

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Mateja LUMPERT

**VPELJAVA METODE PCR V REALNEM ČASU ZA
RAZISKOVANJE IZRAŽANJA GENA ZA LX RNAZO V PROCESU
ABSCIZIJE PRI PARADIŽNIKU**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**APPLICATION OF THE REAL-TIME PCR METHOD FOR THE LX
RNASE GENE EXPRESSION STUDIES DURING TOMATO LEAF
ABSCISSION**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega dodiplomskega študija mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Raziskovalno delo je bilo opravljeno na Nacionalnem inštitutu za biologijo, na Oddelku za biotehnologijo in sistemsko biologijo v Ljubljani.

Študijska komisija univerzitetnega študija mikrobiologije je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Marina Dermastia, za somentorja dr. Aleša Kladnika in za recenzentko prof. dr. Ines Mandić Mulec.

Mentorica: prof. dr. Marina Dermastia

Somentor: dr. Aleš Kladnik

Recenzentka: prof. dr. Ines Mandić Mulec

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. David STOPAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: prof. dr. Marina DERMASTIA
Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo

Član: dr. Aleš KLADNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Ines MANDIĆ MULEC
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Mateja Lumpert

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 581.148:635.64:575.117(043)=163.6
KG	fiziologija rastlin/ abscizija/odpadanje listov/encimi/LX RNaza/poligalakturonaza TAPG1/poligalakturonaza TAPG4/PCR v realnem času
AV	LUMPERT, Mateja
SA	DERMASTIA, Marina (mentorica)/ KLADNIK, Aleš (somentor)/MANDIČ MULEC, Ines (recenzenka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2010
IN	VPELJAVA METODE PCR V REALNEM ČASU ZA RAZISKOVANJE IZRAŽANJA GENA ZA LX RNAZO V PROCESU ABSCIZIJE PRI PARADIŽNIKU
TD	diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	X, 56 str., 5 pregl., 35 sl., 83 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Abscizija ali odpadanje delov rastline je fiziološki proces, ki je na molekularni ravni zelo slabo raziskan. Splošno je sprejeto, da je abscizija oblika programirane celične smrti (PCS), a raziskav in dokazov za to ni. Predhodne raziskave kažejo, da je v abscizijo vključena ribonukleaza LX (RNaza LX), a kako je prostorsko in časovno razporejena v abscizinskem območju ni znano. V diplomskem delu smo ugotavljali časovno in prostorsko razporeditev izražanja gena za RNazo LX v abscizinskem območju pecelja listov paradižnika, skupaj z genomom za poligalakturonazo TAPG1 in TAPG4, ki naj bi prav tako sodelovali v procesu abscizije. Rezultati raziskave naj bi pomagali potrditi PCS v abscizinskem območju listov paradižnika. Za analizo izražanja genov v specifičnih celicah posebnih tkiv paradižnika smo prilagodili metodo PCR v realnem času. Za raziskavo smo pripravili rastlinski material, prilagodili protokol izolacije RNA majhnim količinam rastlinskega tkiva, načrtovali začetne oligonukleotide za določevanje izražanja <i>RNaze LX</i> , <i>TAPG1</i> in <i>TAPG4</i> ter izvedli reakcijo PCR v realnem času. Dokazali smo, da se po 12-urni indukciji abscizije z etilenom na peceljni strani abscizinskega območja količina transkripta <i>RNaze LX</i> glede na kontrolo ne spremeni, na stebelni strani pa se sedemkrat zmanjša. Po 48 urni indukciji se količina transkripta za <i>RNazo LX</i> na peceljni strani 30-krat poveča v primerjavi s kontrolo, na stebelni strani pa ostane približno enaka kot po 12 urni indukciji. Potrdili smo, da se v procesu abscizije količina poligalakturonaznega transkripta <i>TAPG4</i> poveča bistveno prej kot <i>TAPG1</i> , dokazali pa smo, da je po 48 urni indukciji abscizije z etilenom na peceljni strani količina transkripta <i>TAPG1</i> približno 100-krat, <i>TAPG4</i> pa približno 20-krat večja kot na stebelni strani. Zaključimo lahko, da se v procesu abscizije <i>RNaza LX</i> specifično izraža na peceljni strani abscizinskega območja, izražanje poligalakturonaz <i>TAPG1</i> in <i>TAPG4</i> pa je na peceljni strani bistveno večje kot na stebelni. Vpeljava metode PCR v realnem času za detekcijo izražanja genov v abscizinskem območju listov paradižnika je pomembno prispevala k boljšemu razumevanju abscizije na molekularni ravni. Skupaj z vzporednimi raziskavami smo pokazali, da se abscizinsko območje različno razvija na peceljni in stebelni strani ter da je le peceljna stran povezana s PCS.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 581.148:635.64:575.117(043)=163.6
CX plant physiology/abscission/shedding of leaves/enzymes/LX
RNase/polygalacturonase TAPG1/polygalacturonase TAPG4
AU LUMPERT, Mateja
AA DERMASTIA, Marina (supervisor)/KLADNIK, Aleš (co-advisor)/MANDIĆ
MULEC, Ines (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in
Microbiology
PY 2010
TI APPLICATION OF THE REAL-TIME PCR METHOD FOR THE LX RNASE
GENE EXPRESSION STUDIES DURING TOMATO LEAF ABSCISSION
DT Graduation Thesis (University studies)
NO X, 56 p., 5 tab., 35 fig., 56 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Abscission or shedding of plant parts is a physiological process, which is not well understood at the molecular level. It is generally believed that the abscission is a form of the programmed cell death (PCD), but this has not been studied and proved yet. Preliminary research suggests that ribonuclease LX (RNase LX) is involved in the abscission. However, its spatial and temporal distribution in the abscission zone is not known. The aim of this study was to determine the temporal and spatial expression of genes for RNase LX in the abscission zone of the tomato leaf, together with the expression of genes encoding polygalacturonase TAPG4 and TAPG1, which have also been suggested to be associated with the abscission. To analyze the gene expression in the specific cells and tissues of tomato plants, a method of the real-time PCR was adapted, primers to determine the expression of *RNase LX*, *TAPG1* and *TAPG4* were designed, and the real time PCR was performed. We demonstrated that after 12 hours of inducing abscission with ethylene, the quantity of RNase LX transcript on the leaf side of the abscission zone remained unchanged in comparison with the control. However, on the stem side the quantity of transcript was about seven-times smaller. After 48 hours of ethylene treatment, the amount of transcript for *RNase LX* on the leaf side increased 30-times compared to the control. At the same time, on the stem side the amount of transcript remains approximately the same as after 12 hours of ethylene treatment. We confirmed that in the process of abscission the amount of polygalacturonase transcript *TAPG4* significantly increased sooner than transcript of *TAPG1* and we demonstrated that after 48 hours of ethylene treatment the amount of transcript *TAPG1* is about 100-times more abundant on the leaf side than on the stem side. On the other hand, the transcript of *TAPG4* is about 20-times larger on the leaf side than on the stem side. In conclusion, our research indicated that in the process of abscission *RNase LX* was specifically expressed on the leaf side of the abscission zone and that the expression of polygalacturonase *TAPG1* and *TAPG4* on the leaf side of abscission zone is substantially larger than on the stem side. The application of the real time PCR for the detection of gene expression in tomato leaves abscission zones has significantly contributed to better understanding the abscission at the molecular level. Together with our parallel studies we showed that the development of the abscission zone is different on the leaf petiole and stem side and that only the development of the petiole side is associated with PCD.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VII
KAZALO SLIK.....	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
1 UVOD	1
1.1 UTEMELJITEV PREDLAGANE RAZISKAVE	1
1.2 NAMEN DIPLOMSKEGA DELA.....	2
1.3 DELOVNE HIPOTEZE.....	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 SENESCENCA IN ABSCIZIJA.....	3
2.2 ABSCIZINSKO OBMOČJE	3
2.3 PROGRAMIRANA CELIČNA SMRT (PCS)	4
2.4 ETILEN IN AVKSINI.....	6
2.5 PROTEINI V ABSCIZINSKEM OBMOČJU	7
2.5.1 Poligalakturonaze	7
2.5.2 Celulaza.....	8
2.5.3 Ekspanzini	8
2.5.4 Proteini povezani z patogenezo v abscizinskem območju	9
2.5.5 RNaza LX	9
2.6 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO V REALNEM ČASU	11
2.6.1 Metode zaznavanja pomnoženih produktov pri verižni reakciji s polimerazo v realnem času	12
2.6.2 Aparatura za PCR v realnem času.....	13
2.6.3 Oblikovanje začetnih oligonukleotidov.....	14
2.6.4 Analiza podatkov pri PCR v realnem času.....	14
2.6.5 Uporaba metode PCR v realnem času za detekcijo patogenih mikroorganizmov in gensko spremenjenih organizmov	16
3 MATERIAL IN METODE.....	18
3.1 GOJENJE PARADIŽNIKA.....	18
3.2 INDUKCIJA ABSCIZIJE.....	18
3.3 VZORČENJE.....	18
3.3.1 Prva metoda vzorčenja	18

