika 24a in 24b: Relativno izražanje transgena CP v transgenih rastlinah krompirja (a) in transgenih rastlinah tobaka (b).**

Figure 24a and 24b: Expression of transgene CP in transgenic potato (a) and transgenic tobacco plants (b).

#### 4.3 UGOTAVLJANJE MEHANIZMOV UTIŠANJA GENOV

Namen raziskovalnega dela je bil povečanje razumevanja mehanizma utišanja genov v transformiranih rastlinah krompirja na nivoju izražanja genov.

Analizo smo opravili na 32 različnih vzorcih (4 različne transgene linije, vzorčene v štirih časovnih točkah po inokulaciji (4, 8, 12 in 24 ur), ločeno za inokulirane rastline z virusom PVY<sup>NTN</sup> in slepo inokulirane rastline v treh bioloških ponovitvah (IV, VI in VII). V seriji IV in VII smo na enak način dodatno vzorčili netransgene rastline krompirja. V seriji VI in VII smo prisotnost virusa PVY<sup>NTN</sup> v inokulumu še dodatno potrdili s testom DAS-ELISA. V obeh primerih je bila vsebnost virusa v inokulumu visoka.

Vse vzorce, vseh treh serij smo analizirali s Q-PCR metodo. Analizirali smo izražanje treh genov AGO1, SGS3 in SDE3, ki so kandidati za člene v mehanizmu utišanja genov.

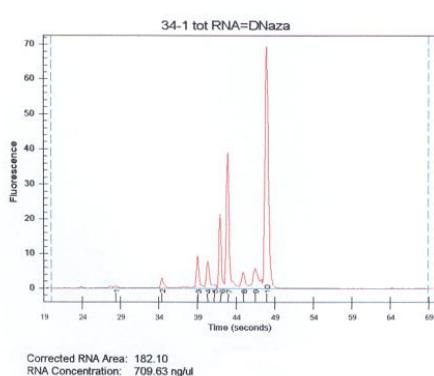
Vse 4 linije, v dveh časovnih točkah (8 in 12 ur po inokulaciji), smo analizirali še s krompirjevimi cDNA mikromrežami. cDNA mikromreže smo hibridizirali s pari vzorcev iste linije, kjer je bil en vzorec inokuliran z virusom in vzoren v določeni časovni točki, drug pa slepo inokuliran in vzoren v isti časovni točki. Vsak vzorec smo označili s svojim fluorescentnim barvilom. Med vzorci smo naključno menjavali barvila.

##### 4.3.1 ANALIZA KVALITETE IZOLIRANE RNA

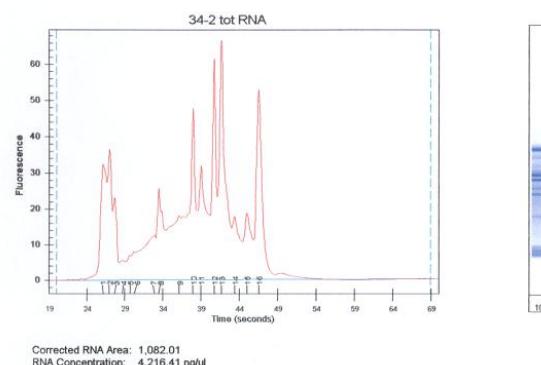
V vseh primerih smo za izolacijo celokupne RNA iz listov transgenih rastlin krompirja uporabljali komplet RNeasy Plant Mini kit. Kvaliteto in količino izolirane celokupne RNA smo preverili z nanosom na agarozni gel. V določenih primerih smo preverjali kvaliteto

izolacije s pomočjo instrumenta Agilent 2100 Bioanalyzer (slika 25). Metoda nam omogoča oceno količine in integracije celokupne izolirane RNA.

**Slika 25a**



**Slika 25b**



**Slika 25a in 25b: Določanje koncentracije in integritete celokupne RNA z instrumentom Agilent 2100 Bioanalyzer.**

a. nerazgrajena celokupna RNA transgene linije 34; b delno razgrajena RNA transgene linije 34.

Figure 25a and 25b: Determination of concentration and integrity of total RNA by instrument Agilent 2100 Bioanalyzer.

a. good quality total RNA of transgenic line 34; b. partly degraded total RNA of transgenic line 34.

Pri nadalnjih analizah kvalitete in koncentracije celokupne RNA smo se odločili za preverjanje na agaroznem gelu. Količino izolirane celokupne RNA, nanesene na agarozni gel, smo določili s programom GelPro. Na podlagi jakosti intenzitete oddane fluorescence kompleksa EtBr-RNA smo ocenili razredčitve vzorcev in jih z nadaljnji nanosi na agarozni gel relativno umerili.

Približno 40 µg celokupne izolirane RNA vzorcev smo tretirali z encimom DNaza I. S ponovnim nanosom na agarozni gel smo preverili uspešnost razgradnje gDNA.

Približno 1 µg vzorca smo prepisali z reakcijo reverzne transkripcije z naključnimi oligonukleotidnimi začetniki (poglavje 3.2.5.2).

#### 4.3.2 Q-PCR

V vsakem vzorcu smo s Q-PCR metodo določili izražanje genov AGO1, SDE3 in SGS3. Kot referenčni gen ozziroma endogeno kontrolo, za katero se predvideva, da se v vseh vzorcih izraža nespremenjeno, ne glede na tretiranje posameznega vzorca, smo uporabili gen 18S rRNA.

##### 4.3.2.1 Preverjanje inhibicije v reakciji reverzne transkripcije

V vsak vzorec celokupne RNA smo pred reverzno transkripcijo dodali *luc* mRNA. S preverjanjem pomnoževanja *luc* smo preverjali inhibicijo med reverzno transkripcijo. V vse vzorce je bila dodana enaka količina *luc* mRNA. Za vsak vzorec smo opravili Q-PCR reakcijo za dokazovanje amplikona *luc* in vrednost Ct primerjali s pozitivno kontrolo *luc* reakcije. Pozitivna kontrola luciferazne reakcije je bila reakcija, kjer smo namesto vzorca uporabili le 50 pg (v primeru serije IV) ali 100 pg (v primeru serije VI in VII) *luc* mRNA. Prisotnost inhibitorjev v reverzni transkripciji smo potrdili z velikim premikom vrednosti Ct (preglednica 14).

**Preglednica 14: Preverjanje inhibicije v reakcijah reverzne transkripcije z zunanjim kontrolnim vzorcem *luc* v serijah IV, VI in VII.**

(Ct število ciklov; SD standardni odklon; \* vzorci z inhibicijo)

Table 14: Detection of inhibition in reverse transcription reactions using exogenous control (*luc*) in biological repeats IV, VI and VII.

(Ct cycle threshold; SD standard deviation; \* samples with inhibition)

Serija	Povprečen Ct ± SD pozitivne kontrole <i>luc</i> amplikona	Povprečen Ct ± SD vseh vzorcev (*vzorci z velikim odstopanjem od povprečne vrednosti Ct pozitivne kontrole)
IV	20.37 ± 0.31	21.08 ± 0.79
VI	19.47 ± 0.35	19.83 ± 0.54 (*vzorec 620, 632)
VII	19.57 ± 0.49	20.93 ± 1.13 (*vzorec 703, 713, 730)

Pri posameznih vzorcih v določenih serijah smo zaznali večjo inhibicijo. Prav tako smo povprečno večjo inhibicijo zaznali v seriji VII (visok SD).

#### 4.3.2.2 Načrtovanje oligonukleotidnih začetnikov

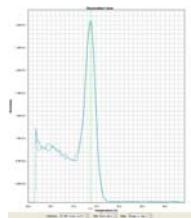
Kot osnovno za načrtovanje amplikonov SGS3 in SDE3 smo uporabili unikatna nukleotidna zaporedja, ki so določena v krompirjevih TIGR bazah StGI. Unikatno nukleotidno zaporedje posameznega gena je značilno za gen nanesen na cDNA mikromreže. Pogosto leži na 3' terminalnem delu gena, znotraj netranslacijske regije. V primeru načrtovanja specifičnih oligonukleotidnih začetnikov za gen AGO1 smo izbrali del nukleotidnega zaporedja, ki leži na 5' terminalnem delu nanesene cDNA in predstavlja proteinsko domeno PAZ. Po končanem načrtovanju smo kratke oligonukleotidne začetnike preverili s programskim strežnikom BLAST in tako potrdili njihovo specifičnost.

#### 4.3.2.3 Preverjanje specifičnosti in učinkovitosti načrtovanih amplikonov

V primerih kvantifikacije genov AGO1, SDE3 in SGS3 smo uporabljali SYBR Green I kemijo metodo. Za vsak amplikon smo preverili  $T_m$ , s čimer smo potrdili specifičnost naše reakcije.  $T_m$  je temperatura, pri kateri razпадe 50% nastalih produktov PCR (slika 26) in je odvisna od odstotka vsebnosti posameznih nukleotidov v amplikonu ter komponent kemikalij, ki jih uporabljamo v Q-PCR reakciji. Glede na primerjavo disociacijskih krivulj in  $T_m$  smo potrdili nastanek le enega produkta ter s tem specifičnost reakcij (preglednica 15).

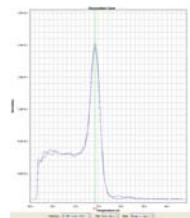
26a

AGO1



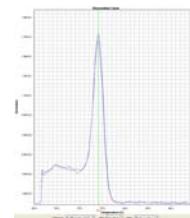
26b

SDE3



26c

SGS3

**Slika 26a, 26b in 26c: Disociacijske krivulje amplikonov AGO1, SDE3 in SGS3.**

a. amplikon AGO1; b. amplikon SDE3; c. amplikon SGS3

Figure 26a, 26b and 26c: Disociation curve of amplicons AGO1, SDE3 and SGS3.

a. amplicon AGO1; b. amplicon SDE3; c. amplicon SGS3

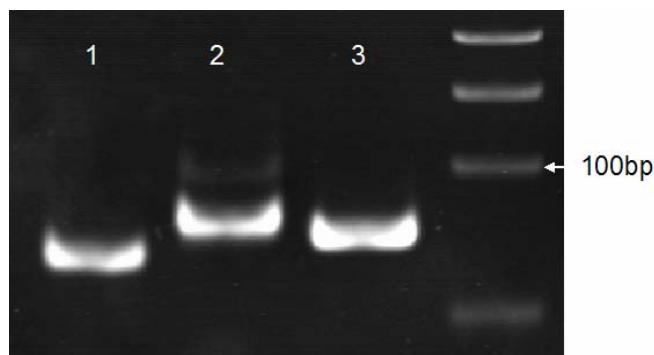
**Preglednica 15: Primerjava teoretično izračunane temperature taljenja (Tm) produkta PCR z eksperimentalno dobljeno temperaturo.**

Table 15: Comparison of calculated Tm of PCR product with experimentally obtained Tm values.

Amplikon	S programom Primer Express izračunana Tm	Dejanska Tm vseh Q-PCR reakcij
		Tm $\pm$ SD
Amplikon AGO1	77 °C	74.03 °C $\pm$ 0.60 °C
Amplikon SDE3	76 °C	74.69 °C $\pm$ 0.55 °C
Amplikon SGS3	77 °C	74.40 °C $\pm$ 0.59 °C

Ugotovili smo, da Tm amplikonov niha za v povprečju približno 0.58 °C in se razlikuje od teoretično izračunane Tm. Razlika med izračunano in dejansko Tm je odraz dejanskih pogojev v izvedeni Q-PCR reakciji.

Specifičnost dobljenih produktov PCR smo še dodatno preverili z analizo velikosti na poliakrilamidnem gelu, kot je opisano v poglavju 3.2.3.2.2 (slika 27).



**Slika 27: Elektroforeza produktov PCR na poliakrilamidnem gelu (AGO1, SDE3 in SGS3).**

Produkt PCR: 1. AGO1; 2. SDE3; 3. SGS3; 4. označevalec velikosti.

Figure 27: Detection of PCR products on polyacrylamide gel (AGO1, SDE3 in SGS3).

PCR product: 1. AGO1; 2. SDE3; 3. SGS3; 4. MW marker.

Z ločbo na poliakrilamidnem gelu smo za vse tri amplikone potrdili specifičnost, saj se je velikost dobljenih produktov PCR ujemala s teoretično izračunano velikostjo (preglednica 16).

Za vsak amplikon smo izračunali še povprečno vrednost učinkovitosti pomnoževanja za vse opravljene Q-PCR poizkuse (preglednica 16).

**Preglednica 16: Povprečna učinkovitost pomnoževanja Q-PCR reakcije za amplikon AGO1, SDE3 in SGS3.**

(E učinkovitost; SD standardni odklon)

Table 16: Average efficiency of amplification of Q-PCR reactions for amplicons AGO1, SDE3 and SGS3.

(E efficiency, SD standard deviation)

Amplikon	Velikost amplikona (bp)	Učinkovitost (E) ± SD
Amplikon AGO1	74	1.98 ± 0.21
Amplikon SDE3	77	2.06 ± 0.23
Amplikon SGS3	76	2.05 ± 0.24
Amplikon 18S rRNA	/	1.95 ± 0.12

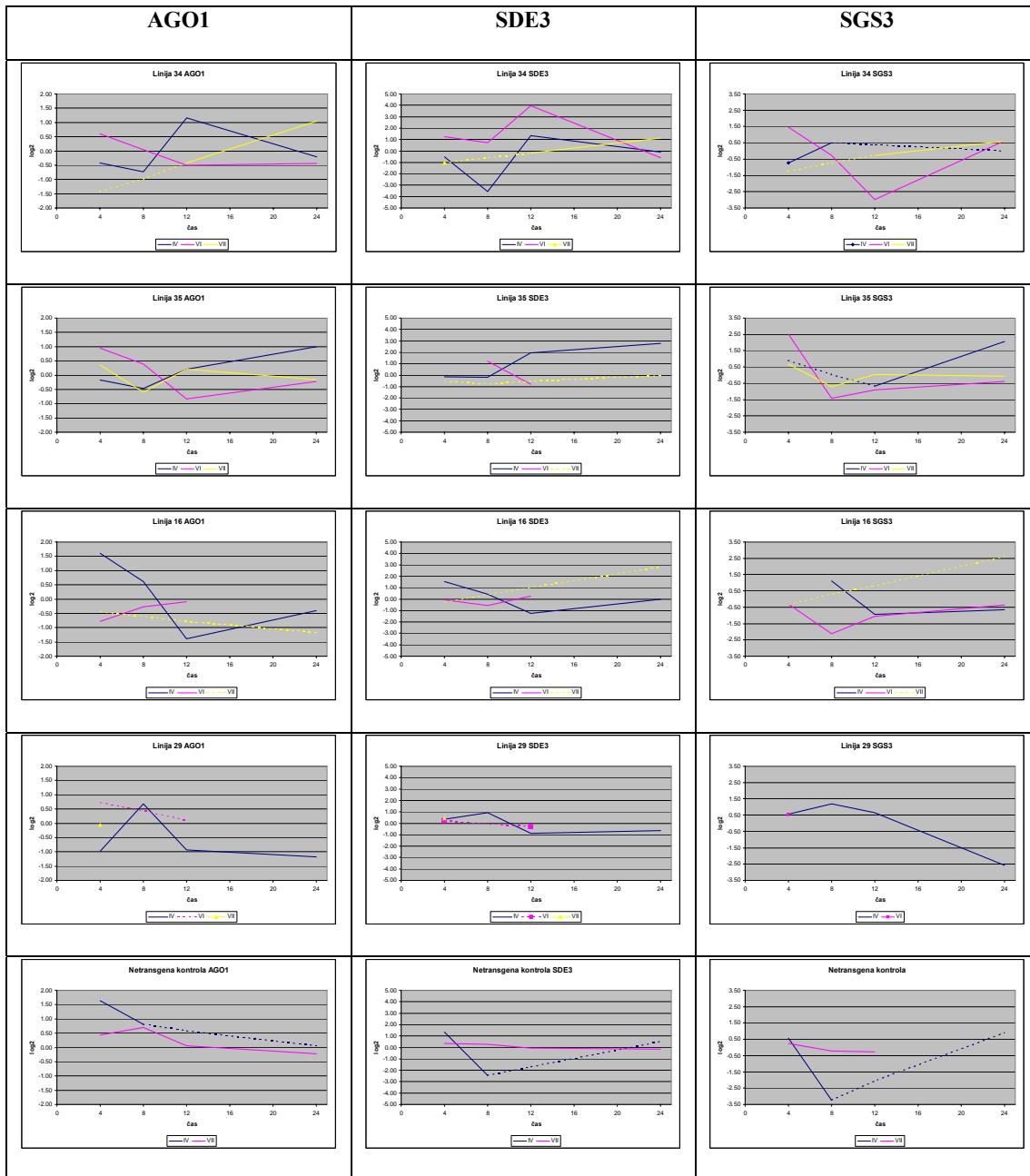
Ugotovili smo, da je standardni odklon učinkovitosti pomnoževanja pri amplikonih AGO1,

SDE3 in SGS3, kjer smo uporabljali SYBR Green I kemijsko metodo, višji kot v primeru uporabe specifične TaqMan kemijske metode (amplikon 18S rRNA).

Če je bil produkt specifičen s pravilno disociacijsko krivuljo, smo vrednosti Ct za posamezne vzorce izvozili v program Microsoft Excel in opravili končno relativno kvantifikacijo po metodi, ki jo je objavil Pfaffl leta 2001. Končna vrednost razmerij ekspresije za posamezen gen je bila izračunana med, z virusom PVY<sup>NTN</sup> inokuliranim vzorcem določene transgene linije, vzorčenim v določeni časovni točki po okužbi, in slepim vzorcem enake transgene linije vzorčenim v isti časovni točki. Vrednost razmerja smo podali kot  $\log_2$  vrednosti (slika 28).

Dobljene vrednosti smo analizirali še z metodo analize variance (ANOVA) po dveh modelih, vendar se nobeden od analiziranih genov ni pokazal kot statistično značilno spremenjeno izražen gen.

Povprečje dobljenih rezultatov Q-PCR reakcij za posamezne gene AGO1, SDE3 in SGS3 smo primerjali z dobljenimi povprečnimi rezultati cDNA mikromrež (slika 36).



Slika 28: Relativno izražanje genov AGO1, SDE3 in SGS3 v časovnih točkah vzorčenja 4, 8, 12 in 24 ur po okužbi z virusom za posamezne transgene linije (34, 35, 16, 29 in K (netransgeno kontrola)) s Q-PCR metodo.

..... manjkajoči podatki

Figure 28: Expression of AGO1, SDE3 and SGS3 after 4, 8, 12 and 24 hours after inoculation with virus for lines 34, 35, 16, 29 and K (nontransgenic control) by Q-PCR.

..... missing data

### 4.3.3 KROMPIRJEVE TIGR cDNA MIKROMREŽE

#### 4.3.3.1 Hibridizacija krompirjevih cDNA mikromrež

Profil izražanja 10000 genov smo spremljali s krompirjevimi cDNA mikromrežami v vseh 4 transgenih linijah (16, 29, 34 in 35), v dveh časovnih točkah (8 in 12 ur) po inokulaciji z virusom. Krompirjeve cDNA mikromreže smo hibridizirali s pari vzorcev iste linije, pri čemer je bil en vzorec inokuliran z virusom in vzorčen v določeni časovni točki (4 ali 8 ur), drugi pa slepo inokuliran in vzorčen v isti časovni točki po inokulaciji z virusom. Pri vsaki hibridizaciji smo en vzorec v paru označili s fluorescentnim barvilm Cy3, drugega pa s fluorescentnim barvilm Cy5. Tekom hibridizacije smo naključno menjavali fluorescentna barvila med vzorci. Natančen opis opravljenih hibridizacij cDNA mikromrež je povzet v preglednici 17.

**Preglednica 17: Načrt poizkusa hibridizacij cDNA mikromrež.**

Table 17: Experimental design of gene expression analysis by cDNA microarrays.

Serijska (biološka ponovitev)	Vzorec (linija, NTN-inokuliran z virusom, M-slepo inokuliran, 8 ali 12 ur -čas pobiranja vzorcev po inokulaciji)	Datum pobiranja vzorcev / Čas pobiranja vzorcev po okužbi	Barvilo	Datum izolacije celokupne RNA	Datum hibridizacije	Koda cDNA mikromreže	Datum skeniranja
4	29NTN8 29M8	07.9.04 / 8	Cy3 Cy5	10.9.04	270105	12900040	280105
4	29NTN12 29M12	07.9.04 / 12	Cy3 Cy5	10.9.04	060205	12900174	070105
4	16NTN8 16M8	07.9.04 / 8	Cy3 Cy5	10.9.04	060205	12890744	070205
4	16M12 16NTN12	07.9.04 / 12	Cy3 Cy5	10.9.04	060705	12900002	070705 080705
4	34M8 34NTN8	07.9.04 / 8	Cy3 Cy5	10.9.04	060205	12890740	070205
4	34NTN12 34M12	07.9.04 / 12	Cy3 Cy5	10.9.04	060705	12901282	070705 080705
4	35M8 35NTN8	07.9.04 / 8	Cy3 Cy5	10.9.04	270105	12900039	280105 310105
4	35M12 35NTN12	07.9.04 / 12	Cy3 Cy5	10.9.04	060205	12890745	070205
6	29M8 29NTN8	130305 / 8	Cy3 Cy5	150305	140605	12899921	150605 290605
6	29NTN12 29M12	130305 / 12	Cy3 Cy5	150305	130605	12901290	150605 290605
6	16M8 16NTN8	130305 / 8	Cy3 Cy5	150305	130605	12901280	150605
6	16NTN12 16M12	130305 / 12	Cy3 Cy5	150305	130605	12901288	150605 290605
6	34M8 34NTN8	130305 / 8	Cy3 Cy5	150305	130605	12899954	150605 290605
6	34NTN12 34M12	130305 / 12	Cy3 Cy5	150305	040605	12901281	050605 150605

se nadaljuje

nadaljevanje

**Preglednica 17: Načrt poizkusa hibridizacij cDNA mikromrež.**

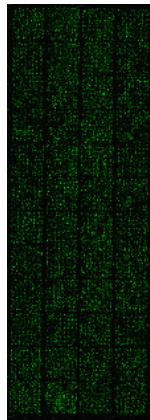
Table 17: Experimental design of gene expression analysis by cDNA microarrays.

Serija (biološka ponovitev)	Vzorec (linija, NTN-inokuliran z virusom, M-slepo inokuliran, 8 ali 12 ur – čas pobiranja vzorcev po inokulaciji)	Datum pobiranja vzorcev / Čas pobiranja vzorcev po okužbi	Barvilo	Datum izolacije celokupne RNA	Datum hibridizacije	Koda cDNA mikromreže	Datum skeniranja
6	35M8 35NTN8	130305 / 8	Cy3 Cy5	150305	040605	12900344	050605 150605
6	35NTN12 35M12	130305 / 12	Cy3 Cy5	150305	140605	12899555	150605 290605
7	29M8 29NTN8	130305 / 8	Cy3 Cy5	150305	060705	12901287	070705 080705
7	29NTN12 29M12	130305 / 12	Cy3 Cy5	150305	270605	12890979	290605
7	16M8 16NTN8	130305 / 8	Cy3 Cy5	150305	270605	12900003	290605
7	16NTN12 16M12	130305 / 12	Cy3 Cy5	150305	270605	12899924	290605
7	34M8 34NTN8	130305 / 8	Cy3 Cy5	150305	270605	12900005	290605
7	34NTN12 34M12	130305 / 12	Cy3 Cy5	150305	270605	12899926	290605
7	35M8 35NTN8	130305 / 8	Cy3 Cy5	150305	270605	12899922	290605
7	35NTN12 35M12	130305 / 12	Cy3 Cy5	150305	060705	12900044	070705 080705

Pred hibridizacijo smo še dodatno odstranili ostanke encima DNaze I s kompletom kemikalij RNeasy MinElute Spin kit.

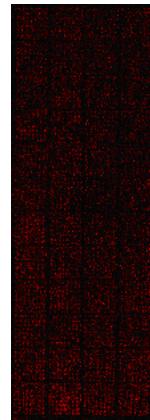
Hibridizacijo krompirjevih cDNA mikromrež smo izvedli kot je opisano v poglavju 3.2.6.1. Po končanem postopku smo dobili rezultate za vsako cDNA mikromrežo v obliki dveh slik, eno za Cy5 in drugo za Cy3, v formatu \*.tiff (slika 29a in 29b).

Slika 29a



cDNA MIKROMREŽA (Cy3)

Slika 29b



cDNA MIKROMREŽA (Cy5)

**Slika 29a in 29b: Krompirjeva TIGR cDNA mikromreža.**

a. fluorescentno barvilo Cy3; b. fluorescentno barvilo Cy5

Figure 29a and 29b: Potato TIGR cDNA microarray.

a. fluorescent dye Cy3; b fluorescent dye Cy5

#### 4.3.3.2 Analiza cDNA mikromrež

Iz podatkov slik smo ekstrahirali podatke o jakosti signala posameznih točk in ocenili kvaliteto teh podatkov. Vse te informacije o posamezni točki smo prenesli v nadaljnje analize v programskem okolju R. Izračunali smo število točk na posamezni cDNA mikromreži, ki so zadostile postavljenim pogojem kvalitete (preglednica 18).

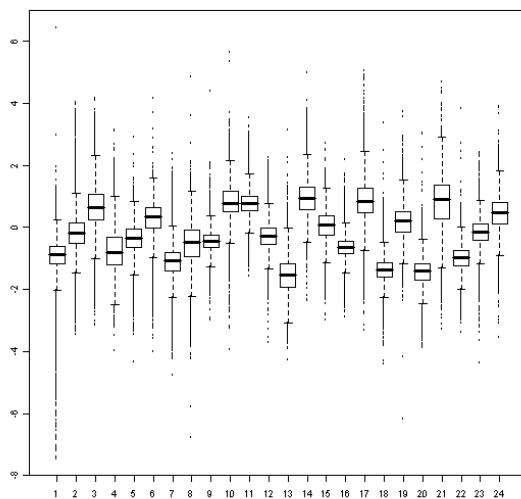
**Preglednica 18: Število analiziranih točk na posamezni cDNA mikromreži, ki so imele primerno kvaliteto za nadaljnjo obdelavo v programskem okolju R.**

Table 18: The number of useful spots on cDNA microarray for analysis in package R.

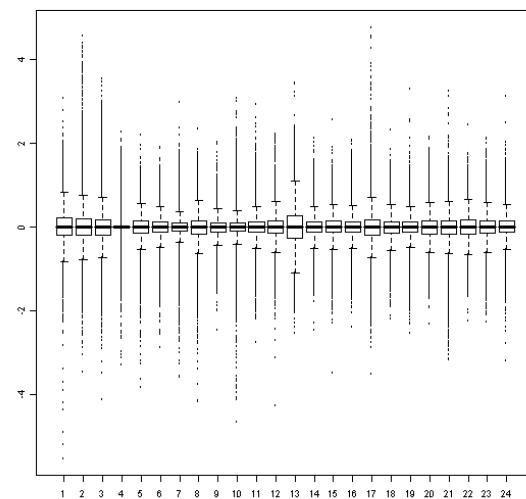
Številka mikromreže na x-osi na sliki 30	Koda cDNA mikromreže	Število uporabnih točk	Številka mikromreže na x-osi na sliki 30	Koda cDNA mikromreže	Število uporabnih točk
1	<b>12899921</b>	22096	13	<b>12899954</b>	22479
2	<b>12901287</b>	18925	14	<b>12900005</b>	19038
3	<b>12900040</b>	21621	15	<b>12890740</b>	21819
4	<b>12901290</b>	7021	16	<b>12901281</b>	21040
5	<b>12890979</b>	20792	17	<b>12899926</b>	20415
6	<b>12900174</b>	20407	18	<b>12901282</b>	21672
7	<b>12901280</b>	14492	19	<b>12900344</b>	20772
8	<b>12900003</b>	18936	20	<b>12899922</b>	22870
9	<b>12890744</b>	21867	21	<b>12900039</b>	20814
10	<b>12901288</b>	14778	22	<b>12899555</b>	22989
11	<b>12899924</b>	22230	23	<b>12900044</b>	21570
12	<b>12900002</b>	22303	24	<b>12890745</b>	17976

Analizo v programskem okolju R smo opravili kot je opisano v poglavju 3.2.6.2. V programskem okolju R smo podatkom odšteli ozadje in jih znotraj cDNA mikromreže normalizirali. Izračunali smo vrednost M (7) in vrednost A (8) za posamezne točke in izrisali grafikon kvantilov za hibridizirane cDNA mikromreže pred normalizacijo in po normalizaciji (slika 30).

Slika 30a



Slika 30b

**Slika 30a in 30b: Normalizacija podatkov krompirjevih cDNA mikromrež.**

a. nenormalizirani podatki (vsak izmed »boxplotov« predstavlja eno izmed cDNA mikromrež), b. normalizirani podatki pridobljeni z LOWESS normalizacijo z 10 iteracijami (vsak izmed »boxplotov« predstavlja eno izmed cDNA mikromrež)

kode cDNA mikromrež so podane v preglednici 18

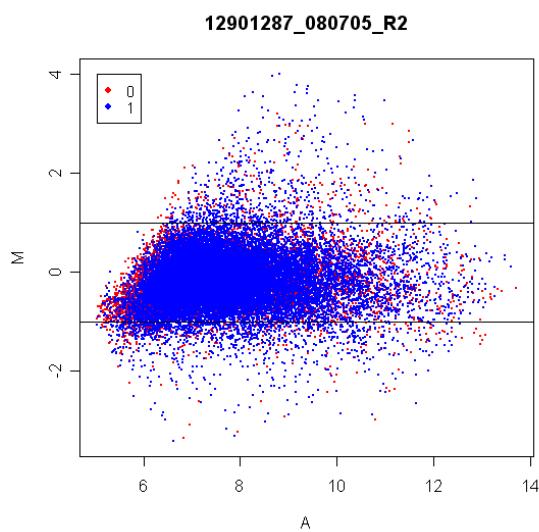
Figure 30a and 30b: Normalization of potato cDNA microarrays.

a. Non-normalized data of all hybridized cDNA mikroarrays; b. normalized data of all cDNA microarrays (type of normalization is LOWESS with 10 iterations)

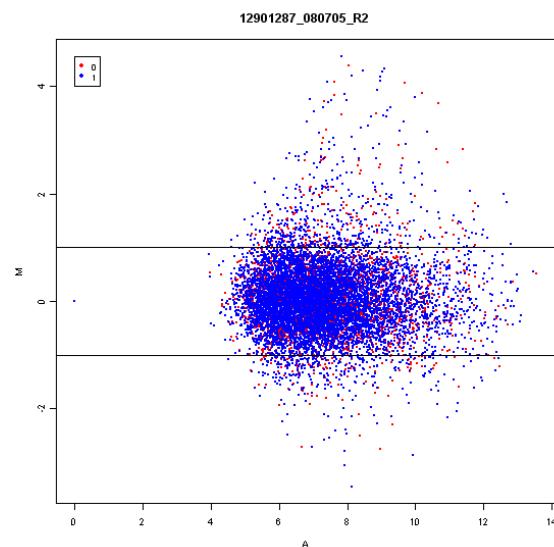
Name of microarrays are described in table 18.

Po končani normalizaciji smo dodatno popravili ozadje točk in sicer tako, da smo normaliziranim vrednostim fluorescence odšteli ozadje za vsako valovno dolžino posebej ter dobljenim negativnim vrednostim umetno pripisali M vrednost 0.5. Sledilo je povprečenje izračunanih vrednosti A in M med točkami, ki so predstavljale isti klon cDNA (tehnične paralele). Izrisali smo MA graf ene izmed cDNA mikromrež (12901287) pred povprečenjem in po povprečenju rezultatov (slika 31).

Slika 31a



Slika 31b

**Slika 31a in 31b: Normalizacija podatkov cDNA mikromreže s kodo 12901287.**

a. M, A vrednosti pred povprečenjem paralelk klonov cDNA mikromreže s kodo 12901287; b. normalizirane in povprečene vrednosti M in A cDNA mikromreže s kodo 12901287

Figure 31a and 31b: Normalization of data of cDNA microarray number 12901287.

a. MA values before average of parallel clones data of microarray number 12901287; b. Normalized and averaged values of M and A of microarray number 12901287

Ker smo pri hibridizacijah vzorcev na cDNA mikromreže naključno menjavali barvila, smo v primeru, da je bil slepo inokuliran vzorec označen z barvilom Cy5, vrednosti M pomnožili z -1, nato smo podatke filtrirali. Po končanem filtriranju, smo dobili 6377 genov, ki so zadostili vsem navedenim pogojem in smo jih uporabili v nadaljnji analizi. Končne podatke smo uredili v tabelo. Sledil je nadaljnji statistični test - analiza varianc (ANOVA). Uporabljali smo gnezdeno obliko testa ANOVA in prvi model je bil ( $x \sim (R/L)*C + Error(B)$ ). Tako smo med seboj, v prvi fazzi, primerjali rezultate glede na naslednje parametre: odziv na okužbo z virusom PVY<sup>NTN</sup> (parameter R) (rezistentne (linija 34 in linija 35) in občutljive linije (linija 16 in linija 29)) in znotraj tega pogoja med posameznimi linijami (parameter L) (linija 16, linija 29, linija 34 in linija 35) v kombinaciji s časovnimi točkami (parameter C) (8 in 12 ur) upoštevajoč razliko med tremi

biološkimi ponovitvami (parameter B). Drugi uporabljeni model je bil ( $x \sim L^*C + \text{Error}(B)$ ). V tem modelu smo med seboj primerjali vse štiri linije (L) v kombinaciji s časovnimi točkami vzorčenja (C) upoštevajoč razliko med tremi biološkimi ponovitvami (B). Končni rezultati so podani v skupni preglednici 19, glede na podane p-vrednosti (raven značilnosti).

**Preglednica 19: Število značilno različno izraženih genov po analizi variance (Model 1 in Model 2) glede na p-vrednost.**

(Parametri: R - rezistentne (34 in 35) in občutljive (16 in 29) linije; L - linija 16, linija 29, linija 34 in linija 35; C - vzorčenje 8 ali 12 ur po inokulaciji; p-vrednost)

Table 19: The number of significantly expressed genes after the ANOVA (Model 1 and Model 2 by p-value).

(Parameters: R - resistant (34 and 35) and susceptible (16 and 29) lines; L - line 16, line 29, line 34 and line 35; C - 8 or 12 hours after inoculation with virus; p-value)

Analiza variabilnosti in kovariabilnosti glede na različne parametre (R, L, C)	
p vrednost	Število značilno izraženih genov

Analiza variabilnosti med časovnima točkama vzorčenja (C)	
(8 ali 12 ur)	
<u>1. model</u>	
p $\leq$ 0.001	1
0.001 $\leq$ p $\leq$ 0.01	33
0.01 $\leq$ p $\leq$ 0.05	220
0.05 $\leq$ p $\leq$ 0.10	305

se nadaljuje

nadaljevanje

**Preglednica 19: Število značilno različno izraženih genov po analizi variance (Model 1 in Model 2) glede na p-vrednost.**

(Parametri: R - rezistentne (34 in 35) in občutljive (16 in 29) linije; L - linija 16, linija 29, linija 34 in linija 35; C - vzorčenje 8 ali 12 ur po inokulaciji; p-vrednost)

Table 19: The number of significant expressed genes after the ANOVA (Model 1 and Model 2 by p-value).

(Parameters: R - resistant (34 and 35) and susceptible (16 and 29) lines; L - line 16, line 29, line 34 and line 35; C - 8 or 12 hours after inoculation with virus; p-value)

<b>Analiza variabilnosti in kovariabilnosti glede na različne parametre (R, L, C)</b>	
p vrednost	Število značilno izraženih genov

<b>Analiza variabilnosti med linijami glede na odziv na okužbo z virusom PVY<sup>NTN</sup> (R)</b>	
(rezistentne linije (34 in 35) in občutljive linije (16 in 29))	
<u>1. model</u>	
p ≤ 0.001	2
0.001 ≤ p ≤ 0.01	16
0.01 ≤ p ≤ 0.05	145
0.05 ≤ p ≤ 0.10	203

<b>Analiza kovariabilnosti med odzivom na okužbo z virusom PVY<sup>NTN</sup> in linijami (R in L)</b>	
(rezistentni liniji (34 in 35) ter občutljivi liniji (16 in 29) ter linija 16, linija 29, linija 34 in linija 35)	
<u>1. model</u>	
p ≤ 0.001	5
0.001 ≤ p ≤ 0.01	42
0.01 ≤ p ≤ 0.05	227
0.05 ≤ p ≤ 0.10	310

<b>Analiza kovariabilnosti med odzivom na okužbo z virusom PVY<sup>NTN</sup> in časom (R in C)</b>	
(rezistentni liniji (34 in 35) ter občutljivi liniji (16 in 29) ter čas (8 ali 12 ur))	
<u>1. model</u>	
p ≤ 0.001	6
0.001 ≤ p ≤ 0.01	131
0.01 ≤ p ≤ 0.05	521
0.05 ≤ p ≤ 0.10	514

se nadaljuje

nadaljevanje

**Preglednica 19: Število značilno različno izraženih genov po analizi variance (Model 1 in Model 2) glede na p-vrednost.**

(Parametri: R - rezistentne (34 in 35) in občutljive (16 in 29) linije; L - linija 16, linija 29, linija 34 in linija 35; C - vzorčenje 8 ali 12 ur po inokulaciji; p-vrednost).

Table 19: The number of significant expressed genes after the ANOVA (Model 1 and Model 2 by p-value).

(Parameters: R - resistant (34 and 35) and susceptible (16 and 29) lines; L - line 16, line 29, line 34 and line 35; C - 8 or 12 hours after inoculation with virus; p-value).

<b>Analiza variabilnosti in kovariabilnosti glede na različne parametre (R, L, C)</b>	
p vrednost	Število značilno izraženih genov

<b>Analiza kovariabilnosti med odzivom na okužbo z virusom PVY<sup>NTN</sup>, časom in linijami (R, L in C)</b>	
(rezistentni liniji (34 in 35) ter občutljivi liniji (16 in 29) ter linija 16, linija 29, linija 34 in linija 35 ter čas (8 ali 12 ur))	
<u>1. model</u>	
p ≤ 0.001	2
0.001 ≤ p ≤ 0.01	40
0.01 ≤ p ≤ 0.05	220
0.05 ≤ p ≤ 0.10	304

<b>Analiza variabilnosti med linijami glede na odziv na okužbo z virusom PVY<sup>NTN</sup> (L)</b>	
(rezistentne linije (34 in 35) in občutljive linije (16 in 29))	
<u>2. model</u>	
p ≤ 0.001	3
0.001 ≤ p ≤ 0.01	33
0.01 ≤ p ≤ 0.05	174
0.05 ≤ p ≤ 0.10	261

<b>Analiza variabilnosti med linijami glede na odziv na okužbo z virusom PVY<sup>NTN</sup> in časom (L in C)</b>	
(rezistentne linije (34 in 35) in občutljive linije (16 in 29) ter čas (8 in 12 ur))	
<u>2. model</u>	
p ≤ 0.001	5
0.001 ≤ p ≤ 0.01	70
0.01 ≤ p ≤ 0.05	319
0.05 ≤ p ≤ 0.10	418

Največ značilno različno izraženih genov (glede na p-vrednost nižjo od 0.1) smo dobili s statističnim testom analize variance, glede na odziv rastline na okužbo (rezistenten ali občutljiv) in časovne točke vzorčenja po okužbi. To pomeni, da prihaja do značilne razlike med izražanjem določenih genov po okužbi z virusom, po določenem času, med rezistentnim in občutljivim fenotipom, ne glede na genotip posamezne linije. Prav tako smo ugotovili razlike v izražanju nekaterih genov med linijami, ne glede na to, da je odziv določene linije na okužbo enak.