3.3.2	Druga metoda vzorčenja	19
3.3.3	Tretja metoda vzorčenja	19
3.4	HOMOGENIZACIJA VZORCEV	20
3.5	IZOLACIJA CELOKUPNE RNA	20
3.5.1	Izolacija s kompletom RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)	20
3.5.2	Izolacija s kompletom RNeasy Micro Kit (Quiagen)	21
3.6	KONTROLA KAKOVOSTI IZOLIRANE RNA	21
3.6.1	Merjenje koncentracije izolirane RNA	21
3.6.2	Agarozna gelska elektroforeza	22
3.7	OBRATNO PREPISOVANJE RNA ZA PCR V REALNEM ČASU	22
3.8	PCR V REALNEM ČASU	23
3.8.1	Načrtovanje začetnih oligonukleotidov za RNaze LX	23
3.8.2	Načrtovanje začetnih oligonukleotidov za <i>TAPG1</i> in <i>TAPG4</i>	24
3.8.3	Izvedba PCR v realnem času	24
3.8.4	Analiza podatkov	25
4	REZULTATI	27
4.1	PRIPRAVA RASTLINSKEGA MATERIALA	27
4.2	IZRAŽANJE GENA <i>RNaze LX</i>	33
4.3	IZRAŽANJE POLIGALAKTURONAZNIH GENOV <i>TAPG1</i> in <i>TAPG4</i>	38
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	43
5.1	RAZPRAVA	43
5.1.1	Indukcija abscizije	43
5.1.2	Izolacija RNA	43
5.1.3	Izražanje gena <i>RNaze LX</i>	44
5.1.4	Izražanje genov <i>TAPG1</i> in <i>TAPG4</i>	45
5.1.5	Abscizija in programirana celična smrt	46
5.2	SKLEPI	50
6	POVZETEK	51
7	VIRI	53
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Meritve koncentracije izolirane RNA iz vzorcev abscizinskega območja listov paradižnika z inštrumentom Nanodrop 1000.	29
Preglednica 2: Meritve koncentracije RNA iz vzorcev abscizinskega območja listov paradižnika z inštrumentom Nanodrop 1000; izolacija s kompletom RNeasy Micro Kit.	30
Preglednica 3: Meritve koncentracije RNA iz vzorcev abscizinskega območja paradižnika z inštrumentom Nanodrop 1000; izolacija s kompletom RNeasy Micro Kit.....	31
Preglednica 4: Meritve koncentracije izolirane RNA iz vzorcev abscizinskega območja listov paradižnika z inštrumentom Nanodrop 1000.	33
Preglednica 5: Meritve koncentracije izolirane RNA iz vzorcev abscizinskega območja najstarejšega lista paradižnika z inštrumentom Nanodrop 1000.....	35

KAZALO SLIK

Slika 1: Lokacija abskizinskega območja pri listu (Addicott, 1982: 23).....	4
Slika 2: Abskizinsko območje lista (Addicott, 1982: 24).....	4
Slika 3: Barvanje abskizinskega območja lista paradižnika z Evans modrim (Lers, 2009).	5
Slika 4: Izražanje poligalakturonaz <i>TAPG1</i> , <i>TAPG2</i> in <i>TAPG4</i> pri abskiziji listov paradižnika. (Kalaitzis in sod. 1997: 1306).....	8
Slika 5: Princip delovanja SYBR green I in TaqMan sonde pri metodi PCR v realnem času (Valasek in Repa, 2005: 153).....	13
Slika 6: Graf pomnoževanja tarčnega zaporedja z metodo PCR v realnem času (Arco, 2004: 217).	15
Slika 7: Vzorčenje abskizinskega območja lista paradižnika.	19
Slika 8: Dve kontrolni rastlini paradižnika z neporezanimi listi (intaktna kontrola- K0) in kontrolna rastlina paradižnika s porezanimi listi po 12h (K12).....	27
Slika 9: Indukcija abskizije listov paradižnika z etilenom.....	27
Slika 10: Rastline paradižnika po indukciji abskizije z etilenom po 12h (E12).	28
Slika 11: Rastline paradižnika po indukciji abskizije z etilenom po 48h (E48).	28
Slika 12: Rastline po indukciji abskizije z etilenom po 48h, vidna je epinastija.....	28
Slika 13: Rastline po indukciji abskizije z etilenom po 48h, primerjava velikosti listnih peceljev.	28
Slika 14: Agarozna gelska elektroforeza izolirane RNA iz vzorcev abskizinskega območja paradižnika s kompletom RNeasy Plant Mini Kit.....	29
Slika 15: Agarozna gelska elektroforeza izolirane RNA iz vzorcev abskizinskega območja listov paradižnika s kompletom RNeasy Micro Kit.....	30
Slika 16: Agarozna gelska elektroforeza izolirane RNA iz vzorcev abskizinskega območja listov paradižnika s kompletom RNeasy Micro Kit (Qiagen).....	31
Slika 17: Agarozna gelska elektroforeza izolirane RNA iz vzorcev abskizinskega območja listov paradižnika.	32
Slika 18: Agarozna gelska elektroforeza izolirane RNA iz vzorcev abskizinskega območja listov paradižnika.	32
Slika 19: Disociacijski krivulji cDNA <i>RNaze LX</i>	33
Slika 20: Vrednosti ΔC_t za stebelno in peceljno stran abskizinskega območja po indukciji abskizije z etilenom po 6 in 12h v tretjem najstarejšem listu na stebelu paradižnika.....	34