S programom MeV smo izrisali značilno izražene gene glede na vse parametre upoštevane s statističnim testom ANOVA in opravili osnovno razvrščanje podatkov v skupine (slika 32).

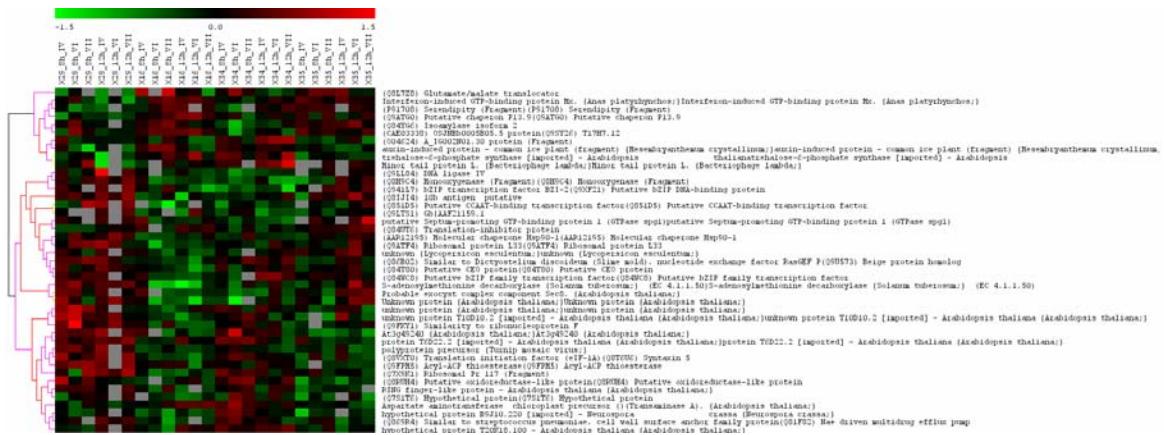
a. parameter C



b. parameter R



c. parameter RL



**Slika 32: Toplotni grafi značilno izraženih genov po testu ANOVA, katerih ocena verjetnosti p (p-vrednost) je manjša od 0.01.**

a. Parameter C; b. Parameter R; c. parameter RL; d. parameter RC; e. parameter RCL; f. parameter L; g. parameter LC. R – odziv na okužbo (rezistentne / občutljive linije); L - linija 16, linija 29, linija 34 in linija 35; C - 8 in 12 ur po okužbi.

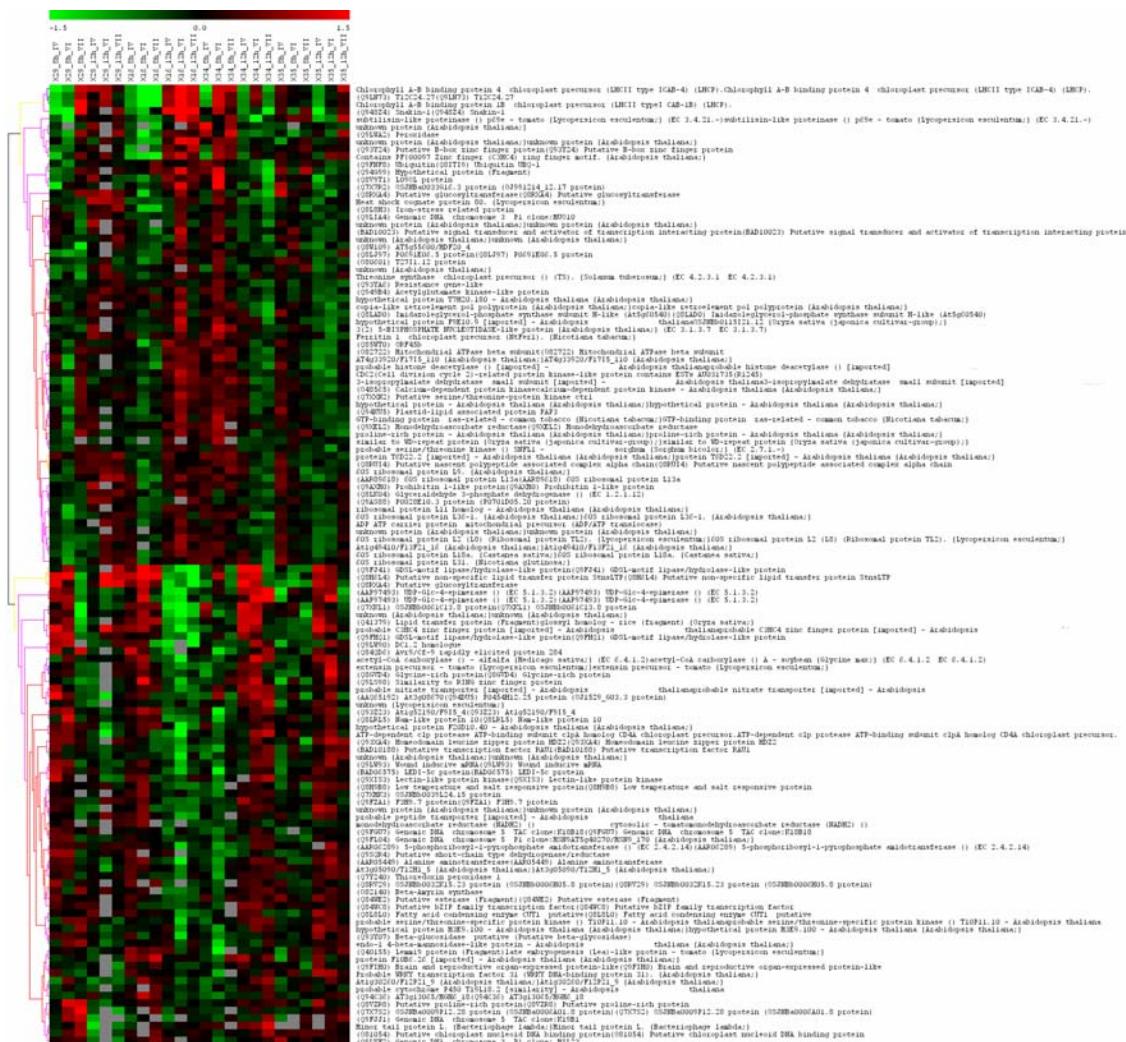
Figure 31: Heatmaps for significant expressed genes with a p-value lower than 0.01.

parameter C; b. parameter R; c. parameter RL; d. parameter RC; e. parameter RCL; f. parameter L; g. parameter LC. R – resistant / sensitive lines; L - line 16, line 29, line 34 and line 35; C - 8 and 12 h after the inoculation virus.

Se nadaljuje

nadaljevanje

d. parameter RC



**Slika 32:** Toplotni grafi značilno izraženih genov po testu ANOVA, katerih ocena verjetnosti p (p-vrednost) je manjša od 0.01.

a. Parameter C; b. Parameter R; c: parameter RL; d. parameter RC; e. parameter RCL; f. parameter L; g. parameter LC. R – odziv na okužbo (rezistentne / občutljive linije); L - linija 16, linija 29, linija 34 in linija 35; C - 8 in 12 ur po okužbi.

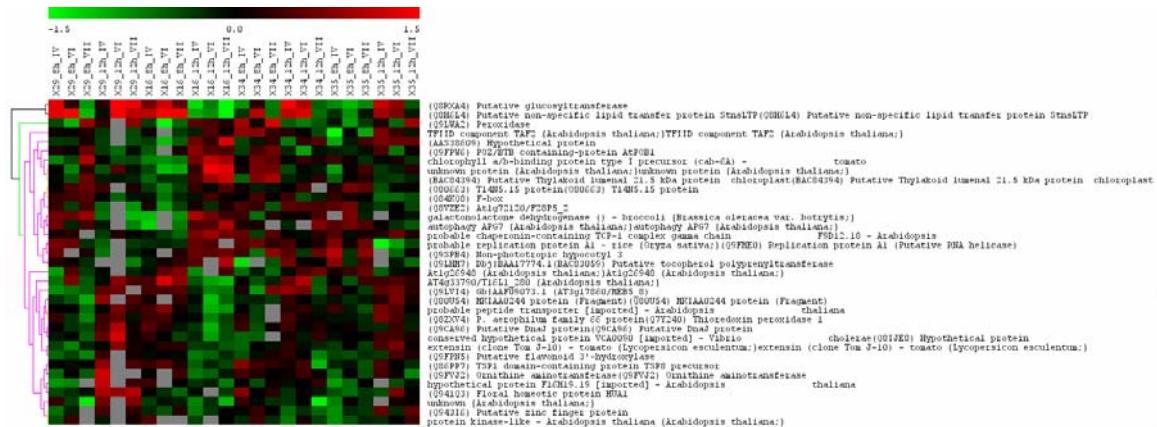
Figure 31: Heatmaps for significant expressed genes with a p-value lower than 0.01.

a. parameter C; b. parameter R; c. parameter RL; d. parameter RC; e. parameter RCL; f. parameter L; g. parameter LC. R – resistant / sensitive lines; L - line 16, line 29, line 34 and line 35; C - 8 and 12 h after the inoculation.

se nadaljuje

nadaljevanje

e. parameter RCL



f. parameter L



**Slika 32: Toplotni grafi značilno izraženih genov po testu ANOVA, katerih ocena verjetnosti p (p-vrednost) je manjša od 0.01.**

a. Parameter C; b. Parameter R; c. parameter RL; d. parameter RC; e. parameter RCL; f. parameter L; g. parameter LC

R – odziv na okužbo (rezistentne / občutljive linije); L - linija 16, linija 29, linija 34 in linija 35; C - 8 in 12 ur po okužbi.

Figure 31: Heatmaps for significant expressed genes with a p-value lower than 0.01.

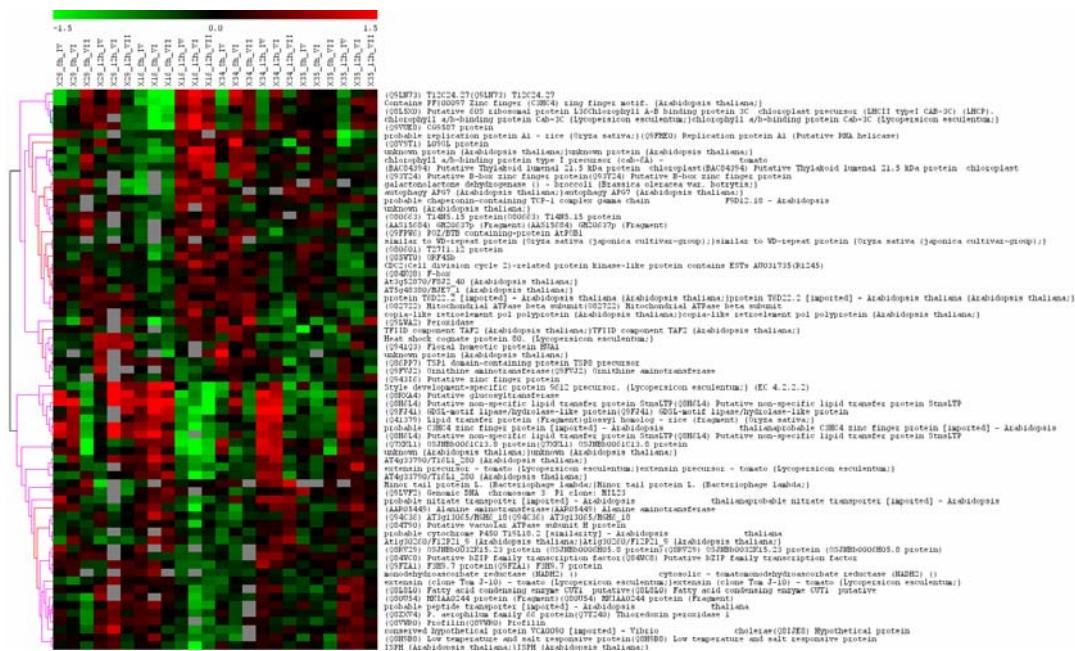
a. parameter C; b. parameter R; c. parameter RL; d. parameter RC; e. parameter RCL; f. parameter L; g. parameter LC

R – resistant / sensitive lines; L - line 16, line 29, line 34 and line 35; C - 8 and 12 h after the inoculation.

se nadaljuje

nadaljevanje

### g. Parameter LC



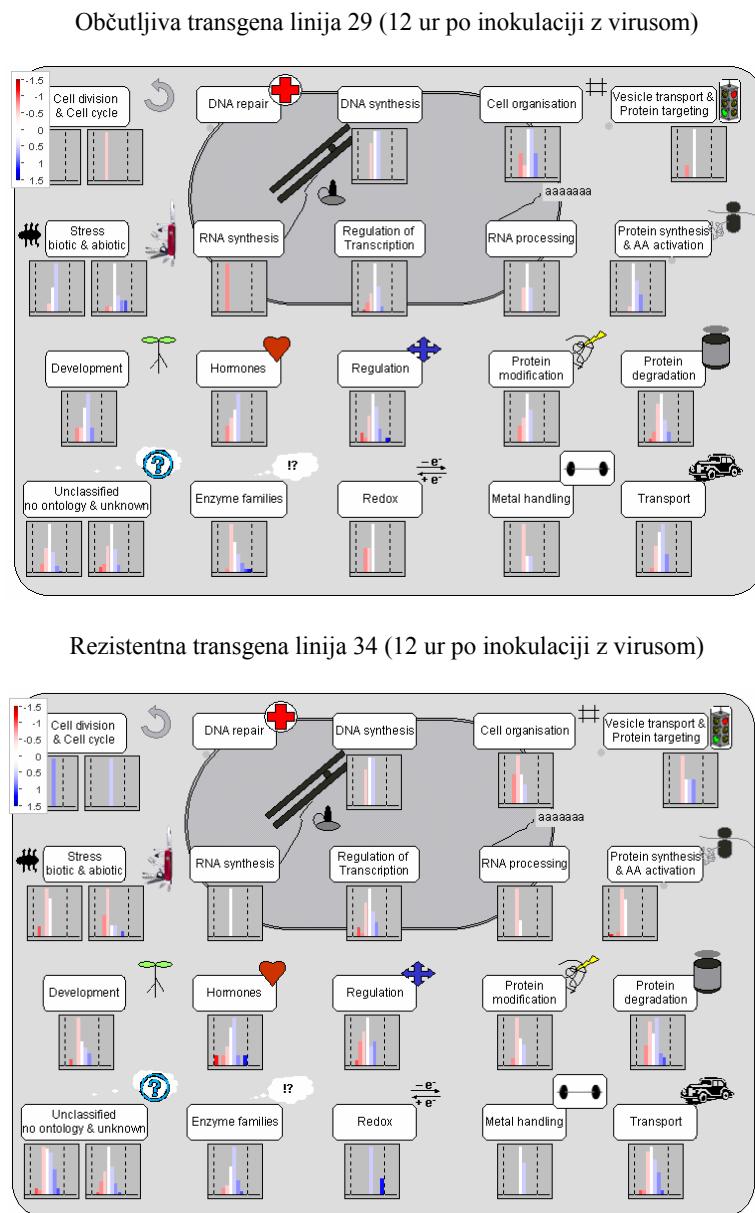
Slika 32: Toplotni grafi značilno izraženih genov po testu ANOVA, katerih ocena verjetnosti p (p-vrednost) je manjša od 0.01.

a. Parameter C; b. Parameter R; c. parameter RL; d. parameter RC; e. parameter RCL; f. parameter L; g. parameter LC. R – odziv na okužbo (rezistentne / občutljive linije); L - linija 16, linija 29, linija 34 in linija 35; C - 8 in 12 ur po okužbi.

Figure 32: Heatmaps for significant expressed genes with a p-value lower than 0.01.

a. parameter C; b. parameter R; c. parameter RL; d. parameter RC; e. parameter RCL; f. parameter L; g. parameter LC. R – resistant / sensitive lines; L - line 16, line 29, line 34 and line 35; C - 8 and 12 h after the inoculation.

S programom MapMan smo značilno različno izražene gene povezali z njihovo biološko funkcijo v rastlinski celici (slika 33).



**Slika 33: Shematski prikaz značilno različno izraženih genov povezanih z biološko funkcijo v celici.**

Občutljiva linija 29 in rezistentna linija 34.

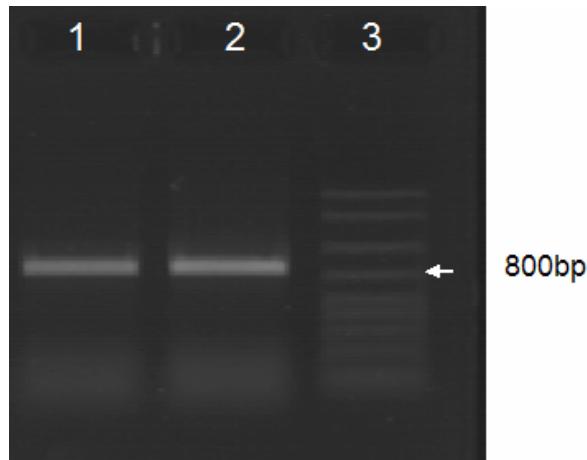
Figure 33: Model of significantly expressed genes correlated with the biological function in the cell.  
Sensitive line 29 and resistant line 34.

#### 4.3.4 DOKAZOVANJE PRISOTNOSTI siRNA MOLEKUL

Z analizo in dokazovanjem prisotnosti siRNA molekul potrdimo mehanizem utišanja genov. Prisotnost siRNA molekul smo dokazovali v treh transgenih linijah krompirja (liniji 34, liniji 35 in liniji 16).

Celokupno RNA smo iz vseh treh linij izolirali z reagentom TRIzol® (poglavlje 3.2.3.1.2), ki ga uporabljamo v primeru, ko želimo izolirati tudi krajše molekule RNA. Iz linije 35 smo majhne molekule RNA izolirali še dodatno s kombinacijo dveh kompletov RNeasy Plant Mini kit in RNeasy MinElute Spin kit (poglavlje 3.2.3.1.3).

Kot osnovno matrico za radioaktivno označeno sondu smo uporabili produkt PCR transgena CP, ki je bil vnesen v transformirane rastline krompirja. Po končani PCR reakciji smo produkt PCR preverili na agaroznem gelu in ga očistili (slika 34). Očiščen produkt PCR transgena smo označili s sistemom reagentov Rediprime random prime labeling kit.



**Slika 34: Elektroforeza produkta PCR transgena CP.**

1. uspešno pomnožen produkt PCR CP; 2. uspešno pomnožen produkt PCR CP; 3. označevalec velikosti.

Figure 34: PCR product of CP transgene.