Slika 21: Relativno izražanje <i>RNaze LX</i> v stebelnem in peceljnem delu abscizinskega območja tretjega najstarejšega lista paradižnika po indukciji abscizije z etilenom po 6 in 12h v tretjem najstarejšem listu na stebelu glede na kontrolo pred indukcijo (K0).....	34
Slika 22: Agarozna gelska elektroforeza izolirane RNA iz peceljne in stebelne strani abscizinskega območja najstarejšega lista paradižnika.....	36
Slika 23: Agarozna gelska elektroforeza izolirane RNA iz iz peceljne in stebelne strani abscizinskega območja najstarejšega lista paradižnika.....	36
Slika 24: Agarozna gelska elektroforeza izolirane RNA iz peceljne in stebelne strani abscizinskega območja najstarejšega lista paradižnika.....	37
Slika 25: Relativno izražanje <i>RNaze LX</i> v stebelnem in peceljnem delu območja abscizije pri najstarejših listih paradižnika.....	38
Slika 26: Disociacijske krivulje cDNA <i>TAPG1</i>	39
Slika 27: Disociacijske krivulje cDNA <i>TAPG4</i>	40
Slika 28: Prikazane so vrednosti $2^{\exp(-\Delta\Delta Ct)}$ za poligalakturonazna gena <i>TAPG1</i> in <i>TAPG4</i> na stebelni in peceljni strani abscizinskega območja lista paradižnika v porezani kontroli po 12h (K12) in po izpostavitvi rastlin etilenu za 6, 12 ter 48h (E6, E12 in E48).....	42
Slika 29: Prerez območja abscizije pri paradižniku, svetlobni mikroskop (Tušek s sod. 2009).	46
Slika 30: Na stebelni strani območja abscizije lista paradižnika so pri treh do petih nizih celic razvite razvejane plazmodezme, ki so povezane s številnimi Golgijevimi aparati in ER, TEM (Tušek in sod. 2009).....	47
Slika 31: Dobro razvit kloroplast na stebeli strani območja abscizije lista paradižnika, TEM. (Tušek in sod. 2009).....	47
Slika 32: Ameboidno jedro s številnimi kloroplasti na stebelni strani območja abscizije lista paradižnika, TEM. (Tušek in sod. 2009).....	47
Slika 33: Na stebelni strani abscizinskega območja lista paradižnika se z delovanjem poligalakturonaz razgradi osrednja lamela med celicami in te po ločitvi ostanejo nepoškodovane, TEM (Tušek in sod. 2009).	48
Slika 34: Barvanje TUNEL abscizinskega območja lista paradižnika. (Aleš Kladnik, 2009).49	
Slika 35: Dezintegrirani kloroplasti na peceljni strani abscizinskega območja lista paradižnika, TEM (Tušek in sod. 2009).....	49

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

bp	bazni par
cDNA	komplementarna deoksiribonukleinska kislina (angl. complementary deoxyribonucleic acid)
Ct	fluorescenčni prag (angl. threshold cycle)
DEPC	dietil pirokarbinat
dH ₂ O	destilirana voda
DNaza	deoksiribonukleaza
dNTP	2'-deoksinukleozid trifosfat
ER	endoplazmatski retikulum
EDTA	etilendiamonotetraocetna kislina
FAM	6-karboksi-fluorescein
FRET	prenos fluorescenčne resonančne energije (angl. fluorescence resonance energy transfer)
g	gravitacijski pospešek
mRNA	informacijska RNA (angl. messenger RNA)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. polymerase chain reaction)
PCS	programirana celična smrt
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
RNA	ribonukleinska kislina (angl. ribonucleic acid)
RNaza LX	ribonukleaza LX
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TAMRA	karboksi tetrametil rodamin
Tris	2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiol
TEM	transmisijski elektronski mikroskop

1 UVOD

1.1 UTEMELJITEV PREDLAGANE RAZISKAVE

Odpadanje delov rastline ali abscizija je fiziološki pojav, ki ima velik pomen za kmetijstvo pri gojenju prehranskih rastlin in pri shranjevanjem pridelkov. Prezgodnja abscizija cvetov ali mladih plodov zmanjša količino pridelka, pospešitev abscizije pa omogoči strojno obiranje plodov. Pospešena abscizija pa je na drugi strani tudi nezaželen pojav, npr. pri češnjevem paradižniku, ki ga obiramo v grozdih. Prezgodnje odpadanje paradižnikov z grozda med shranjevanjem posledično zmanjšuje kakovost pridelka. Dober nadzor časa in mesta abscizije bi tako imelo velike prednosti pri pridelavi.

Abscizijo bi lahko nadzorovali, če bi poznali potek procesov, ki so odgovorni za ločitev tkiva. Zato so raziskovalci vložili veliko truda v iskanje tarčnih encimov procesa in njihovih regulatorjev. Ugotovili so na primer, da celično steno hidrolizirajo celulaze in poligalakturonaze. Biotehnološka inhibicija teh encimov bi pomenila upočasnitev procesa. V praksi proces nadzorujejo s kemikalijami, povezanimi z rastlinskim hormonskim sistemom. Etilen npr. spodbuja abscizijo, zato ga aplicirajo pred strojnim obiranjem plodov sadnega drevja npr. pri jabolani, češnji in slivi.

Čeprav je abscizija že dolgo poznan pojav, pa je na molekularni ravni zelo slabo raziskana. Za enkrat še ne poznamo vseh encimov in njihovih regulatorjev, ki so vanjo vpleteni. Prav tako niso raziskane interakcije med njimi. Predhodne raziskave kažejo, da sta v odpadanje paradižnikovih listov vključeni programirana celična smrt (PCS) in RNaza LX. Za enkrat pa ni poznano, kako se gen za *RNazo LX* izraža v abscizinskem območju lista in kakšna je dejanska povezava RNaze LX s PCS.

Za analizo izražanja genov je zelo primerna metoda verižne reakcije s polimerazo (PCR) v realnem času, ki omogoča količinsko ovrednotenje mRNA v vzorcih. Metodo na Nacionalnem inštitutu za biologijo uporabljajo za rutinsko diagnostiko različnih bakterij ali izražanja posameznih genov v izolirani RNA, a še ni bila vpeljana za določanje količine specifičnih mRNA v posameznih tkivih paradižnika.

1.2 NAMEN DIPLOMSKEGA DELA

Cilj diplomskega dela je bil ugotoviti, kako se prostorsko in časovno izražajo geni za RNazo LX in poligalakturonazi TAPG1 in TAPG4 v abskizinskem območju listov paradižnika z metodo PCR v realnem času. Za doseg tega cilja smo morali prenesti in prilagoditi obstoječo metodologijo, ki je v laboratoriju Nacionalnega inštituta za biologijo vpeljana za detekcijo različnih patogenih organizmov in za določanje različnih genov pri gensko spremenjenih organizmih, a še ni bila uporabljena za analizo izražanja gena v specifičnih celicah posebnih tkiv paradižnika. Za uporabo metode smo morali pripraviti rastlinski material za izolacijo RNA in načrtovati začetne oligonukleotide za določevanje izražanja *RNaze LX*, *TAPG1* in *TAPG4*.

1.3 DELOVNE HIPOTEZE

Na podlagi dosedanjih raziskav smo pričakovali, da je izražanje genov za RNazo LX in poligalakturonazi TAPG1 in TAPG4 prostorsko in časovno odvisno. Predvidevali smo, da sta abskizija in izražanje *RNaze LX* povezana s procesom programirane celične smrti.

2 PREGLED OBJAV

2.1 SENESCENCA IN ABSCIZIJA

Senescenca ali staranje je zadnje razvojno obdobje med zrelostjo in smrtjo rastline ali njenega dela. Označena je kot visoko organiziran, energijsko zahteven in genetsko nadzorovan proces (Procházková in Wilhelmová, 2007). Poteka lahko na ravni celice, tkiva, organa ali organizma. Na ravni organa je npr. senescenca listov. V tem procesu se spremeni celična zgradba lista, metabolizem in izražanje genov. Najzgodnejša sprememba je propad kloroplasta, asimilacijo ogljika nadomesti katabolizem klorofila, proteinov, lipidov in RNA. Iz celičnega materiala se tako sprostijo hranila, ki jih prevzamejo semena ali drugi rastoči organi rastline (Lim in sod., 2007). Senescenca poteka v več stopnjah, v katerih se mobilizirajo produkti, propadejo komponente, ki vzdržujejo fiziološke funkcije in na koncu sledi abscizija (Procházková in Wilhelmová, 2007).

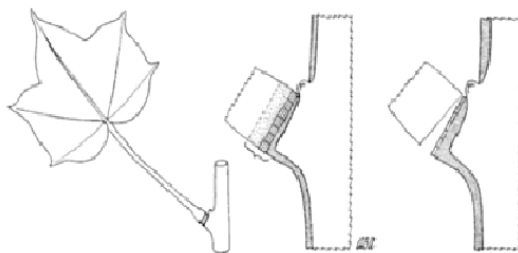
Abscizija je proces, v katerem odpadejo nekateri organi rastline. Je posledica ločitve specializiranih celic v abscizinskem področju. Te in druge rastlinske celice so povezane z adhezivnim matriksom osrednje lamele, ki ga v veliki meri sestavljajo pektini. Pektini rastlini dajejo jakost in trdnost. Organ se loči od rastline, če se med specializiranimi celicami v abscizinskem območju zmanjša adhezija zaradi propada osrednje lamele s hidrolitičnimi encimi (Roberts in sod., 2002). Propad celičnih sten v območju ločitve mora potekati približno sočasno, da je proces abscizije uspešen (Roberts in sod., 2000).

Abscizija je pogosto povezana s senescenco, saj oba procesa sproži veliko istih razvojnih, okoljskih in stresnih dejavnikov. Kljub temu procesov ne smemo zamenjevati. Medtem ko je senescenca povezana s smrtjo organizma ali vsaj enega njenih delov, abscizija zajema odpadanje starih in bolnih organov ter je velikokrat posledica senescence. Vseeno pa v nekaterih primerih abscizija poteče brez senescence (Webster, 1973). Abscizijo listov lahko povzročijo neugodne okoljske razmere kot so ekstremne temperature, zmanjšana količina in kakovost svetlobe, suša, pomanjkanje hranil, ozon, ranitev rastline ter napad patogenov (Taylor in Whitelaw, 2001).

2.2 ABSCIZINSKO OBMOČJE

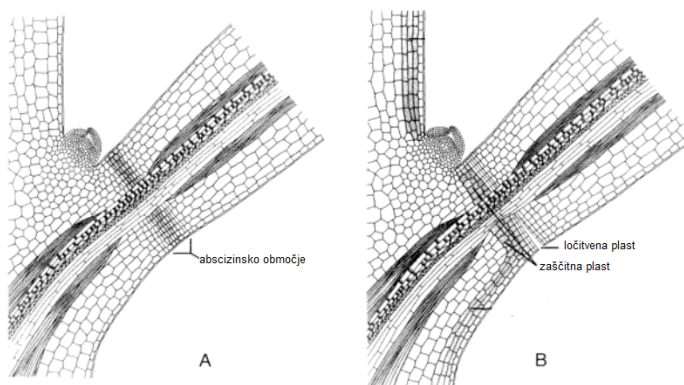
Abscizinsko območje je pri listih na bazi listnega peclja, kjer se ta stika s stebлом (slika 1) (Addicott, 1982). Celice so tu manjše in imajo bolj gosto citoplazmo kot sosednje celice. Ker se v njihove celične stene nalaga manj snovi, kot je lignin, so stene manj trdne (Addicott, 1982). Diferencirajo se zgodaj v razvoju rastline in nato ostanejo dolgo v enakem stanju do abscizije (Taylor in Whitelaw, 2001). V nasprotju z njimi se sosednje

celice povečajo, razvijejo in vsebujejo velike vakuole (Osborne, 1989, cit. po Roberts in sod., 2000).