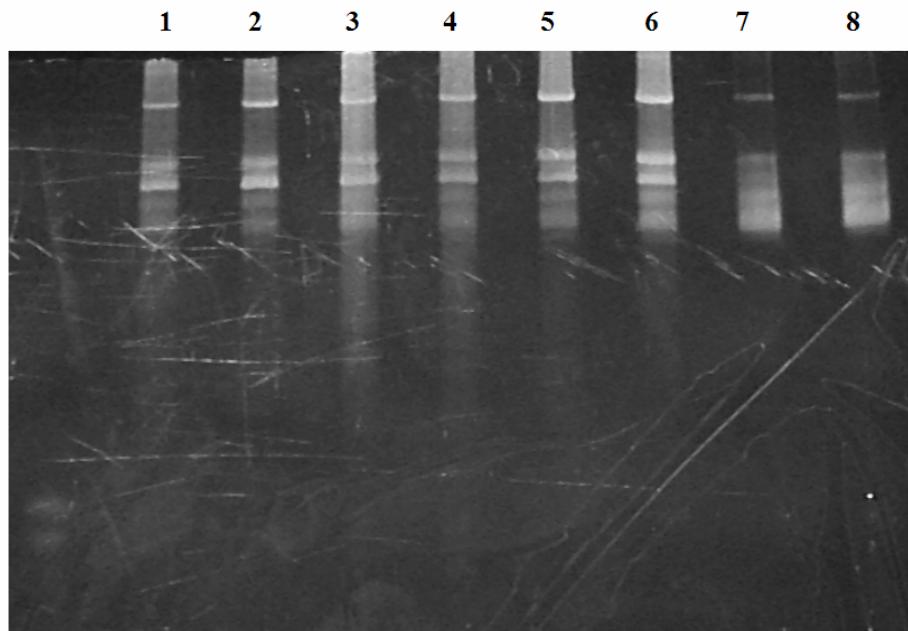
1. successful multiplication of CP PCR product; 2. successful multiplication of CP PCR product; 4. MW marker.

Po izolaciji smo določili koncentracijo celokupne RNA z instrumentom NanoDrop 1000.

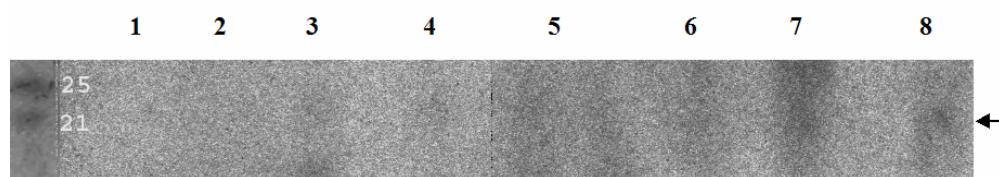
Nanos in integriteto vzorcev nanesenih na poliakrilamidni gel smo preverili z barvanjem z EtBr (slika 35a). S semi-suhim načinom smo RNA prenesli na najlonsko membrano in jo po končanem prenosu fiksirali s pomočjo ultra-vijoličnega žarčenja in dodatnega segrevanja. Membrano smo prehibridizirali s hibridizacijskim pufrom z dodano gDNA lososovih testisov, ki s svojo vezavo na membrano prepreči nespecifično hibridizacijo. Po končani prehibridizaciji smo zamenjali pufer z novim hibridizacijskim pufrom, ki je vseboval označeno sondu. Membrano smo po hibridizaciji sprali in postavili v kaseto za detekcijo radioaktivnosti in naslednji dan izmerili uspešnost hibridizacije. Končni rezultat je podan v obliki slike 35b.

Prisotnost molekul siRNA, velikosti ~21 bp, smo dokazali v rezistentni liniji 34 in rezistentni liniji 35, ne pa v občutljivi liniji 16. Za linijo 35 smo dobili pozitiven rezultat ne glede na to ali smo kot osnovno matrico uporabljali celokupno RNA ali izolirane kratke molekule RNA.

Slika 35a



Slika 35b



**Slika 35a in 35b: (a) odtis celotne RNA na membrani obarvani z EtBr. (b) kratke molekule RNA, hibridizirane z radioaktivno označeno sondjo (produkt PCR CP PVY<sup>NTN</sup>).**

Različne transformirane rastlinske linije so označene s številkami.

1. občutljiva linija 16 (celokupna RNA izolirana iz inokuliranih listov); 2. občutljiva linija 16 (celokupna RNA izolirana iz zgornjih listov); 3. rezistentna linija 34 (celokupna RNA izolirana iz inokuliranih listov); 4. rezistentna linija 34 (celokupna RNA izolirana iz zgornjih listov); 5 rezistentna linija 35 (celokupna RNA izolirana iz inokuliranih listov); 6 rezistentna linija 35 (celokupna RNA izolirana iz zgornjih listov); 7. rezistentna linija 35 (izolirane kratke molekule RNA – inokulirani listi); 8. rezistentna linija 35 (izolirane kratke molekule RNA iz zgornjih listov)

Figure 35a and 35b: (a) print of total RNA on membrane coloured with EtBr; (b) siRNA hybridized with radioactive labelled probe of CP PVY<sup>NTN</sup>.

Different transgenic lines are marked with numbers.

1. susceptible line 16 (total RNA – inoculated leaves); 2. susceptible line 16 (total RNA – upper leaves), 3. resistant line 34 (total RNA – inoculated leaves); 4. resistant line 34 (total RNA – upper leaves); 5. resistant line 35 (total RNA – inoculated leaves); 6. resistant line 35 (total RNA – upper leaves); 7. resistant line 35 (siRNA – inoculated leaves); 8. resistant line 35 (siRNA – upper leaves)

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

#### 5.1.1 DOLOČANJE NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA VIRUSA PVY<sup>NTN</sup>-NIB

Krompirjev virus Y<sup>NTN</sup> (PVY<sup>NTN</sup>) je povzročitelj bolezni imenovane PTNRD. Bolezen so v Sloveniji v večjem obsegu opazili leta 1988 in se od takrat širi (Kus, 1992). Zaradi velike škode, ki jo povzročajo različki PVY<sup>NTN</sup> v nasadih krompirja, je pomembno natančno poznavanje virusnega različka. Tako je določitev celotnega nukleotidnega zaporedja genoma slovenskega izolata virusa PVY<sup>NTN</sup>-NIB pomembna, tako s stališča pravilne uvrstitve izolata, kot za preučevanje evolucijske vloge virusnih različkov in za razlaganje njihove virulentnosti.

V prvem delu doktorskega dela smo določili zaporedje celotnega genoma virusa in s pomočjo orodij za analizo nukleotidnih zaporedij primerjali njegovo enakost z ostalimi objavljenimi nukleotidnimi zaporedji. V študijah enakosti smo se odločili, da iz analize primerjave izvzamemo najstarejše znano nukleotidno zaporedje Robaglia in sod. (1989). Objavljeno nukleotidno zaporedje PVY<sup>N</sup> je bilo, na podlagi preliminarnih rezultatov, v določenih delih bolj podobno nukleotidnemu zaporedju izolata PVY<sup>O</sup>-139 kot pa PVY-N605, kar kaže na možnost mešane okužbe vzorca.

Na podlagi dobljenih rezultatov smo ugotovili, da sta PVY<sup>NTN</sup>-NIB in PVY<sup>NTN</sup>-H, glede na primerjavo nukleotidnega zaporedja celotnega genoma, najbolj podobna virusa (99.2%, razlika med genomoma je 77 nukleotidov) (preglednica 10). Deleži posameznih nukleotidov v celotnem genomu so 31% A, 27% U, 23,5% G in 18,5% C, kar je primerljivo z že objavljenimi deleži pri izolatu PVY<sup>NTN</sup>-H. Thole in sod. (1993) so objavili značilna mesta za različke PVY<sup>NTN</sup> znotraj genoma PVY<sup>NTN</sup>-H in isto velja za slovenski izolat (slika 12). Prav tako je potrjeno mesto nukleotida G na poziciji 8611 genoma, ki je

potrjeno pri rekombinacijskih genomih virusa PVY<sup>NTN</sup> (Moravec in sod., 2003) (slika 12) in prisotnost aminokisline K na 400 ter aminokisline E na 419 mestu znotraj proteina Hc-Pro (Tribodet in sod., 2005). V študiji Tribodet in sod. (2005) sta omenjeni aminokislini predlagani kot odgovorni za nastanek nekroz na listih tobaka (slika 13).

Največje razlike med izolatoma PVY<sup>NTN</sup>-NIB in PVY<sup>NTN</sup>-H oziroma najmanjša podobnost (98.0% / 97.4%), se pojavlja na delu genoma, ki kodira protein P1. Protein P1 velja za najbolj variabilen del genoma virusa PVY. Enakost nukleotidnega zaporedja v tem delu genoma izolata PVY<sup>NTN</sup>-NIB z ostalimi izolati je v območju 69.5% – 98.6%. (Urcuqui-Inchima in sod., 2001) (preglednica 10). Nukleotidno zaporedje gena P1 je uporabljeno za različne metode razločevanja posameznih izolatov. Obstaja možnost, da je ta del nukleotidnega zaporedja, ki kodira P1, izpostavljen hitrim genetskim spremembam. Vloga variabilnosti proteina P1 še do danes ni popolnoma pojasnjena in obstaja možnost, da je povezana z geografskim poreklom izolata ter pomeni evolucijsko prednost (Thole in sod., 1993, Weilguny in Singh RP, 1998, Nie in Singh RP, 2002).

Najvišja homologija nukleotidnega zaporedja izolata PVY<sup>NTN</sup>-NIB z ostalimi izolati je na mestu genoma, ki kodira protein NIb in znaša 83.1% – 99.1% (preglednica 10). Protein NIb predstavlja virusno RdRP (Hong in Hunt, 1996). RdRP je potrebna za uspešno replikacijo virusa in zato bi vsaka večja sprememba na tem delu genoma lahko pomenila neaktivnost virusa.

Glede na primerjavo nukleotidnega in aminokislinskega zaporedja celotnega bralnega okvirja je slovenski izolat bolj podoben različku PVY-N605 (93.4% / 97.2%) kot pa različku PVY<sup>O</sup>-139 (87.8% / 91.9%) (preglednica 10). Glede na primerjavo posameznih regij nukleotidnih in aminokislinskih zaporedij genoma lahko opazimo, da je homologija v območju gena P1 in gena Hc-Pro visoka s PVY<sup>N</sup>. V območju gena P3 je homologija višja s PVY<sup>O</sup> (97.0% / 98.6%) napram PVY-N605 (84.6% / 92.6%). Višja homologija s PVY<sup>O</sup>-139 se ohranja v območju 6k1, CI, 6k2 nato pa pride do ponovnega preobrata in višje homologije z virusom PVY-N605 (98.6% / 99.5%) napram PVY<sup>O</sup>-139 (87.3% / 92.3%).

Homologija se nato ohranja skozi CP regijo, kjer pride do ponovnega preobrata na 3' terminalnem delu nukleotidnega zaporedja gena CP in 3'-UTR regije, kjer je višja homologija s PVY<sup>O</sup>-139. Glede na te rezultate lahko zaključimo, da lahko slovenski izolat uvrstimo med rekombinantne izolate, tako kot madžarski izolat PVY<sup>NTN</sup>-H. Že študija Revers in sod. (1996) kaže na-to, da je rekombinacija pogosta v rodu potivirusov. Glais in sod. so leta 2002 ugotovili, da izolat virusa PVY<sup>NTN</sup>-H sodi med izolate, za katere je značilna rekombinantna struktura. Glede na podobnost med izolatom PVY<sup>NTN</sup>-H in PVY<sup>NTN</sup>-NIB lahko še dodatno potrdimo, da je PVY<sup>NTN</sup>-NIB rekombinacijski izolat z več rekombinacijskimi točkami, ki smo jih potrdili s primerjavo z nukleotidnimi zaporedji različkov PVY<sup>O</sup>-139 in PVY-N605. Znane so tri rekombinacijske točke glede na primerjavo nukleotidnega zaporedja in sicer mesto, kjer se genom spremeni iz »N« v »O« (3' terminalni del regije Hc-Pro oziroma 5' terminalna regija P3), mesto, kjer se genom iz »O« spremeni v »N« (5' terminalni del NIa) in mesto, kjer se ponovno iz »N« spremeni v »O« in leži na 3' terminalnem delu gena CP (Glais in sod., 2002) (slika 15). Ena izmed uporabnih metod, ki izkorišča rekombinacijske točke za ločevanje izolatov je »multiplex« RT-PCR metoda z oligonukleotidni začetniki, ki ležijo okrog rekombinacijskih mest v genomu (v regiji Hc-Pro in P3, 6k2 in NIa ter CP in 3'-UTR) (Nie in Singh RP, 2003a).

Glede na primerjavo aminokislinskih zaporedij je mogoče določiti dve rekombinacijski mestni in sicer na N terminalnem delu proteina P3 ter na N terminalnem delu proteina NIa ne pa tudi na C terminalnem delu proteina CP (slika 20). Do sprememb v tem delu genoma prihaja v nukleotidnem zaporedju vendar te spremembe ne pomenijo jasnih sprememb na aminokislinskem nivoju.

Analiza nukleotidnih zaporedij (slika 14) je dejansko razdelila virusne izolate v več skupin in sicer »O« in »N-tip«. V naslednjo skupino spadata PVY<sup>NTN</sup>-H in PVY<sup>NTN</sup>-NIB z genomi, pri katerih se izmenjujeta genoma skupine »O« in »N«. V zadnjo skupino pa bi uvrstili različke kot sta NA-PVY<sup>NTN</sup> Tu 660 in NA-PVY<sup>N</sup>-N-Jg. Oba izolata sta izredno homologna glede na primerjavo nukleotidnih in aminokislinskih zaporedij med seboj in z izolatom PVY-N605 (preglednica 11). Odstotek enakosti med nukleotidnimi zaporedji med

njima je višji (99.0%) kot pa s PVY-N605 (96.4% za NA-PVY<sup>NTN</sup> Tu 660 in 96.5% za NA-PVY<sup>N</sup>-N-Jg). Iz tega lahko sklepamo o geografski povezanosti izolatov NA-PVY<sup>NTN</sup> Tu 660 in NA-PVY<sup>N</sup> N-Jg. Največja različnost nukleotidnega zaporedja obeh izolatov v primerjavi s tipom »N« se pojavlja od 5' terminalnega konca genoma do konca gena Hc-Pro.

Glais in sod. (2002) predlagajo, da bi bila mozaična struktura izolata PVY<sup>NTN</sup>-H lahko odgovorna za nastanek bolezni PTNRD. Vendar študija Nie in Singh RP (2003b) to ovrže glede na objavljeno nukleotidno zaporedje in študijo bolezenskih znamenj, ki jih povzročata izolata NA-PVY<sup>NTN</sup> Tu 660 in NA-PVY<sup>N</sup>-N-Jg. Zanimivo je, da se njun fenotip razlikuje, saj je NA-PVY<sup>NTN</sup> Tu 660 eden izmed povzročiteljev bolezni PTNRD, NA-PVY<sup>N</sup>-N-Jg pa ne. NA-PVY<sup>NTN</sup> Tu 660 nima mozaične strukture genoma torej Nie in Singh RP (2003b) predlagata, da rekombinacijska struktura genoma ni nujno potrebna za razvoj PTNRD. Obstaja možnost, da je za virulentnost različkov in tako za razvoj bolezni PTNRD dovolj že več manjših sprememb v določenih delih genoma. Za razvoj bolezni PTNRD verjetno ni odgovoren le en protein, temveč je razvoj bolezni posledica večih sprememb v večih virusnih proteinih.

Naša študija nakazuje, da bi bilo potrebno za potrditev natančnega vzroka virulentnosti posameznih izolatov opraviti še dodatne študije, ki bi zajemale sistemske analize vloge posameznega dela genoma v razvoju določenega fenotipa virusa, kot so na primer priprave različnih umetnih rekombinantnih virusov (s ciljnimi spremembami v genomu). Tako klasifikacija virusov osnovana na samo določenem delu genoma ne zaobjame celotne informacije o dejanski virulentnosti virusa (Inoue-Nagata in sod., 2001).

Glede na dobljene rezultate lahko zaključimo, da je pri analizi in klasifikaciji izolatov PVY potrebno več analiz in vse prejšnje nomenklature (de Bokx in Huttinga, 1981; van den Heuvel in sod., 1994; Le Romancer in sod., 1994; Boonham in sod., 2002b) morajo biti natančneje opredeljene.

### 5.1.2 DOLOČANJE IZRAŽANJA TRANSGENA

Za določevanje izražanja genov oziroma v našem primeru transgenov, se klasično uporablja več različnih metod, kot je northern prenos ali semi-kvantitativni RT-PCR. V študijah rastlinske biotehnologije, pri procesu transformacije rastlin, je zelo pomembna analiza večih transgenih linij rastlin v zgodnjih razvojnih stadijih. Tako se pojavlja potreba po metodah, ki bi bile hitre, enostavne, natančne in pri katerih bi bila za natančno analizo dovolj že minimalna količina startnega materiala. Northern prenos in semi-kvantitativni RT-PCR sta delno kvantitativni metodi. Pri našem raziskovalnem delu smo vpeljali novo Q-PCR metodo in jo, s stališča natančnosti in občutljivosti, primerjali z northern prenosom (Stanič-Racman, 2002) ter semi-kvantitativno RT-PCR metodo.

Končni rezultati so pokazali, da so vse transformirane linije krompirja, ki so bile pozitivne z northern prenosom, pozitivne tudi z ostalima uporabljenima metodama. Hkrati pa smo zaznali izražanje transgena še v dveh transgenih linijah krompirja (preglednica 20). Relativna ekspresija transgena določena s Q-PCR metodo, je bila v teh dveh transgenih linijah zelo nizka (v liniji 34 3.8% in v liniji 35 3.3%) (preglednica 13, slika 24). Pozitiven rezultat za obe transgeni liniji smo dobili tudi v primeru uporabe semi-kvantitativne RT-PCR metode (preglednica 12).

**Preglednica 20: Primerjava pozitivnih rezultatov analize ekspresije transgena v transgenih linijah krompirja z različnimi metodami (northern prenosom, semi-kvantitativen RT-PCR in Q-PCR).**

Table 20: Comparison of the number of lines where the expression of CP gene was detected obtained by Northern Blot analysis, semi-quantitative RT-PCR and Q-PCR.

	Northern prenos	Semi- kvantitativen	Q-PCR
	RT-PCR		
Število analiziranih linij	14	14	14
Število transgenih linij z zaznavno ekspresijo transgena CP	9	11	11

Dobljen rezultat potrjuje višjo občutljivost metod osnovanih na principu PCR tehnike (Gattei in sod., 1997, Dean in sod., 2002, Fabre in sod., 2003, Wall in Edwards, 2002). Razlika med uporabo Q-PCR metode in semi-kvantitativne RT-PCR metode je v tem, da je natančnost semi-kvantitativne RT-PCR metode odvisna od tega, kako pogosto ustavljamo reakcije tekom PCR protokola. Najbolj natančno analizo bi dosegli s pobiranje vzorcev po vsakem končanem PCR ciklu, vendar je le-to izredno zamudno laboratorijsko delo, povezano z bistvenim povečanjem stroškov analize. Zbiranje vzorcev na manjši interval kot je 5 ciklov, je neekonomično. Tako ima, s stališča primerjave semi-kvantitativne RT-PCR in Q-PCR metode, slednja prednosti zaradi avtomatizacije zbiranja podatkov tekom PCR reakcije. Dodatno pa Q-PCR predstavlja zaprt sistem in je tako preprečena navzkrižna kontaminacija, do katere lahko pride tekom analize produktov PCR na agaroznem gelu. Z uporabo fluorescentne sonde oziroma TaqMan sonde je zagotovljena tudi višja občutljivost same metode.