Slika 1: Lokacija abscizinskega območja pri listu (Addicott, 1982: 23).

Abscizinsko območje (slika 2) sestavljata ločitvena in zaščitna plast. Ločitvena plast je velikokrat debela le en celični sloj (Addicott, 1982). Encimi v ločitveni plasti razgradijo pektine osrednje lamele in hidrolizirajo stensko celulozo. Tik ob ločitveni je zaščitna plast. Sestavljena je iz skupine celic, ki se lahko delijo in območje zapečatijo, vključno z zaprtjem trahejnih elementov. Vse celice na zunanji strani odmrejo in list odpade brez poškodb. Na mestu ločitve lista je na stebelu vidna listna brazgotina (Dermastia, 2007).



Slika 2: Abscizinsko območje lista (Addicott, 1982: 24).

2.3 PROGRAMIRANA CELIČNA SMRT (PCS)

Programirana celična smrt (PCS) je normalna fiziološka oblika smrti. Pri živalih ima pomembno vlogo v razvoju zarodka in kasneje v vzdrževanju tkiv odraslega osebk (Cooper, 2000). PCS je gensko nadzorovan proces, ki selektivno odstrani določene celice. Pri živalih vključuje izgubo medceličnih stikov, skrčenje citoplazme, nastajanje membranskih mehurčkov, fragmentacijo DNA, razdiranje jedra in nastanek apoptotskih teles. Raziskovanje PCS pri živalih se je začelo leta 1972, ko je Kerr s sodelavci predstavil nov pojem apoptoze. Več kot desetletje je bilo potrebno, da so ugotovili biološki pomen apoptoze pri rastlinah. Prav tako kot pri živalih, igra PCS pomembno vlogo pri

številnih vegetativnih in reproduktivnih fazah razvoja rastline, kar vključuje senescenco listov, ksilogenezo, odpadanje cvetnih listov po oploditvi, postembrionalni propad aleuronskih plasti, razvoj koreninske čepice, somatska in zigotna embriogeneza, določanje spola, obrambo rastline pred patogeni s preobčutljivostnim odgovorom (Collazo in sod., 2006). Rastline se odzovejo s PCS tudi na abiotske stresorje: slanost, herbicide, reaktivne kisikove zvrsti, pomanjkanje vode in na visoko ali nizko temperaturo (Palavan-Unsal in sod., 2005). Pri rastlinski in živalski PCS so opazili nekatere podobnosti v morfologiji, transdukcijski poti in signalnih molekulah (Collazo in sod., 2006).

Pri različnih tipih rastlinske PCS so opazili skrčenje celic, kondenzacijo in skrčenje citoplazme, kondenzacijo kromatina, zmanjšanje premera jedra, fragmentacijo DNA (Kladnik in sod., 2004, 2005; Collazo in sod., 2006; Yamada in sod., 2007).

Primer PCS je ksilogeneza ali diferenciacija rastlinskega prevodnega sistema. Trahejni elementi so zgrajeni iz votlih mrtvih celic, ki nastanejo tako, da se po tvorbi sekundarne celične stene razgradi celična vsebina. Na ultrastrukturni ravni so opazili naslednje spremembe: degradacija vakuole, jedra, plastidov, mitohondrijev, endoplazemskega retikla (ER) in na koncu procesa še izguba plazemske membrane in delov celične stene. Pri tem procesu pa ni prišlo do zmanjšana ali skrčitve jedra in fragmentacije. Po uničenju vakuole pride do hitre degradacije jedra. Odkrili so, da so v to verjetno vpletene RNaze, cisteinske in serinske proteaze. Ker so v proces senescence vključene proteaze, RNaze in lipoksigenaze, naj bi bila tudi senescenca oblika PCS (Palavan-Unsal in sod., 2005).

PCS verjetno nastopa v abskiziji cvetnih listov pri nekaterih rastlinskih vrstah, saj so jo že opisali pri ostrožniku *Delphinium belladonna* (Yamada in sod., 2007). Ni pa še popolnoma jasno ali nastopa PCS tudi pri abskiziji listov. V neobjavljeni podatkih (Lers, osebni razgovor) so z barvanjem z Evans modrim za preverjanje živosti celic opazili mrtve celice okoli abskizinske plasti pred potekom abskizije, kar nakazuje na možnost PCS pri abskiziji listov. Opazili so tudi inducirano proteazno in nukleazno aktivnost v abskizinski plasti. To podpira hipotezo o PCS, saj je znano, da so v procese PCS vključene proteaze in nukleaze (Lers in sod., 2006).



Slika 3: Barvanje abskizinskega območja lista paradižnika z Evans modrim (Lers, 2009).

2.4 ETILEN IN AVKSINI

Abscizijo lahko sproži vrsta dejavnikov, splošen odziv nanje pa je zmanjšanje sinteze in transporta hormonov, ki inhibirajo abscizijo (avksini, citokinini), in povečanje količine tistih hormonov, ki so povezani z zmanjšano rastjo in senescenco (etilen in abscizinska kislina). Etilen in avksini so pomembni regulatorji abscizije. Etilen pospešuje proces, avksini ga upočasnjuje (Taylor in Whitelaw, 2001).