Metode lahko primerjamo tudi s stališča količine izhodnega materiala, potrebnega za analizo, izkoristka metode in cene. V primeru Q-PCR metode je količina uporabljeni cDNA 250 ng na posamezno reakcijo, kar je 1000X manj kot je potrebno za natančni northern prenos (25 µg celokupne RNA posameznega vzorca). Tako je v primeru Q-PCR, za izolacijo celokupne RNA potrebna dosti manjša količina izhodnega materiala, kot v primeru northern prenosa. Razlika je, da je pri PCR reakcijah pomembna čistost izolirane RNA. Najprimernejše metode za izolacijo RNA so metode, ki temeljijo na uporabi kolon s silikagel membranami. Izkoristek izolacije RNA je nižji in je v povprečju okrog 10 µg, kar je več kot dovolj za analizo z metodami, ki temeljijo na PCR tehniki. S stališča čistosti izolirane RNA, je zelo pomembno, da vsebuje čim manj stranskih produktov, kot so fenolne komponente, ki predstavljajo velik problem pri rastlinskih vzorcih. Vse sekundarne komponente izolacije imajo velik vpliv na učinkovitost pomnoževanja PCR reakcije (Singh M in Singh RP, 1996, Singh RP, 1998, Myslik in Nassuth, 2001). V tem primeru je potrebno uporabljati metode izolacije, ki zagotavljajo visoko čistost izolirane celokupne RNA. V primeru northern prenosa lahko izoliramo celokupno RNA s klasičnimi ekstrakcijskimi metodami (kloroform-fenol), kar je cenovno ugodnejše.

Dobljeni rezultati so nam pokazali, da je vpeljana Q-PCR metoda ponovljiva metoda preko širokega dinamičnega območja, v našem primeru preko 1:10<sup>6</sup> (slika 23) in nam tako omogoča kvantifikacijo zelo majhnih količin tarčnih mRNA, ki jih je nemogoče detektirati z metodami, ki temeljijo na hibridizaciji.

S stališča natančnosti in ponovljivosti, se je Q-PCR metoda najbolje odzivala izmed vseh uporabljenih metod, vendar je potrebno paziti na več kritičnih točk, kot so, rokovanje z izredno majhnimi volumni vzorcev, kontaminacijo z gDNA in učinkovitostjo reverzne transkripcije.

Pri uporabi Q-PCR analiz za natančno kvantifikacijo, je pomembna uporaba referenčnih genov. Endogeni geni oziroma referenčni geni, so geni z nespremenjenim izražanjem, ne glede na stadij vzorca ali tretiranje vzorca. V določenih primerih podatkov o endogenih genih ni na voljo ali pa niso eksperimentalno dokazani (Bustin, 2002). Prav tako je za natančno analizo in kvantifikacijo tarčnega gena pomembno, da je izražanje endogenih kontrol v območju izražanja tarčnih genov. Za čim bolj natančno analizo je potrebno natančno testiranje endogenih kontrol v izbranem eksperimentalnem sistemu. V našem primeru smo se odločili za uporabo zunanje kontrole – *luc* mRNA. *Luc* mRNA smo uporabljali kot kontrolo reverzne transkripcije in hkrati kot referenčni gen za določevanje izražanja transgena. Glede na to, da smo za določevanje izražanja tarčnega gena uporabili zunano kontrolo, je izrednega pomena natančna določitev koncentracije celokupne RNA. V našem primeru smo uporabljali določevanje z RiboGreen barvilom, ki se specifično veže v RNA molekule. Uporaba RiboGreen barvila ima določene prednosti pred spektrofotometričnimi meritvami glede na občutljivost in ponovljivost rezultatov (Bustin, 2005). Razgrajenost izolirane celokupne RNA smo preverili na agaroznem gelu. Zaradi visoke občutljivosti Q-PCR metode, je potrebna izredno velika natančnost pri dodajanju izolirane RNA v reakcijo reverzne transkripcije ter v koraku dodajanja cDNA v Q-PCR reakcijo. Torej je za ponovljivost rezultatov pomembna natančnost pri pipetiranju vzorcev v reakcijo. V našem primeru je bil povprečen standardni odklon med tremi ponovitvami

nizek (0.34 za transgen in 0.23 za zunanjo kontrolo) (preglednica 13).

Za natančno kvantifikacijo izražanja transgena je bila v našem primeru ključnega pomena tudi odstranitev gDNA, ki predstavlja kontaminacijo izolirane celokupne RNA. Koraku odstranjevanja gDNA se je moč izogniti v primerih, ko je mogoče načrtovati sondo ali oligonukleotidne začetnike na meji eksonov testiranega gena. Tak sistem omogoči natančno detekcijo le specifičnih tarčnih mRNA in ne detektira nukleotidnega zaporedja odgovarjajočega gena na DNA. V našem primeru je transgen dejansko gen virusa. Virusni geni so brez intronov in za natančno analizo rezultatov je potrebno predhodno tretiranje z encimom DNaze I. Pred korakom tretiranja z encimom DNazo I je potrebna predhodna optimizacija količine dodanega encima. Dodana količina encima mora popolnoma odstraniti ostanke gDNA hkrati pa ne sme poškodovat izolirane RNA. Preverjanje uspešnosti tretiranja vzorcev z DNazo I lahko preverimo na agaroznem gelu ali s Q-PCR negativno metodo.

Ponovljivost in robustnost Q-PCR metode za detekcijo izražanja transgena smo še dodatno potrdili s testiranjem izražanja transgena v transgenih rastlinah tobaka. Glede ponovljivosti in učinkovitosti smo, kljub drugemu matriksu, dobili enako kvalitetne rezultate. Rezultati končne analize kažejo, da bi bila metoda primerna za dokazovanje izražanja tudi drugih genov oziroma transgenov in bi jo lahko uporabili tudi na drugih rastlinskih vrstah.

### 5.1.3 MEHANIZEM UTIŠANJA GENOV

Mehanizem, poznan pod imenom utišanje genov, je splošno poznan fenomen v evkariontskem svetu in igra pomembno vlogo v različnih bioloških procesih (obramba pred virusi, zaščita genoma in razvojna regulacija genske ekspresije) (Baulcombe, 2005). Pri našem raziskovalnem delu smo se osredotočili predvsem na njegovo vlogo v obrambi pred tujimi nukleinskimi kislinami oziroma obrambi pred virusi.

Tekom večletnega raziskovalnega dela (Demšar, 1998, Štrucl, 2000, Stanič-Racman, 2002) je bilo pripravljenih več transgenih linij krompirja sorte 'Igor', z vnesenim genom za CP virusa PVY<sup>NTN</sup> v funkcionalni ali nefunkcionalni obliki. Transgene linije so bile testirane na okužbo z virusom PVY<sup>NTN</sup>. Štiri transgene linije so se izkazale za odporne, 3 delno odporne in 28 občutljivih. V transgenih linijah ni bilo mogoče dokazati prisotnosti transgenega plaščnega proteina. Vse to je nakazovalo, da za vzpostavitev odpornosti v analiziranih transgenih rastlinah krompirja ni potrebno izražanje transgenega proteina, temveč je za pojav rezistence zadovoljevala že sama prisotnosti virusnih nukleinskih zaporedij (Lindbo in sod., 1993, Dougherty in sod., 1994). V nadalnjih raziskavah je Stanič-Racman (2002) analizirala nivo izražanja transgena. Glede na druge objave (Okamoto in sod., 1996, Han in sod., 1999) se je predvidevalo, da bo nivo transkripta transgena nizek v rezistentnih transgenih linijah in visok v občutljivih transgenih linijah. V naši študiji smo izbrali štiri transgene linije: rezistentno transgeno linijo 34, rezistentno transgeno linijo 35, občutljivo transgeno linijo 16 in občutljivo transgeno linijo 29. Rezultate določanja izražanja transgena (Stanič-Racman, 2002) smo dodatno potrdili z natančnejšo Q-PCR metodo, kjer smo ugotovili, da je nivo izražanja transgena v naših preiskovanih rezistentnih transgenih linijah (liniji 34 in liniji 35) nizek, glede na delno rezistentno linijo 19. Nivo transkripcije transgena v občutljivi liniji 29 je višji od nivoja transkripcije transgena v rezistentnih transgenih linijah, vendar precej nižji glede na delno rezistentno linijo 19 (slika 24). Transkripcije transgena CP v občutljivi transgeni liniji 16

nismo mogli dokazati (rezultati niso prikazani). Smith in sod. (1994 in 1995) so sicer prišli do ugotovitve, da imajo občutljive linije višji nivo transkriptov kot rezistentne linije, v nekaterih primerih pa tudi nizkega nivoja transgenih transkriptov ali transkripta niso mogli detektirali. Predvidevamo lahko, da je pri občutljivi liniji 16 prišlo do transkripcijskega utišanja transgena (TGS), katerega ponavadi povzroči stanje okoliškega kromatina ali ponovitve transgenov (Gallie, 1998). Na ta način je prekinjena ena izmed poti indukcije z RNA posredovane rezistence in zato so lahko te linije občutljive.

Za neposreden dokaz vklopa mehanizma utišanja genov se lahko analizira prisotnost siRNA molekul (Van Houdt in sod., 2003, Sanders in sod., 2004), s čimer sklepamo o načinu delovanja obrambnega mehanizma in faktorjih, ki mehanizem inducijo (Sonoda, 2003). V našem primeru smo testirali tri transgene linije. Dokazali smo prisotnosti siRNA molekul pri transgenih linijah 34 in 35, ne pa tudi pri transgeni liniji 16, kar potrjuje naše hipoteze o vklopu mehanizma v rezistentnih linijah, ne pa tudi v občutljivih (slika 35).

Študije preučevanja mehanizmov utišanja genov so trenutno opravljene s preučevanjem mutant rastlin *Arabidopsis sp.* in tobaka. Rezultati teh študij nam pokažejo vplettenost določenega gena v mehanizem utišanja genov, ne opišejo pa dejanskih sprememb v genskem izražanju ostalih genov v zgodnjem času po okužbi, torej na kakšen način gensko utišanje deluje v rastlini. V študijah mutant so rastline deformirane in končni rezultat analiz je le vplettenost ali nevplettenost določenega gena v določen mehanizem. V naši študiji smo spremljali transgene linije, z mehanizmom utišanja genov usmerjenim proti znanemu virusu oziroma genu. Procese smo želeli spremljati na nivoju spremicanja izražanja genov pri različnih transgenih linijah krompirja, z različnim odzivom na okužbo z virusom PVY<sup>NTN</sup>. Pri analizah smo uporabljali tehnologijo cDNA mikromrež (analiza genskih profilov) in Q-PCR metodo (analiza izražanja treh genov (AGO1, SDE3, SGS3)). Izbrani geni za Q-PCR analize so, glede na predhodne študije mutant rastline *Arabidopsis sp.*, verjetni kandidati v mehanizmu utišanja genov.

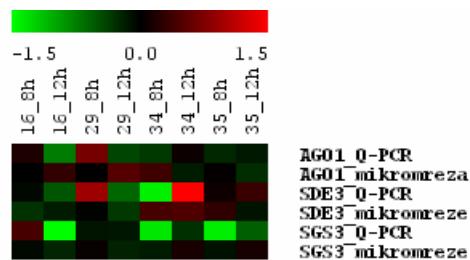
Prva dva izmed preiskovanih genov s Q-PCR analizo sta bila gen SDE3 in gen SGS3, ki

kodirata proteine, ki so odgovorni za nadzor in pomnoževanje dsRNA molekul ter sta del proteinskega kompleksa RdRP. RdRP je sestavljen iz proteina SGS3, proteina SDE1 in proteina SGS2 ter dodatnega proteina SDE3 (Voinnet, 2001). Rastlinski sistem proteinov RdRP je pomemben v stopnji indukcije mehanizma utišanja genov. Transgene RNA prepiše v dsRNA (Sijen in sod., 2001; Dalmay in sod., 2000) in posredno sodeluje pri množenju in širjenju signala PTGS. Naš tretji preiskovani gen je bil AGO1 in predstavlja eno izmed komponent proteinskega kompleksa imenovanega RISC. Proteinski kompleks RISC je odgovoren za razrez tarčne mRNA. Pri rastlinah je bila dokazana aktivnost RISC kompleksa v ekstraktu zarodnih celic žita in v rastlini *Arabidopsis sp.*, vendar natančna identiteta proteinov AGO žal ni poznana (Tang in sod., 2002, Qi in sod., 2005b). V rastlinah *Arabidopsis sp.* in tobaku je vsaj deset različnih AGO proteinov, ki bi lahko sodelovali v mehanizmu utišanja genov. Prvi izmed njih je protein AGO1 (Bohmert in sod., 1998, Carmell in sod., 2002) in je vključen v PTGS (Fagard in sod., 2000). Prav tako so v različnih študijah ugotovili, da imajo proteini kompleksa DICER in proteini družine AGO skupno domeno imenovano PAZ. Proteinska domena PAZ v sistemu DICER naj bi bila odgovorna za prepoznavanje dsRNA molekul (Song in sod., 2004, Yan in sod., 2004, Lingel in sod., 2003). V naših študijah smo se tako osredotočili na dokazovanje izražanja proteinske domene PAZ.

Za detekcijo spremembe izražanja posameznih genov (v štirih točkah vzorčenja po inokulaciji z virusom PVY<sup>NTN</sup>) smo uporabljali nespecifično SYBR Green I kemijsko metodo. V našem primeru smo specifičnost reakcij dodatno potrjevali z analizo amplikonov na poliakrilamidnem gelu (slika 27), s preverjanjem disociacijskih krivulj amplikonov (slika 26) in računanjem povprečnega standardnega odklona Tm amplikonov (preglednica 15). Dodatno smo preverili še nihanje učinkovitosti med posameznimi Q-PCR reakcijami (preglednica 16). Standardni odklon učinkovitosti je bil v vseh primerih uporabe SYBR Green I kemijske metode višji, kot pri uporabi specifične kemijske metode hidrolizirajočih sond (18S rRNA amplikon). Iz dobljenih rezultatov lahko sklepamo, da je nespecifični način detekcije s SYBR Green I manj robustna oblika detekcije za določanje ekspresije genov.

S Q-PCR metodo smo želeli pokazati značilne razlike v izražanju omenjenih genov med transgenimi linijami. Rezultati, ki sicer niso popolni zaradi metodoloških omejitev, nam kažejo podoben trend odgovora transgenih linij glede na odziv na okužbo. Večjo odzivnost in podoben trend izražanja smo opazili pri genih SDE3 in SGS3 pri rezistentnih transgenih linijah glede na občutljivi transgeni liniji. Odzivnost gena AGO1 je bila manj izrazita v primerjavi s SDE3 in SGS3 (slika 28). Pri analizi vseh treh genov se pojavlja sprememba v samem izražanju med biološkimi ponovitvami. Možno je, da je le-to vpliv različnega letnega časa vzorčenja ali različnega cirkadialnega ritma in tako različne odzivnosti analiziranih rastlin. Odzivnost transgenih linij je verjetno pogojena tudi s količino virusa v inokulumu, s katerim okužimo testirane rastline in z uspešnostjo vstopa virusa v rastlinske celice. Rezultati nakazujejo spremenjeno izražanje genov, ki so značilni za mehanizem utišanja genov. Za natančnejše analize pa bi bilo potrebno dodatno analizirati več časovnih točk po inokulaciji. Največjo odzivnost smo izmerili pri 8 in 12 urah po inokulacijah z virusom zato smo se odločili za analizo teh vzorcev (časovnih točk) s cDNA mikromrežami.

Preverjali smo tudi ujemanje rezultatov dobljenih s Q-PCR metodo in cDNA mikromrežami za izbrane gene. Končne rezultate smo predstavili v obliki topotnega grafa. Rezultati za izbrane gene, dobljeni z hibridizacijo cDNA mikromrež, so na meji detekcije ali pod njo, zato je direktna primerjava rezultatov nemogoča. Glede na dobljene rezultate lahko sklepamo, da je Q-PCR metoda veliko občutljivejša kot metoda cDNA mikromrež (slika 36).



**Slika 36: Primerjava s Q-PCR ali s cDNA mikromrežami detektirane ekspresije genov AGO1, SDE3 in SGS3, prikazana v obliki toplotnega grafa.**

Časovne točke vzorčenja 8 ali 12 ur po okužbi z virusom za posamezne linije (16, 29, 34 in 35) s Q-PCR metodo in cDNA mikromrežami.

Figure 36: Comparison of gene expression in the view of heatmap for genes AGO1, SDE3 and SGS3, 8 or 12 hours after inoculation with a virus (lines 16, 29, 34 and 35 by Q-PCR and microarray analysis)

Pri našem raziskovalnem delu smo uporabili tudi tehnologijo mikromrež, ki je naravnana k detekciji več tisoč tarčnih genov naenkrat (Schena in sod., 1995). Uporaba mikromrež omogoča analizo izražanja celotne populacije genov hkrati. Temelji na primerjavi populacij mRNA poizkusnega in kontrolnega objekta, s hibridizacijo odgovarjajočih populacij cDNA na točkovno nanesene DNA, ki predstavljajo posamezne gene. Kljub visoki zmogljivosti omenjene metode, obstaja več omejitev pri pripravi, hibridizaciji in analizi mikromrež. Problem pri analizi cDNA mikromrež je tudi sama občutljivost metode, predvsem v primeru detekcije genov z nizkim izražanjem (kot se je izkazalo v primeru testiranih genov AGO1, SDE3 in SGS3), ali pri zgodnjem odgovoru rastline, kjer je aktivnih le nekaj celic (Kazan in sod., 2001). Za natančnejše rezultate bi bilo prav tako nujno potrebno izboljšati zanesljivost podatkov, pridobljenih z mikromrežami (Fiehn in sod., 2001).

Končni podatki, ki jih dobimo z analizo mikromrež, so podatki o količini mRNA (transkripcijski nivo izražanja genov), ne pa tudi o tem ali res pride do prepisa odgovarjajoče mRNA v protein. Prav tako rezultati mikromrež ne pokažejo post-translacijskih sprememb, aktivacije ali inaktivacije obstoječih proteinov (Kazan in sod., 2001). Kljub naštetim omejitvam, tehnologija mikromrež edina omogoča analizo celic na nivoju celotnega transkriptoma. Pri našem raziskovalnem delu smo izpeljali uspešne hibridizacije cDNA mikromrež, z ojačanjem fluorescentnega signala z barvili v obliki

dendritov in statistično osnovane analize dobljenih podatkov.

Po končani osnovni analizi smo s statističnim testom analize variance žeeli ugotoviti število značilno različno izraženih genov. Ugotovili smo, da se nekateri geni značilno različno izražajo glede na odziv transgene linije na okužbo. Tako se poveča izražanje določenih genov v občutljivih transgenih linijah (linija 29 in linija 16), kot je na primer BRU1 prekurzor (Müssig in sod., 2002), medtem ko se zniža v rezistentnih linijah (linija 34 in linija 35) ali pa obratno izražanje genov kot je transkripcijski faktor BBF (Yunes in sod., 1998) (slika 32b). Rezultati kažejo, da prihaja med resistentnimi in nerezistentnimi fenotipi, do značilne razlike med izražanjem določenih genov po okužbi z virusom po določenem času, ne glede na genotip posamezne linije. Dodaten dokaz je spreminjanje izražanja med obema odzivoma transgenih linij in časovnimi točkami (slika 32d). Ugotovili smo, da pride do spremembe izražanja na primer pri homologu gena *Dcl2* in sicer do povišanja pri 8 urah po inokulaciji in nadaljnega znižanja pri 12 urah pri občutljivih transgenih linijah in ravno obratnega odziva pri rezistentnih transgenih linijah. Podoben odziv ima tudi gen Avr9/Cf (hitri elicitorski protein 284 paradižnika) (Rowland in sod., 2005). Značilno spremenjeno izražanje smo ugotovili še pri nekaterih genih, ki sodelujejo pri obrambnem mehanizmu rastlin (peroksidaze). Glede na analizo značilno različno izraženih genov med transgenimi linijami smo ugotovili, da je odziv obeh rezistentnih transgenih linij zelo podoben, medtem ko obstajajo razlike med občutljivima transgenima linijama 29 in 16 (slika 32f). Izkazalo se je, da je transgena linija 29 bolj odzivna linija v primerjavi s transgeno linijo 16. Razlike v izražanju nekaterih genov med linijami, ne glede na to, da je odziv na okužbo enak, lahko povežemo z vključevanjem transgenov na različna mesta rastlinskega genoma, z njihovim različnim izražanjem ter njihovim vplivom na izražanje ostalih rastlinskih genov. Primerjava fenotipov in posameznih genotipov glede na točke vzorčenja po okužbi, nam pokaže razlike med odzivom posamezne transgene linije na okužbo po določenem času, kar potrdi naša pričakovanja o različnem odzivu transgenih linij na virus. Iz dobljenih rezultatov lahko sklepamo, da se v vseh transgenih linijah vklopi obrambni mehanizem rastlin, ki pa je lahko v določenih primerih zakasnjen ali pa blokiran. Po pregledu značilno različno izraženih genov smo ugotovili, da pride do spremembe izražanja posameznih proteinskih

domen, ki so deli proteinov, ki sodelujejo pri mehanizmu utišanja genov. Tako lahko ugotovimo značilno spremenjeno izražanje družine encimov helikaz, kamor spada protein SDE3 (Dalmay in sod., 2000) ali pa obvite domene (coiled coil domain), ki je ena izmed proteinskih domen proteina SGS3 (Bateman, 2002) in se značilno spremenjeno izraža glede na odziv transgene linije na okužbo, glede na časovno točko in glede na posamezno transgeno linijo. Iz vseh dobljenih rezultatov lahko sklepamo, da lahko najdemo gene, ki so značilni za razlike v odzivu nerezistentnih in rezistentnih linij na okužbo z virusom, kljub temu pa prihaja do razlik v odzivu posameznih transgenih linij, saj se vsaka izmed preiskovanih transgenih linij odzove na okužbo z virusom nekoliko drugačno. Različen odziv transgenih linij lahko razložimo z različnim število insertov, ki so vključeni na različnih delih rastlinskega genoma. Mesto insercije ni poznano in lahko vpliva na izražanje ostalih rastlinskih genov. Z nadaljnji raziskavami bi bilo potrebno identificirati in okarakterizirati značilne gene, ki so se izražali glede na določene pogoje, poiskati korelacije med njimi in vlogo teh genov v metabolizmu rastline. Spremembe v genskih profilih pa bi bilo potrebno dodatno potrditi s Q-PCR metodo.

S programom Mapman, smo značilno različno izražene gene povezali z njihovo biološko funkcijo. Ugotovili smo, da prihaja do sprememb med transgenimi linijami v izražanju genov, ki so povezani z različnimi biološkimi funkcijami na primer fotosintezo, metabolizmom lipidov, signalizacijo, nastankom sekundarnih metabolitov, sintezo proteinov, stresom. Ugotovili smo, da se pojavi značilna razlika pri primerjavi odziva transgene linije na okužbo (rezistentne in občutljive linije) in med posameznimi transgenimi linijami (linija 16, linija 29, linija 34 in linija 35). Tako pri obeh rezistentnih transgenih linijah (liniji 34 in 35) lahko ugotovimo značilno spremembo v izražanju genov, ki so povezani s stresom rastline, medtem ko tega ne moremo ugotoviti za občutljivi transgeni liniji (liniji 16 in 29). Vsi dani rezultati nam kažejo, da dejansko pride do vklopa obrambnih mehanizmov pri vseh transgenih linijah, vendar je odgovor pri občutljivih linijah spremenjen, zakasnjen ali blokiran.

Prav tako se moramo zavedati, da je odgovor rastline na okužbo omejen in je zato izbira

časovnih točk vzorčenja ključnega pomena za analize. Scheideler in sod. (2002) so sledili spremembam izražanja genov, ki so vključeni v preobčutljivostni odgovor rastlin *A. thaliana* na okužbo z rastlinskim patogenom *Pseudomonas syringae*. Odločili so se za vzorčenje v štirih časovnih točkah v intervalu 24 ur po inokulaciji in znotraj le-teh so zaznali največjo spremembo v genski ekspresiji v časovni točki 24 ur po okužbi. Pri rastlini *Arabidopsis sp.* so prav tako preučevali zgodnji odziv (2 uri po inokulaciji) na okužbo z virusom CMV, kjer je prišlo do spremembe ekspresije v določenih genih, ki so odgovorni za oksidativni proces (Love in sod., 2005). Naše izbrane točke vzorčenja po inokulaciji so bile 4, 8, 12 in 24 ur po inokulaciji z virusom pri vseh vzorcih.

Kritična točka našega poizkusa je prav tako inokulacija testnih rastlin. Kljub temu, da smo potrdili prisotnost virusa PVY<sup>NTN</sup> v inokulumu, ne moremo z gotovostjo potrditi, da je po nanosu virusa na liste rastline, ta res vstopil v rastlinske celice v enakem časovnem okviru. Prav tako ne moremo določiti, koliko ga je zares vstopilo v celice. Razlike med biološkimi ponovitvami so lahko odraz resnične dinamike odgovora rastline na okužbo z virusom. Spremenjeno gensko izražanje, ki nas zanima, se pokaže le v rastlinskih celicah, v katere je dejansko vstopil virus. Dejstvo je tudi, da je nemogoče potrditi vstop virusa v vse celice temveč merimo odziv populacije celic, tako okuženih kot neokuženih z virusom in je odgovor rastline povprečje odziva vseh vzorčenih celic. V tem primeru, bi se bilo smiselno lotiti raziskav na eni sami rastlinski celici okuženi z virusom. Prav te pomanjkljivosti dosedanjih študij vodijo v raziskave genske ekspresije na nivoju ene celice (Liss, 2002; Bengtsson in sod., 2005). Analiza v celicah, v katere je vstopil virus, bi bila mogoča s pomočjo termografije (Chaerly in Van Der Straeten, 2000). Takšna analiza bi nam dala natančnejše odgovore o dejanskih odzivih in spremembah v izražanju genov, ki se pojavijo z okužbo transgenih linij. V nadalnjih študijah bi bilo prav tako smiselno ugotoviti, ali se PTGS vklopi po okužbi z virusom ali je vklopljen ves čas.

Glede na podane rezultate in analizo siRNA molekul lahko ugotovimo, da se je v rezistentnih transgenih linijah (linija 34 in linija 35) vključil mehanizem utišanja genov. Rezultati analize genskih profilov transgenih rastlin s cDNA mikromrežami nam kažejo,

da bi lahko med značilno različno izraženimi geni obstajali tudi kandidati, ki bi bili lahko povezani s samim mehanizmom utišanja genov ter da kljub vključenemu mehanizmu utišanja genov v rezistentnih rastlinah obstajajo še drugi nivoji odgovora na okužbo.

## 5.2 SKLEPI

V prvem delu doktorskega dela smo določili nukleinsko zaporedje celotnega genoma slovenskega izolata krompirjevega virusa Y<sup>NTN</sup>-NIB (PVY<sup>NTN</sup>-NIB). Ugotovili smo, da je slovenski izolat skoraj identičen z izolatom PVY<sup>NTN</sup>-H (99.2%). Tako kot izolat PVY<sup>NTN</sup>-H, tudi slovenski izolat spada v skupino rekombinacijskih nekrotičnih izolatov, kar pomeni, da ima mozaično strukturo. Posamezni deli njegovega genoma so podobni nukleotidnemu zaporedju izolata PVY<sup>N</sup>, drugi pa izolatu PVY<sup>O</sup>.

V drugem delu doktorske naloge smo vpeljali hitro, občutljivo in natančno metodo verižnega pomnoževanja s polimerazo v realnem času (Q-PCR) za detekcijo transkriptov transgenov v transformiranih rastlinah krompirja. Metodo smo primerjali z drugimi poznanimi metodami (semi-kvantitativni RT-PCR). Uspešnost vpeljane metode smo potrdili na transformiranih rastlinah tobaka. Nova metoda je hitra, natančna in občutljiva v primerjavi z drugimi metodami in je primerna za hitro ter natančno analizo izražanja genov in transgenov.

V tretjem delu doktorske naloge smo preučevali mehanizem utišanja genov. Osredotočili smo se na analizo transgenih rastlin krompirja (*Solanum tuberosum L.*) sorte 'Igor'.

V rezistentnih transgenih linijah (liniji 34 in liniji 35) smo potrdili prisotnost siRNA molekul, ki so vodilne molekule mehanizma utišanja genov.

S Q-PCR metodo smo poizkušali ugotoviti spremembe v izražanju genov, za katere je poznano, da so vključeni v mehanizem utišanja genov. Rezultati nakazujejo spremenjeno izražanje genov, ki so značilni za mehanizem utišanja genov med različnimi transgenimi linijami.

Z novo tehnologijo cDNA mikromrež pa smo preučili spremembe v profilu izražanja 10000 genov v občutljivih in rezistentnih transgenih linijah krompirja. Ugotovili smo značilno spremenjeno izražanje genov glede na odziv transgene linije na okužbo z virusom

PVY<sup>NTN</sup> (rezistentne in občutljive linije). Obstaja možnost, da med geni, ki imajo značilno različno spremenjeno izražanje, obstajajo tudi potencialni kandidati, ki bi bili lahko povezani s samim mehanizmom utišanja genov. Z analizo genskih profilov smo ugotovili, da v rezistentnih transgenih linijah, hkrati z RNA posredovano rezistenco, obstajajo tudi drugi nivoji odgovora na okužbo.

## 6 POVZETEK (SUMMARY)

### 6.1 POVZETEK

Nekrotični različek virusa PVY (PVY<sup>NTN</sup>), ki povzroča bolezen obročkasto nekrozo gomoljev krompirja (PTNRD), je razširjen po vsej Evropi. Virus PVY<sup>NTN</sup> zmanjšuje pridelek krompirja bolj kot ostali različki virusa PVY<sup>N</sup> (Kus, 1994).

PVY je genetsko variabilen. Objavljenih je več študij, ki razlagajo, kako spremembe genoma in evolucija vplivajo na njegovo biološko funkcijo. V naši študiji smo določili nukleotidno zaporedje slovenskega izolata PVY<sup>NTN</sup>-NIB in ga primerjali z objavljenimi nukleotidnimi zaporedji. Nukleotidno zaporedje slovenskega izolata je izredno podobno nukleotidnemu zaporedju izolata PVY<sup>NTN</sup>-H (Thole in sod., 1993). Izolat PVY<sup>NTN</sup>-H spada med viruse z mozaično strukturo, kjer so posamezni deli nukleotidnega zaporedja podobni izolatu PVY<sup>N</sup> (Jakab in sod., 1997), drugi pa PVY<sup>O</sup> (Singh M & Singh RP, 1996). Glede na filogenetske študije se je enako izkazalo tudi za slovenski izolat.

S sodobnimi metodami molekularne biologije je mogoč vnos, od povzročitelja bolezni odvisne rezistence, v ekonomsko pomembne kultivarje. Mehanizem rezistence, ki ga predlagajo, je post-transkripcijsko utišanje genov, posredovano s transgeno RNA. Mehanizem utišanja genov (gene silencing) temelji na identičnosti nukleotidnih zaporedij. Naravna vloga RNA utišanja je obramba pred virusi, zaščita genoma in razvojna regulacija genske ekspresije. Osnovni mehanizem utišanja genov vključuje razrez dvojno vijačne RNA (dsRNA) (double-stranded RNA) s proteinom, imenovanim Dicer. Dicer razreže dsRNA v od 21 do 25 nukleotidov dolge kratke RNA molekule (siRNA) (short-interfering RNA). Ena od njih vodi kompleks RISC (RNA Interference Specificity Complex), ki je sestavljen iz argonaut proteinov, do tarčne molekule mRNA. RISC je odgovoren za končno razgradnjo tarčne molekule in končnega utišanja genov tako na transkripcijskem, kot na post-transkripcijskem nivoju (Qi in Hannon, 2005).

Z razvojem novejših, občutljivejših molekularno-bioloških metod je mogoče detektirati izražanje genov, ki sodelujejo pri tem mehanizmu in preučevati razlike v izražanju med različnimi fenotipi (občutljive / rezistentne) rastline.

V našem primeru smo analizirali transgene rastline krompirja (*Solanum tuberosum L.*) sorte 'Igor', ki so bile transformirane in testirane na odpornost proti virusu PVY<sup>NTN</sup>-NIB v predhodnih študijah. Nekatere transgene linije so se izkazale za odporne in nekatere za občutljive (Stanič-Racman, 2002). Kot mehanizem rezistence je bil predpostavljen mehanizem utišanja genov oziroma z RNA posredovana rezistenca.

V prvi fazi smo vpeljali hitro, občutljivo in natančno metodo verižnega pomnoževanja s polimerazo v realnem času (Q-PCR) za detekcijo transkriptov transgenov v transformiranih rastlinah krompirja. Metodo smo primerjali z ostalimi poznanimi metodami. Uspešnost vpeljane metode smo potrdili tudi na transformiranih rastlinah tobaka. Vpeljana metoda je natančna in občutljiva v primerjavi z drugimi metodami. Primerna je za hitro in natančno analizo izražanja genov ter transgenov.

S sodobnimi molekularno-biološkimi metodami mikromrež smo ugotovljali ali obstaja zaznavna razlika v izražanju genov med posameznimi rezistentnimi in občutljivimi transgenimi linijami, po okužbi z virusom PVY<sup>NTN</sup>. Ugotovili smo značilno spremenjeno izražanje genov glede na odziv transgene linije na okužbo z virusom PVY<sup>NTN</sup>. Poleg tega smo z metodo Q-PCR spremajali ostale gene (SGS3, SDE3 in AGO1), za katere je poznano, da so vpleteni v mehanizem post-transkripcijskega utišanja genov. Rezultati nakazujejo spremenjeno izražanje genov med različnimi transgenimi linijami. Prav tako smo potrdili prisotnost siRNA molekul v rezistentnih transgenih linijah in s tem obstoj mehanizma utišanja genov. Z analizo genskih profilov smo še ugotovili, da v rezistentnih rastlinah obstajajo tudi drugi nivoji odgovora na okužbo, vključno s potrjenim mehanizmom utišanja genov.

## 6.2 SUMMARY

Necrotic isolates of *Potato virus Y* (PVY<sup>NTN</sup>), which cause potato tuber necrotic ringspot disease (PTNRD), have become widespread throughout Europe (Kus, 1994). It causes disease problems in many potato cultivars that were previously not affected by other strains of PVY.

PVY has been found to be genetically variable. Several studies report on the effect of genome changes and evolution in relation to its biological properties. In the course of our research work we have reported a sequence of genomic RNA of potato virus Y<sup>NTN</sup>-NIB. A comparison of genome sequence between PVY<sup>NTN</sup>-NIB and the published sequences of other PVY isolates was performed. Slovenian isolate PVY<sup>NTN</sup>-NIB has shown to be almost identical with PVY<sup>NTN</sup>-H isolate (Thole *et al.*, 1993). The PVY<sup>NTN</sup>-H has a recombinant genome; part of genome is similar to PVY<sup>N</sup> (Jakab *et al.*, 1997) and the other part to PVY<sup>O</sup> (Singh M and Singh RP, 1996). The phylogenetic studies had shown the same result for Slovenian isolate.

Genetic engineering allows introduction of pathogen-derived resistance into economically important cultivars. The mechanism of transgenic resistance in these cases was proposed to be a post-transcriptional RNA-mediated gene silencing response (PTGS). The gene silencing mechanism is based on nucleic acid homology. Gene silencing plays important roles in diverse biological processes including developmental regulation and antiviral defence. The key features of RNA silencing include the production of 21-25 nt small RNAs by Dicer from dsRNA and the formation of Argonaut (AGO)-containing RNA-induced silencing complexes (RISCs) that directly carry out gene silencing at the transcriptional or post-transcriptional level (Qi and Hannon, 2005a).

New powerful technologies which are more sensitive are possible to detect the expression

of genes involved in different genetic pathways and compare the differences in expression between the different phenotypes (sensitive / resistant) of plants.

In our study we analyzed the genetically transformed plants of potato (*Solanum tuberosum L.*) cv. Igor. The transgenic lines were transformed with a gene for coat protein of PVY<sup>NTN</sup> virus and tested against PVY<sup>NTN</sup>. In previous studies some of the transgenic potato lines showed resistance and the gene silencing or RNA mediated resistance for transgenic resistance was proposed (Stanič-Racman, 2002).

We have introduced a sensitive, accurate and efficient real-time PCR method (Q-PCR) for quantitative determination of transgenic expression level in transgenic potato plants. The method has been compared to other available methods for gene expression analysis. The efficiency of the Q-PCR assay was confirmed on transgenic tobacco plants. Introduced method is accurate and sensitive in comparison with other used methods. It is useful for detection of gene or transgene expression.

Recently introduced microarray technology, in our case the potato cDNA microarrays, was used to investigate the changes in gene expression in different sensitive and resistant transgenic lines after the inoculation with PVY<sup>NTN</sup>. The different response of different phenotypes was revealed. With a real-time PCR method we detected the genes SGS3, SDE3 and AGO1, which are known to be involved in gene silencing. Results show the variable expression of genes between the transgenic lines. The presence of siRNA molecules in resistant lines was confirmed, which show the presence of gene silencing mechanism. The analysis of gene expression profiling shows that the other defence mechanisms including gene silencing are also involved in resistance mechanism of resistant transgenic lines.