Avksini so naravni rastlinski hormoni, ki se transportirajo od celice do celice, od organa do organa, za signalizacijo in koordinacijo rasti ter razvoja. Glavni naravni avksin je indol-3-očetna kislina. Primarno se sintetizira v delečih se meristemskih celicah. Avksin je nujen za delitev celic, asimetrično rast pri fototropizmu in gravitropizmu, apikalni dominanci, razvoju plodov, absciziji, začetku lateralne in naključne rasti korenin, filotaksiji in urejanju žil. Avksin se v rastlinah sintetizira in shranjuje v obliki konjugatov z aminokislinami, proteini in sladkorji (Napier, 2003).

Etilen (C_2H_4) je plinast ogljikovodik in tudi rastlinski hormon, ki ima velik vpliv na rast in razvoj rastlin. Uravnava kalitev semen, rast kalic, abscizijo listov in cvetov, senescenco organov, zorenje plodov, odgovor na stres in patogene. Sintetizira se v nekaj korakih iz celičnih zalog L-metionina. Etilen se z visoko afiniteto veže na svoje receptorje. Signal se prevede v seriji ohranjenih proteinov in na koncu sproži odgovor. Začetek poti prevajanja signala je povsod enak, končni odgovori na etilen pa so različni. Odvisni so od razvojnih, okoljskih, tkivno specifičnih dejavnikov in se močno razlikujejo v kinetiki. Vplivi etilena se lahko pokažejo takoj (npr. inhibicija rasti semenske rastline v 15 minutah) ali pa je zato potrebnih več dni (npr. senescenca listov). Da etilen lahko sproži specifičen odgovor, mora biti pot prevajanja signala povezana in nadzorovana z drugimi potmi. Etilen lahko pospeši abscizijo in senescenco, vendar oba procesa lahko potečeta tudi v odsotnosti etilena (Schaller, 2003).

Po modelu ravnotežja naj bi bila indukcija abscizije odvisna od medsebojnega vpliva koncentracije hormonov in vpliva dejavnikov, ki spremenijo dovzetnost in občutljivost tkiv nanje (Sexton in Trawavas, 1987). Dejavniki, ki povečajo dotok etilena iz oddaljenega organa so oprasitev, senescenca, ranitev, tema, zorenje plodov in ozon. Aktivna rast oddaljenih tkiv in gnojenje povečata dotok avksinov. Dobava etilena in avksinov iz oddaljenih tkiv vpliva na njihovo koncentracijo v abscizinskem območju. Občutljivost tega območja na etilen se poveča npr. s starostjo ali pri vodnem stresu, ki ga sproži obrezovanje. Nižja temperatura in mladostnost zmanjšajo občutljivost na etilen (Sexton in Trawavas, 1987).

Medsebojne vplive etilena in avksinov si pri absciziji listov in cvetov predstavljamo tudi z naslednjim modelom. Med prvo stopnjo je abscizinsko območje občutljivo na avksine in

neobčutljivo na etilen. Prisotnost avksinov zmanjša občutljivost abscizinskega območja na etilen, zato obdelava rastline z etilenom ne sproži abscizije listov ali cvetov. S staranjem preide list ali cvet v drugo stopnjo, v kateri je območje neobčutljivo na avksin in občutljivo na etilen. Zmanjšana količina avksinov ne more več preprečiti abscizije. Posledica je povečana občutljivost na etilen in ta lahko pospeši proces abscizije (Taylor in Whitelaw, 2001). S tem modelom si lahko razložimo opažanje, da najstarejši in najnižji listi na rastlini najhitreje odpadejo (Brown, 1997).

Celice različno zaznavajo hormonske signale in se na njih odzovejo na molekulski in celični ravni. Glede na vpliv avksinov in etilena ločimo tri tipe celic (Taylor in Whitelaw, 2001). Celice tipa 2 so tarčne celice abscizinskega območja in se povečajo kot odgovor na etilen, ne pa na avksine. Celice, ki sestavljajo ostalo telo rastline, so celice tipa 1. Avksini povzročijo njihovo podaljšanje, etilen pa inhibira rast v to dimenzijo, a pospešuje lateralno širjenje celice. Tako avksini in etilen v celicah tipa 2 predstavljajo regulatorni mehanizem velikosti in oblike celic. Celice tipa 3 se povečajo v odgovor na oba hormona.

Ker etilen pospešuje rast specifičnih celic abscizinskega območja in ne njihovih sosed, je možno, da posredno povzroči mehansko silo, nujno za ločitev celic. Pogosto so vidne zaobljene celice v abscizinskem območju, ki se povečajo zaradi turgorja (Brown, 1997).

2.5 PROTEINI V ABSCIZINSKEM OBMOČJU

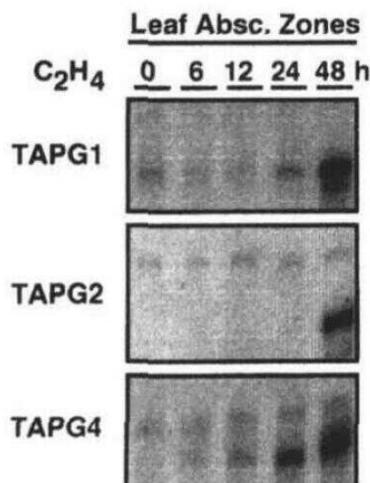
Gene, ki se izražajo med abscizijo in njihove proteinske produkte, uvrščamo v dve skupini. V prvi so geni in proteini, ki so odgovorni za ločitev celic, v drugi skupini pa so geni in proteini, odgovorni za varovanje celic pred patogeni (Roberts in sod. 2000).