## 7 VIRI

Aaziz R., Tepfer M. 1999. Recombination in RNA viruses and in virus-resistant transgenic plants. *Journal of General Virology*, 80: 1339-1346

Acosta O., Barker H., Mayo M.A. 1999. Prospects for improving virus resistance of potato crops in Colombia by transgenic technology. *Fitopatología Colombiana*, 18, 1: 66-77

Adams M.J., Antoniw J.F., Fauquet C.M. 2005. Molecular criteria for genus and species discrimination within the family *Potyviridae*. *Archives of Virology*, 150: 459-479

Agrios G.N. 1997. Plant pathology. 4<sup>th</sup> ed. London, Academic Press: 479-518

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

Alwine J.C., Kemp D.J., Stark G.R. 1977. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proceedings of National Academy of Sciences USA*, 74: 5350-5354

Aravin A., Tuschl T. 2005. Identification and characterization of small RNAs involved in RNA silencing. *FEBS Letters*, 579, 26: 5830-5840

Arends P., Kus M. 1999. Nasveti za pridelovanje krompirja v Sloveniji. Kranj, Mercator-KŽK Kmetijstvo Kranj d.o.o.:121-130

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: 1-37

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

Bartel D. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116: 281-297

Bateman A. 2002. The SGS3 protein involved in PTGS finds a family. *BioMed Central Bioinformatics*, 3:[ 20]

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=119857>

Baulcombe D.C. 1996. Mechanisms of pathogen-derived resistance to viruses in transgenic plants. *Plant Cell*, 8: 1833-1844

Baulcombe D.C. 2002. DNA events. An RNA microcosm. *Science*, 297, 5589: 2002-2003

Baulcombe D.C. 2004. RNA silencing in plants. *Nature*, 431: 356-363

Baulcombe D.C. 2005. RNA silencing. *Trends in Biochemical Sciences*, 30, 6: 290-293

Beachy R.N., Loesh-Fries S., Turner N. 1990. Coat protein-mediated resistance against virus infection. *Annual Review of Phytopathology*, 28: 451-474

Beczner L., Horvath H., Romahany I., Foster H. 1984. Studies on the aetiology of tuber necrotic ringspot disease in potato. *Potato Research*, 27: 339-352

Bengtsson M., Stahlberg A., Rorsman P., Kubista M. 2005. Gene expression profiling in single cells from the pancreatic islets of Langerhans reveals lognormal distribution of mRNA levels. *Genome Research*, 15, 10: 1388-1392

Berger P.H., Adams M.J., Barnett O.W., Brunt A.A., Hammond J., Hill J.H., Jordan R.L., Kashiwazaki S., Rybicki E., Spence N., Stenger D.C., Ohki S.T., Uyeda I., van Zaayen A., Valkonen J., Vetten H.J. 2005. *Potyviridae*. V: Virus taxonomy, 8<sup>th</sup> Report of the ICTV. Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U., Ball, L.A. (eds.). London, Elsevier/Academic Press: 821-825

Bohmert K., Camus I., Bellini C., Bouchez D., Caboche M., Benning C. 1998. AGO1 defines a novel locus of *Arabidopsis* controlling leaf development. *EMBO Journal*, 17, 1: 170-80

- Boonham N., Walsh K., Preston S., North J., Smith P., Barker I. 2002a. The detection of tuber necrotic isolates of *Potato virus Y*, and the accurate discrimination of PVY<sup>O</sup>, PVY<sup>N</sup> and PVY<sup>C</sup> strains using RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, 102: 103-112
- Boonham N., Walsh K., Hims M., Preston S., North J., Barker I. 2002b. Biological and sequence comparisons of Potato virus Y isolates associated with potato tuber necrotic ringspot disease. *Plant Pathology*, 51, 2: 117-126
- 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*, 10, 2: 181-187
- Brodmann P.D., Ilg E.C., Berthoud H., Herrmann A. 2002. Real-time quantitative polymerase chain reaction methods for four genetically modified maize varieties and maize DNA content in food. *Journal of AOAC International*, 85, 3: 646-653
- Bruvoll T. 2006. Microarrays. Trondheim, Norwegian University of Science and Technology, Department of Chemistry, 15.01.2006,  
<http://phys.chem.ntnu.no/~bka/images/MicroArrays.jpg> (jan. 2006): 1 str.
- Bustin S.A. 2005. Real-time, fluorescence-based quantitative PCR: a snapshot of current procedures and preferences. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 5, 4: 493-498
- Bustin S.A. 2002. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology*, 29: 23-39
- Bystricka D., Lenz O., Mraza I., Piherova L., Kmochd S., Sipc M. 2005. Oligonucleotide-based microarray: A new improvement in microarray detection of plant viruses. *Journal of Virological Methods* 128: 176–182
- Carmell M.A., Xuan, Z., Zhang, M.Q. Hannon, G.J. 2002. The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. *Genes & Development*, 16: 2733–2742
- Chaerle L., Van Der Straeten D. 2000. Imaging techniques and the early detection of plant stress. *Trends in Plant Science*, 5, 11, 1: 495-501

Crosslin J. 2005. PVY: What, Where, and Why. Potato Progress, 5, 14: 2-4

Czechowski T., Bari R.P., Stitt M., Scheible W.R., Udvardi M.K. 2004. Real-time RT-PCR profiling of over 1400 *Arabidopsis* transcription factors: unprecedented sensitivity reveals novel root- and shoot-specific genes. Plant Journal, 38, 2: 366-379

Čergan Z., 2000. Infrastrukturna centra Kmetijskega inštituta Slovenije, Raziskovalec. Ljubljana, Ministrstvo za šolstvo in šport. (junij 2000)  
<http://www.mszs.si/slo/ministrstvo/publikacije/znanost/mzt/raziskovalec/2000-1-2/TEMA15.htm> (okt. 2005): 1 str.

Čeřovská N. 1998. Production of monoclonal antibodies to potato virus Y<sup>NTN</sup> strain and their use for strain differentiation. Plant Pathology, 47: 505-509

Dalmay T., Hamilton A., Rudd S., Angell S., Baulcombe D.C. 2000. An RNA-dependent RNA polymerase gene in *Arabidopsis* is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. Cell, 101, 5: 543-53

Dalmay T., Horsefield R., Braunstein T. H., Baulcombe D. C. 2001. SDE3 encodes an RNA helicase required for post-transcriptional gene silencing in *Arabidopsis*. EMBO Journal, 20: 2069-2078

Daròs J.A., Schaad M.C., Carrington J.C. 1999. Functional analysis of the interaction between VPg-proteinase (NIa) and RNA polymerase (NIb) of tobacco etch potyvirus, using conditional and suppressor mutants. Journal of Virology, 73, 10: 8732-8740

Dean J.D., Goodwin P.H., Hsiang T. 2002. Comparison of relative RT-PCR and Northern blot analyses to measure expression of  $\beta$ -1,3-glucanase in *Nicotiana benthamiana* infected with *Collotrichum destructivum*. Plant Molecular Biology Reporter, 20: 347-356

De Bokx J.A., Huttinga H. 1981. Potato virus Y. V: Commonwealth Mycological Institute and Association of Applied Biologists Description of Plant Viruses. Surrey, Commonwealth Mycological Institute: No.242: 6 str.

Demšar T. 1998. Testiranje odpornosti transgenih rastlin tobaka in krompirja na virus PVY<sup>NTN</sup>. Diplomska naloga. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 60 str.

Dolničar P. 1996. Žlahnjenje krompirja v Sloveniji včeraj, danes in jutri. V: Žlahnjenje rastlin in semenarstvo v Sloveniji: strokovno posvetovanje, Ljubljana, 7. marec 1996. Bohanec, B., Zor, T., Luthar, Z. (eds.). Ljubljana, Tiskarna Planprint: 24-28

Dougherty W.G., Lindbo J.A., Smith H.A., Parks T.D., Swaney S., Proebsting W.M. 1994. RNA-mediated virus resistance in transgenic plants: exploitation of a cellular pathway possibly involved in RNA degradation. Molecular Plant-Microbe Interactions, 7, 5: 544-552

Dular M. 2001. Vnos gena za plaščni protein virusa PVY<sup>NTN</sup> v smiselni in protismiselni obliki v rastline tobaka (*Nicotiana tabacum L.*). Diplomska naloga. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 88 str.

Fabre F., Kervarrec C., Mieuzet L., Riault G., Vialatte A., Jacquot E. 2003. Improvement of *Barley yellow dwarf virus*-PAV detection in single aphids using a fluorescent real time RT-PCR. Journal of Virological Methods, 110, 1: 51-60

Fagard M., Boutet S., Morel J.B., Bellini C., Vaucheret H. 2000. AGO1, QDE-2 and RDE-1 encode related proteins required for post-transcriptional gene silencing in plants, quelling in fungi and RNA interference in animals. Proceedings of National Academy of Sciences USA, 97: 11650-11654

Fagard M., Vaucheret H. 2000. (Trans)gene silencing in plants: How many mechanisms? Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 51: 167-194

Fernández A., García J.A. 1996. The RNA helicase CI from plum pox potyvirus has two regions involved in binding to RNA. FEBS Letters, 388: 206-210

Fernández A., Guo H.S., Sáenz P., Simón-Buela L., de Cedrón M.G., García J.A. 1997. The motif V of plum pox potyvirus CI RNA helicase is involved in NTP hydrolysis and is essential for virus RNA replication. Nucleic Acids Research, 25, 22: 4474-4480

Fiehn O., Kloska S., Altmann T. 2001. Integrated studies on plant biology using multiparallel techniques. Current Opinion in Biotechnology, 12, 1: 82-86

Freeman W.M., Walker S.J., Vrana K.E. 1999. Quantitative RT-PCR: Pitfalls and Potential. *BioTechniques*, 26: 112-125

Gattei V., Degan M., De Iuliis A., Rossi F.M., Aldinucci D., Pinto A. 1997. Competitive reverse-transcriptase PCR: a useful alternative to Northern blotting for quantitative estimation of relative abundances of specific mRNA in precious samples. *Biochemical Journal*, 325: 565-567

German M.A., Kandel-Kfir M., Swarzberg D., Matsevitz T., Granot D. 2002. A rapid method for the analysis of zygosity in transgenic plants. *Plant Science*, 164: 183-187

Ginzinger D.G. 2002. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Experimental Hematology*, 30: 503-512

Giulietti A., Overbergh L., Valckx D., Decallonne B., Bouillon R., Mathieu C. 2001. An overview of real-time quantitative PCR application to quantify cytokine gene expression. *Methods*, 25: 386-401

Glais L., Tribodet M., Kerlan C. 2002. Genomic variability in potato potyvirus Y (PVY): evidence that PVY(N)W and PVY(NTN) variants are single to multiple recombinants between PVY(O) and PVY(N) isolates. *Archives of Virology*, 147: 363-378

Glais L., Kerlan C., Tribodet M., Marie-Jeanne Tordo V., Robaglia C., Astier-Manifacier S. 1996. Molecular characterization of potato virus Y<sup>N</sup> isolates by PCR-RFLP. *European Journal of Plant Pathology*, 102: 655-662

Glais L., Tribodet M., Gauthier J.P., Astier-Manifacier S., Robaglia C., Kerlan C. 1998. RFLP mapping of the whole genome of ten viral isolates representative of different biological groups of potato virus Y. *Archives of Virology*, 143: 2077-2091

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

Gregersen P.L., Brinch-Pedersen H., Holm P.B. 2005. A microarray-based comparative analysis of gene expression profiles during grain development in transgenic and wild type wheat. *Transgenic Research*, 14, 6: 887-905

- Hackland A.F., Rybicki E.P., Thomson J.A. 1994. Coat protein-mediated resistance in transgenic plants. *Archives of Virology*, 139, 1-2: 1-22
- Hake S. 2003. MicroRNAs: A role in plant development. *Current Biology*, 13: 851–852
- Hämäläinen J.H., Watanabe K.N., Valkonen J.P.T., Arihara A., Plaisted R.L., Pehu E., Miller L., Slack S.A. 1997. Mapping and marker-assisted selection for extreme resistance to potato virus Y. *Theoretical and Applied Genetics*, 94: 192-197
- Hamilton A., Voinnet O., Chappell L., Baulcombe D.C. 2002. Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *EMBO Journal*, 21, 17: 4671-4679
- 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*, 8: 376-383
- Hari V. 1995. The potyviridae. V: Pathogenesis and host specificity in plant diseases. Histopathological, biochemical, genetic and molecular bases. Volume 3; Viruses and viroids. Singh R.P., Singh U.S., Kohmoto K. (eds.). Oxford, New York, Tokio, Elsevier Science; 1-18.
- Harrington C.A., Rosenow C., Retief J. 2000. Monitoring gene expression using DNA microarrays. *Current Opinion in Microbiology*, 3, 3: 285-291
- Himber C., Dunoyer P., Moissiard G., Ritzenthaler C., Voinnet O. 2003. Transitivity-dependent and -independent cell-to-cell movement of RNA silencing. *EMBO Journal*, 22, 17: 4523-4533
- Holland P.M., Abramson R.D., Watson R., Gelfand D.H. 1991. Detection of a specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of National Academy of Sciences USA*, 88: 7276-7280
- Hong H., Hunt A.G. 1996. RNA polymerase activity catalyzed by a potyvirus-encoded RNA-dependent RNA polymerase. *Virology*, 226: 146–151
- Hull R. 1990. Virus resistant plants - potential and risks. *Chemistry and Industry*, 17: 543-546

- Ingham D.J., Beer S., Money S., Hansen G. 2001. Quantitative real-time PCR assay for determining transgene copy number in transformed plants. *BioTechniques*, 31: 132-140
- Inoue-Nagata A.K., Fonseca M.E.N., Lobo T.O.T.A., de Avila A.C., Monte D.C. 2001. Analysis of the nucleotide sequence of the coat protein and 3'-untranslated region of two Brazilian Potato virus Y isolates. *Fitopatologia Brasileira*, 26, 1: 45-52
- Jacobsen S.E., Running M.P., Meyerowitz E.M. 1999. Disruption of an RNA helicase/RNase III gene in *Arabidopsis* causes unregulated cell division in floral meristems. *Development*, 126: 5231-5243
- Jakab G., Droz E., Brigneti G., Baulcombe D.C., Malnoe P. 1997. Infectious in vivo and in vitro transcripts from full-length c DNA clone of PVY-N605, a Swiss necrotic isolate of potato virus Y. *Journal of General Virology*, 78: 3141-3145
- Jones R.A.C. 1990. Strain group specific and virus specific hypersensitive reactions to infection with potyviruses in potato cultivars. *Annals of Applied Biology*, 117, s. 93-105.
- Kasschau K.D., Carrington J.C. 1998. A counterdefensive strategy of plant viruses: suppression of posttranscriptional gene silencing. *Cell*, 95, 4: 461-70
- Kasschau K.D., Xie Z., Allen E., Llave C., Chapman E.J., Krizan K.A., Carrington J.C. 2003. P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with *Arabidopsis* development and miRNA function. *Developmental Cell*, 4, 2: 205-217
- Kazan K., Schenk P.M., Wilson I., Manners J.M. 2001. DNA microarrays: new tools in the analysis of plant defense responses. *Molecular Plant Pathology*, 2: 177-185
- Klein D. 2002. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends in Molecular Medicine*, 8: 257-260
- Kim Y., Gharaibeh S.M., Stedman N.L., Brown T.P. 2002. Comparison and verification of quantitative competitive reverse transcription polymerase chain reaction (QC-RT-PCR) and real time RT-PCR for avian leucosis virus subgroup J. *Journal of Virological Methods*, 102: 1-8

Kus M. 1994. Krompir. Ljubljana, ČZP Kmečki glas: 107-115

Kus M. 1992. Potato tuber necrotic ringspot disease. Varietal differences in appearance of ringspot symptoms on tubers. V: Proceedings of the virology section meeting of the European Association for Potato Research. 29. jun. – 3. jul., 1992, Vitoria-Gasteiz, Spain. Ritter E., Perez de San Roman C.(eds). Vitoria-Gasteiz, Servicio Central de Publicaciones del Gobierno Vasco : 81-83

Lee Y.S., Nakahara K., Pham J.W., Kim K., He Z., Sontheimer E.J., Carthew R.W. 2004. Distinct roles for Drosophila Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. *Cell*, 117, 1: 69-81

Le Romancer M., Kerlan C., Nedellec M. 1994. Biological characterization of various geographical isolates of potato virus Y inducing superficial necrosis on potato tubers. *Plant Pathology*, 43: 138-144

Le Romancer M., Nedellec M. 1997. Effect of plant genotype, virus isolate and temperature on the expression of the potato tuber necrotic ringspot disease (PTNRD). *Plant Pathology*, 46: 104-111

Leutenegger C.M., Mislin C.N., Sigrist B., Ehrengruber M.U., Hofmann-Lehmann R., Lutz H. 1999. Quantitative real-time PCR for the measurement of feline cytokine mRNA. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 71: 291-305

Li X.H., Valdez P., Olvera R.E., Carrington J.C. 1997. Functions of the tobacco etch virus RNA polymerase (NIb): subcellular transport and protein-protein interaction with VPg/proteinase (NIa). *Journal of Virology*, 71, 2:1598–1607

Lippman Z., Martienssen R. 2004. The role of RNA interference in heterochromatic silencing. *Nature*, 431: 364–370

Lindbo J.A., Silva-Rosalcs L., Probsting W.M., Doughtery W.G. 1993. Induction of the highly specific antiviral state in transgenic plants: Implication for regulation of gene expression and virus resistance. *Plant Cell*, 5: 1749-1759

Lingel A., Simon B., Izaurralde E., Sattler M. 2003. Structure and nucleic acid binding of the Drosophila Argonaute 2 PAZ domain. *Nature*, 426: 465-469

- Liss B. 2002. Improved quantitative real-time RT-PCR for expression profiling of individual cells. *Nucleic Acids Research*, 30, 17: 1-9
- Liu J., Carmell M.A., Rivas F.V., Marsden C.G., Thomson J.M., Song J.J., Hammond S.M., Joshua-Tor L., Hannon G.J. 2004. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science*, 305, 5689:1437-1441
- 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: 402-8
- Louie M. 2000. The role of DNA amplification technology in the diagnosis of infectious diseases. *Canadian Medical Association Journal*, 163, 3: 301-9
- Lovatt A. 2002. Applications of quantitative PCR in the biosafety and genetic stability assessment of biotechnology products. *Journal of Biotechnology*, 82: 279-300
- 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: 935-948
- Mackay I.M. 2004. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clinical Microbiology and Infection*, 10, 3: 190-212
- Mallory A.C., Ely L., Smith T.H., Marathe R., Anandalakshmi R., Fagard M., Vaucheret H., Pruss G., Bowman L., Vance V.B. 2001. HC-Pro suppression of transgene silencing eliminates the small RNAs but not transgene methylation or the mobile signal. *Plant Cell*, 13, 3: 571-583
- Matzke M.A., Birchler J.A. 2005 RNAi-mediated pathways in the nucleus. *Nature Reviews Genetics*, 6, 1: 24-35
- Mestre P., Brigneti G., Baulcombe D.C. 2000. A Ry-mediated response in potato requires the intact active site of the Nla proteinase from potato virus Y. *Plant Journal*, 23: 653-661

Mestre P., Brigneti G., Durrant M.C., Baulcombe D.C. 2003. Potato virus Y Nia protease activity is not sufficient for elicitation of Ry-mediated disease resistance in potato. Plant Journal, 36: 755-761

Mlotshwa S., Voinnet O., Mette M.F., Matzke M., Vaucheret H., Ding S.W., Pruss G., Vance V.B. 2002. RNA silencing and the mobile silencing signal. Plant Cell, 14: 289-301

Moravec T., Cerovska N., Boonham N. 2003. The detection of recombinant, tuber necrosing isolates of *Potato virus Y* (PVY<sup>NTN</sup>) using a three-primer PCR based in the coat protein gene. Journal of Virological Methods, 109: 63-68

Morel J.B., Godon C., Mourrain P., Beclin C., Boutet S., Feuerbach F., Proux F., Vaucheret H. 2002. Fertile hypomorphic ARGONAUTE (ago1) mutants impaired in post-transcriptional gene silencing and virus resistance. Plant Cell, 14, 3: 629-639

Mourrain P., Béclin C., Elmayan T., Feuerbach F., Godon C., Morel J-B., Jouette D., Lacombe A.M., Nikic S., Picault N., Rémoué K., Sanial M., Vo T.A., Vaucheret H. 2000. *Arabidopsis* SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. Cell, 101: 533-542

Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologiae Plantarum, 15: 473-497

Müssig C., Fischer S., Altmann T. 2002. Bassinosteroid-regulated gene expression. Plant Physiology, 129: 1241-1251.

Myslik J.T., Nassuth A. 2001. Rapid detection of viruses, transgenes, and mRNAs in small plant leaf samples. Plant Molecular Biology Reporter, 19: 329-340

Nie X., Singh R.P. 2002. Probable geographical grouping of PVY(N) and PVY(NTN) based on sequence variation in P1 and 5'-UTR of PVY genome and methods for differentiating North American PVY(NTN). Journal of Virological Methods, 16; 103, 2: 145-156

Nie X., Singh R.P. 2003a. Specific differentiation of recombinant PVY<sup>N:O</sup> and PVY<sup>NTN</sup> isolates by multiplex RT-PCR. Journal of Virological Methods, 113, 103, 2: 69-77

- Nie X., Singh R.P. 2003b. Evolution of North American PVY<sup>NTN</sup> strain TU 660 from local PVY<sup>N</sup> by mutation rather than recombination. *Virus Genes*, 26: 39-47
- Nishikura K. 2001. A short primer on RNAi: RNA-directed RNA polymerase acts as a key catalyst. *Cell*, 107, 4: 415-418
- Okamoto D., Nielsen S.V.S., Albrechtsen M., Borkhardt B. 1996. General resistance against potato virus Y introduced into a commercial potato cultivar by genetic transformation with PVY<sup>N</sup> coat protein gene. *Potato Research*, 39: 271-282
- Qi Y., Hannon G.J. 2005. Uncovering RNAi mechanisms in plants: Biochemistry enters the foray. *FEBS Letters*, 579: 5899–5903
- Qi Y., Denli A.M., Hannon G.J. 2005. Biochemical specialization within *Arabidopsis* RNA silencing pathways. *Molecular Cell*, 19, 3: 421-428
- Quackenbush J. 2002. Microarray data normalization and transformation. *Nature Genetics*, 32: 496-501
- Panda S., Sato T.K., Hampton G.M., Hogenesch J.B. 2003. An array of insights: applications of DNA chip technology in the study of cell biology. *Trends in Cell Biology*, 13, 3: 151-156
- Park W., Li J., Song R., Messing J., Chen X. 2002. CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Current Biology*, 12, 17: 1484-1495
- Pfaffl M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29, 9: 2002-2007
- Pham J.W., Pellino J.L., Lee Y.S., Carthew R.W., Sontheimer E.J. 2004. A Dicer-2-dependent 80s complex cleaves targeted mRNAs during RNAi in *Drosophila*. *Cell*, 117, 1: 83-94
- Pompe Novak M. 2002. Razlike v izražanju genov med zdravimi in s krompirjevim virusom Y<sup>NTN</sup> okuženimi rastlinami krompirja (*Solanum tuberosum L.*). Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni podiplomski študij biotehnologije: 240 str.

Powell-Abel P., Nelson R.S., De B., Hoffman N., Rogers S.G., Fraley R.T., Beachy R.N. 1986. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science*, 232: 738-743

Rajamäki M.L., Valkonen J.P.T. 2002. Viral genome-linked protein (VPg) controls accumulation and phloem-loading of a potyvirus in inoculated potato leaves. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 15, 2: 138-149

Reinhart B.J., Weinstein E.G., Rhoades M.W., Bartel B., Bartel D.P. 2002. MicroRNAs in plants. *Genes & Development*, 16, 13: 1616-1626

Rensink W.A., Buell C.R. 2005. Microarray expression profiling resources for plant genomics. *Trends in Plant Science*, 10, 12: 603-609

Revers F., Le Gall O., Candresse T., Le Romancer M., Dunez J. 1996. Frequent occurrence of recombinant potyvirus isolates. *Journal of General Virology*, 77: 1953-1965

Reymond P. 2001. DNA microarrays and plant defence. *Plant Physiology and Biochemistry*, 39: 313-321

Rivas F.V., Tolia N.H., Song J.J., Aragon J.P., Liu J., Hannon G.J., Joshua-Tor L. 2005. Purified Argonaute2 and an siRNA form recombinant human RISC. *Nature Structural & Molecular Biology*, 12, 4: 340-349

Robaglia C., Durand-Tardif M., Tronchet M., Boudazin G., Astier-Manifacier S., Casse-Delbart F. 1989. Nucleotide sequence of potato virus Y (N Strain) genomic RNA. *Journal of General Virology*, 70, 4: 935-947

Ronning C.M., Stegalkina S.S., Ascenzi R.A., Bougri O., Hart A.L., Utterbach T.R., Vanaken S.E., Riedmuller S.B., White J.A., Cho J., Pertea G.M., Lee Y., Karamycheva S., Sultana R., Tsai J., Quackenbush J., Griffiths H.M., Restrepo S., Smart C.D., Fry W.E., Van Der Hoeven R., Tanksley S., Zhang P., Jin H., Yamamoto M.L., Baker B.J., Buell C.R. 2003. Comparative analyses of potato expressed sequence tag libraries. *Plant Physiology*, 131, 2: 419-429

Rosner A., Maslenin L. 1999a. Transcript conformation polymorphism: a novel approach for differentiating PVY<sup>NTN</sup>. *Journal of Phytopathology*, 147: 661-664

- Rosner A., Maslenin L. 1999b. Differentiating PVY<sup>NTN</sup> by unique single-restriction cleavage of PCR products. Potato Research, 42: 215-221
- Rosner A., Maslenin L. 2001. Differentiating PVY NTN from PVY N by annealing RNA transcripts. Journal of Virological Methods, 97: 125-131
- Rosner A., Maslenin L. 2003. Tagging of viral RNA transcripts with strain-specific oligonucleotides: characterization and application. Journal of Virological Methods, 110: 105-109
- Rovere C.V., del Vas M., Hopp H.E. 2002. RNA-mediated virus resistance. Current Opinion in Biotechnology, 13: 167-172
- Rowland o., Ludwig A.A., Merrick C.J., Baillieul F., Tracy F. E., Durrant W.E., Fritz-Laylin L., Nekrasov V., Sjölander K., Yoshioka K., Jones J.D.G. 2005. Functional analysis of *Avr9/Cf-9 Rapidly Elicited* genes identifies a protein kinase, ACIK1, that is essential for full Cf-9-dependent disease resistance in tomato. The Plant Cell, 17: 295-310
- Sáenz P., Cervera M.T., Dallot S., Quiot L., Quiot J.B., Riechmann J.L., García J.A. 2000. Identification of a pathogenicity determinant of *Plum pox virus* in the sequence encoding the C-terminal region of protein P3/6K1. Journal of General Virology, 81: 557-566
- Sanders M., Lannoo N., Maddelein W., Depicker A., Van Montagu M., Cornelissen M., Jacobs J. The preferred route for the degradation of silencing target RNAs in transgenic plants depends on pre-established silencing condition. Nucleic Acid Research, 32, 11: 3400-3409
- Schaad M.C., Jensen P.E., Carrington J.C. 1997. Formation of plant RNA virus replication complexes on membranes: role of an endoplasmic reticulum-targeted viral protein. EMBO Journal, 16, 13: 4049-4059
- Schaart J.G., Salentijn E.M.J., Krens F.A. 2002. Tissue-specific expression of the  $\beta$ -glucuronidase gene in transgenic strawberry (*Fragaria x ananassa*) plants. Plant Cell Reports, 21: 313-319

Schauer S.E., Jacobsen S.E., Meinke D.W., Ray A. 2002. DICER-LIKE1: blind men and elephants in *Arabidopsis* development. Trends in Plant Science, 7, 11: 487-491

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

Scheideler 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

Schenk P.M., Kazan K., Wilson I., Anderson J.P., Richmond T., Somerville S.C., Manners J.M. Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. 2000. Proceedings of National Academy of Sciences USA, 97, 21: 11655-11660

Schmidt M.A., Parrott W.A. 2001. Quantitative detection of transgenes in soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) and peanut (*Arachis hypogaea* L.) by real-time polymerase chain reaction. Plant Cell Reports, 20: 422-428

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, 9: 2615-2625

Shukla D.D., Strike P.M., Tracy S.L., Gough K.H., Ward C.W. 1988. The N and C termini of the coat proteins of potyviruses are surface-located and the N terminus contains the major virus-specific epitopes. Journal of General Virology, 69: 1497-1508

Sijen T., Fleenor J., Simmer F., Thijssen K.L., Parrish S., Timmons L., Plasterk R.H., Fire A. 2001. On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. Cell, 107, 4: 465-476

Silhavy D., Molnar A., Lucioli A., Szittyá G., Hornyik C., Tavazza M., Burgýán J. 2002. A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21- to 25-nucleotide double-stranded RNAs. EMBO Journal, 21, 12: 3070-3080

Silhavy D., Burgýán J. 2004. Effects and side-effects of viral RNA silencing suppressors on short RNAs. Trends in Plant Science, 9, 2: 76-83

Singh M., Singh R.P. 1996. Nucleotide sequence and genome organization of a Canadian isolate of the common strain of potato virus Y (PVY<sup>O</sup>). Canadian Journal of Plant Pathology, 18: 209-214

Singh R.P. 1998. Reverse-transcription polymerase chain reaction for the detection of viruses from plants and aphids. Journal of Virological Methods, 74: 125-138

Singh R.P. 2004. The emergence and spread of PVY<sup>N</sup> (stains and variants) in North America. V: The 12<sup>th</sup> European Association for Potato Research Virology Section Meeting, 13<sup>th</sup> june – 19<sup>th</sup> june, 2004, Reenes, France. Kerlan C., Glais L., Charlet K., Herve B. (eds.). Reenes, European Association for Potato Research: 105 str.

Smith H.A., Swaney S., Parks T.D., Wernsman E.A., Doughtery W.G. 1994. Transgenic plant virus resistance mediated by untranslatable sense RNAs: Expression, regulation, and fate of nonessential RNAs. Plant Cell, 6: 1441-1453

Smith H.A., Powers H., Swaney S., Brown C., Doughtery W.G. 1995. Transgenic Potato Virus Y resistance in potato: Evidence for an RNA-mediated cellular response. Phytopathology, 85: 864-870

Smyth G.K., Yang Y.H., Speed T.P. 2003. Statistical issues in microarray data analysis. V: Functional genomics: methods and protocols. Brownstein M.J., Khodursky A.B. (eds.). Totowa, Humana Press: 111-136

Smyth G.K., Michaud J., Scott H.S. 2005. Use of within-array replicate spots for assessing differential expression in microarray experiments. Bioinformatics, 21, 9: 2067-2075

Spetz C., Valkonen J.P. 2004. Potyviral 6K2 protein long-distance movement and symptom-induction functions are independent and host-specific. Molecular Plant-Microbe Interactions, 17, 5: 502-510

Song P., Cai C.Q., Skokut M., Kosegi B.D., Petolino J.F. 2002. Quantitative real-time PCR as a screening tool for estimating transgene copy number in WHISKERS-derived transgenic maize. Plant Cell Reports, 20: 948-954

Song J.J., Smith S.K., Hannon G.J., Joshua-Tor L. 2004. Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. Science, 305, 5689: 1434-1437

Sonoda S. 2003. Analysis of the nucleocapsid protein gene from Tomato spotted wilt virus as target and inducer for posttranscriptional gene silencing. *Plant Science*, 164: 717-725

Stanič-Racman D., Štrukelj B., Štrucelj R., Demšar T., Reavy B., Barker H., Žel J. 1999. Transformation of *Nicotiana tabacum* cv. Samsun by the coat protein gene of PVY<sup>NTN</sup>. *Phyton*, 39: 271-276

Stanič-Racman D. 2002. Transformacija krompirja sorte 'Igor' za vnos odpornosti proti krompirjevem virusu Y. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni podiplomski študij biotehnologije: 148 str.

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 sequence from an NTN isolate of potato virus Y. *Annals of Applied Biology*, 139: 269-275

Sudarsono, Woloshuk S.L., Xiong Z., Hellman G.M., Wernsman E.A., Weissinger A.K., Lommel S.A. 1993. Nucleotide sequence of the capsid protein cistron from six potato virus Y (PVY) isolates infecting tobacco. *Archives of Virology*, 132: 161-170

Szemes M., Klerks M.M., van den Heuvel J.F.J.M., Schoen C.D. 2002. Development of a multiplex AmpliDet RNA assay for simultaneous detection and typing of Potato Virus Y isolates. *Journal of Virological Methods*, 100: 83-96

Štrucelj R. 2000. Transformacija tobaka *Nicotiana tabacum* cv. Samsun in krompirja *Solanum tuberosum* cv. Igor. Diplomska naloga. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 57 str.

Tang G., Reinhart B.J., Bartel D.P., Zamore P.D. 2002. A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes & Development*, 17, 1: 49-63

Thimm O., Blasing O., Gibon Y., Nagel A., Meyer S., Kruger P., Selbig J., Muller L.A., Rhee S.Y., Stitt M. 2004. MAPMAN: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *Plant Journal*, 37: 914-939

Thole V., Dalmary T., Burgýán J., Balázs E. 1993. Cloning and sequencing of potato virus Y (hungarian isolate) genomic RNA. *Gene*, 123: 149-156

TIGR Gene Index database. NSF Potato Functional Genomics / Solanaceae resources. 2005. Rockville, The Institute for Genomic Research.

<http://www.tigr.org/tdb/potato> (dec. 2005): 1 str.

Tribodet M., Glais L., Kerlan C., Jacquot E. 2005. Characterization of Potato virus Y (PVY) determinants involved in the vein necrosis symptom induced by PVYN isolates in infected *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi. Journal of General Virology, 86: 1-5

Tomari Y., Matranga C., Haley B., Martinez N., Zamore P.D. 2004. A protein sensor for siRNA asymmetry. Science, 306, 5700: 1377-1380

Toplak N. 2000. Testiranje odpornosti transgenih rastlin krompirja (*Solanum tuberosum*) sorte 'Igor' na nekatere viruse krompirja. Diplomska naloga. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 99 str.

Toplak N., Okršlar V., Stanič-Racman D., Gruden K., Žel J. 2004. A high-throughput method for quantifying transgene expression in transformed plants with real-time PCR analysis. Plant Molecular Biology Reporter, 22: 237-250

Urcuqui – Inchima S., Haenni A-L., Bernardi F. 2001. Potyvirus proteins: a wealth of functions. Virus Research, 74: 157-175

Valkonen J.P.T. 1994. Natural genes and mechanism for resistance to viruses in cultivated and wild potato species (*Solanum* spp.). Plant Breeding, 112: 1-16

Valkonen J.P.T. 1997. Novel resistances to four potiviruses in tuber-bearing potato species, and temperature-sensitive expression of hypersensitive resistance to potato virus Y. Annals of Applied Biology, 130: 91-104

Van den Heuvel J.B.J.M., Van der Vlugt R.A.A., Verbeck M., de Haan P.T., Huttinga M. 1994. Characteristic of a resistance –breaking isolate of potato virus Y causing potato tuber necrotic ringspot disease. European Journal of Plant Pathology, 100: 347-356

Van Houdt H., Bleys A., Depicker A. 2003. RNA target sequences promote spreading of RNA silencing. Plant Physiology, 131, 1: 245-253

- Van der Vlugt R.A.A., Leunissen J., Goldbach R. 1993. Taxonomic relationship between distinct Potato Virus Y isolates based on detailed comparisons of the viral coat proteins and 3'-nontranslated regions. *Archives of Virology*, 131: 361-375
- Venkatasubbarao S. 2004. Microarrays--status and prospects. *Trends in Biotechnology*, 22, 12: 630-637
- Voinnet O., 2001. RNA silencing as a plant immune system against viruses. *Trends in Genetics*, 17: 449-459
- Wan J., Dunning F.M., Bent A.F. 2002. Probing plant-pathogen interactions and downstream defense signaling using DNA microarrays. *Functional & Integrative Genomics*, 2, 6: 259-73
- Wall S.J., Edwards D.R. 2002. Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR): a comparison of primer-dropping, competitive, and real-time RT-PCRs. *Analytical Biochemistry*, 300: 269-273
- Waterhouse P.M., Grahm M.W., Wang M.B. 1998. Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proceedings of National Academy of Sciences USA*, 95: 13959-13964
- Waterhouse P.M., Wang M.B., Lough T. 2001. Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature*, 411: 834-842
- Weidemann H.L., Maiss E. 1996. Detection of the potato tuber necrotic ringspot strain of *Potato virus Y* (PVY<sup>NTN</sup>) by reverse transcription and immunocapture polymerase chain reaction. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 103: 337-345
- Weilguny H., Singh R.P. 1998. Separation of Slovenian isolates of PVY<sup>NTN</sup> from the North American isolates of PVY<sup>N</sup> by a 3-primer PCR. *Journal of Virological Methods*, 71: 57-68
- Whitcombe D., Theaker J., Guy S.P., Brown T., Little S. 1999. Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. *Nature Biotechnology*, 17: 804-807

Xie Z., Johansen L.K., Gustafson A.M., Kasschau K.D., Lellis A.D., Zilberman D., Jacobsen S.E., Carrington J.C. 2004. Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. Public Library of Science Medicine, 2, 5: [0642-0652]

<http://medicine.plosjournals.org/perlServ?request=get-document&doi=10.1371/journal.pbio.0020104>

Yan K.S., Yan S., Farooq A., Han A., Zeng L., Zhou M.M. 2003. Structure and conserved RNA binding of the PAZ domain. Nature, 426, 6965: 468-474

Yano A., Kaneko N., Ida H., Yamaguchi T., Hanada N. 2002. Real-time PCR for quantification of *Streptococcus mutans*. FEMS Microbiology Letters, 217: 23-30

Yunes J.A., Vettore A.L., da Silva m.J., Leite A., Arruda P. 1998. Cooperative DNA binding and sequence discrimination by the Opaque2 bZIP factor. Plant Cell, 10: 1941-1956

Zamore P.D. 2004. Plant RNAi: How a viral silencing suppressor inactivates siRNA. Current Biology, 14, 5: 198-200

Zhao Y., Li M.C., Simon R. 2005. An adaptive method for cDNA microarray normalization. BioMed Central Bioinformatics, 6: [1-10]

<http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1471-2105-6-28.pdf>

Žel J. 1996. Specifične metode genske tehnologije pri rastlinah - vnos genov. V: Biotehnologija. Osnovna znanja. Raspor P. (ur.), Ljubljana, Bia: 299–308

## ZAHVALA

Najlepše se zahvaljujem mentorici prof. dr. Jani Žel in somentorci doc. dr. Kristini Gruden, za vse strokovne nasvete, za pomoč pri mojem delu in da sta mi omogočili optimalno izobraževanje ter vedno nudili podporo in razumevanje.

Zahvaljujem se prof. dr. Borutu Štruklju in prof. dr. Borutu Bohancu za natančen pregled dela in koristne nasvete.

Najlepše se zahvaljujem celotnemu kolektivu podjetja Omega d.o.o. za vse prijetne urice, brezčasne pogovore in podporo pri mojem izobraževanju. Posebej hvala dr. Minki Kovač, Mihi Celarcu in Petri Veselič, ki so bili ob meni ko sem jih potrebovala.

Zahvalila bi se dr. Hugh Barkerju za pomoč pri mojem raziskovalnem delu. Posebej bi se zahvalila njegovi družini za vso gostoljublje in pomoč pri mojem bivanju na Škotskem.

Zahvalila bi se še dr. Ann Depicker in kolektivu njenega laboratorija, predvsem Thierry Aelbrechtu, za pomoč pri dokazovanju siRNA ter prijetno delo v Belgiji.

Najlepše se zahvaljujem kolegicam dr. Veroniki Okršlar, Katji Cankar, Ani Grubešič, dr. Ireni Mavrič in kolegu Matjažu Hrenu, ki so mi pomagali, vsak s svojim znanjem in podporo, prebrodit največje težave ter zaplete mojega raziskovalnega dela.

Zahvalila bi se še vsem neimenovanim kolegom v Oddelku za rastlinsko fiziologijo in biotehnologijo na NIBu, ki so vztrajno in prijazno odgovarjali na moja vprašanja in mi vedno pomagali.

Posebej se moram zahvalit še posebnim biologinjam doc. dr. Kristini Gruden, dr. Ireni

Mavrič, dr. Darji Stanič-Racman in dr. Ruth Rupreht, ki so me vsaka na svoj način vpeljale v svet molekularne biologije in me vedno navdajale z optimizmom.

Zahvalila bi se vsem mojim prijateljem, ki jih bom poimenovala od A do Ž, da nobenega ne izpustim, za vse lepe trenutke, podarjene nasmeha, vso podporo, da so me poslušali in bili ob meni ko mi je lepo in ko mi je težko.

Iz vsega srca pa se zahvaljujem moji družini, ki mi vedno stoji ob strani, me vzpodbuja, mi daje neizmerno ljubezen do življenja, zaupanje v ljudi, iskrice v oči in me pusti biti to kar sem. Hvala.