2.5.1 Poligalakturonaze

Anatomske študije razpoke, ki nastaja med ločitvijo celic v abscizinskem območju, so privedle do spoznanja, da je primarno mesto ločitve celic osrednja lamela (Roberts in sod., 2000). Ta ugotovitev je spodbudila iskanje encimov, ki razgrajujejo pektine (Roberts in sod., 2000), katerih delež je v osrednji lameli velik (Dermastia, 2007).

Poligalakturonaze so encimi, ki hidrolizirajo pektine. Pri absciziji listov in cvetov paradižnika osrednjo lamelo razgrajujejo poligalakturonaze TAPG1 (Kalaitzis in sod., 1995), TAPG2 in TAPG4 (Kalaitzis in sod., 1997). Podobnost v njihovem aminokislinskem zaporedju je med 76-93 %, medtem ko je podobnost s poligalakturonazo TFGP, ki se izraža v plodovih paradižnika, le 38-41 %. Abscizinske poligalakturonaze se ne izražajo v plodovih, steblih, listnem peclju in prašnikih popolnoma odprtih cvetov.

Verjetno so endopoligalakturonaze. Med abscizijo listov in cvetov paradižnika se *TAPG4* začne izražati veliko prej kot *TAPG1* in *TAPG2* (slika 4). Predpostavljajo, da *TAPG4* sprosti oligosaharide iz celične stene, ki so nato osnova za koordinacijo procesa ločitve v celicah skorje (Kalaitzis in sod., 1997).



Slika 4: Izražanje poligalakturonaz *TAPG1*, *TAPG2* in *TAPG4* pri absciziji listov paradižnika. Iz vzorcev so izolirali RNA, naredili hibridizacijo z označenimi sondami in produkt ločili na poliamidni elektroforezi. Poligalakturonaza *TAPG4* se začne izražati prej kot poligalakturonaza *TAPG1* (Kalaitzis in sod. 1997: 1306).

2.5.2 Celulaza

Celulaza ali β -1,4-glukanaza je bil prvi encim, za katerega so predvidevali vpletenost v razrahljanje celične stene. Odkrili so ga v abscizinskem območju listnega peclja fižola. Etilen je povečal sintezo celulaze, avksini pa so jo zmanjšali. Povečano sintezo β -1,4-glukanaze so odkrili še pri absciziji listov črnega bezga in bombaža (Mishra in sod., 2007), cvetovih paradižnika ter listih in cvetovih paprike. Pri paradižniku so našli že več izoencimov β -1,4-glukanaz (Roberts in sod., 2000).

2.5.3 Ekspanzini

Ekspanzini zrahljajo celično steno med rastjo in zorenjem. Potencialno so vpleteni v degradacijo celične stene pri absciziji. Njihova aktivnost se poveča v abscizinskem območju, če so lističe črnega bezga (*Sambucus nigra*) tretirali z etilenom (Roberts in sod., 2002).

2.5.4 Proteini povezani z patogenezo v abskizinskem območju

Abskizinsko območje predstavlja možno mesto za vdor patogenov, zato rastlina kopiči tam snovi, ki bi jo zaščitile pred njimi (Roberts in sod., 2002). Ko se začne rahljanje celične stene, se v neposredni bližini ločitvene plasti diferencira zaščitna plast. Lahko nastane z nalaganjem lignina in suberina v stene na novo izpostavljenih celic v bližini ločitve, največkrat pa nastane z delitvijo celic. Ta plast predstavlja fizično zaščito. Geni za proteine, ki ščitijo celice pred vdorom mikroorganizmov, se izražajo v neposredni bližini in prav tako oddaljeno od mesta ločitve (Roberts in sod., 2000). Hitinaze in β -1,3 glukanaze naj bi ščitile rastlino pred vdorom gliv in bakterij (Campillo in Lewis, 1991). Pri abskiziji je možno nastajanje reaktivnih kisikovih zvrsti in proteini podobni metalotioninom, ki se povečano izražajo med abskizijo, naj bi rastlino ščitili pred prostimi radikali, ki bi se kopičili v abskizinskem območju. Pri navadnem repnjakovcu so pri abskiziji cvetov odkrili povečano izražanje biosinteznih encimov jasmonske kisline, ki so povezani z obrambo rastline (Roberts in sod., 2002).

2.5.5 RNaza LX

Ribonukleaza LX (RNaza LX) iz češnjevega paradižnika spada v skupino T2 RNaz podobnih S-Rnazam (Köck in sod., 2006). Odkrili so jo skupaj s tremi drugimi intracelularnimi RNazami (RNaze LV 1-3) v celični kulturi paradižnika po fosforjem stradanju. RNaze LV 1-3 so bile lokalizirane v vakuolah, RNaza LX pa zunaj teh organelov, natančne lokacije takrat še niso določili. Izražanje *RNaze LX* in *RNaz LV 1-3* so lahko inducirali s fosforjem stradanjem in zavrli z dodatkom fosforja. Löffler in sod. (1992) menijo, da imajo višje rastline poleg izločanih encimov, ki pridobivajo fosfat iz okolja, tudi intracelularni sistem, ki rešuje izredna stanja pomanjkanja fosfata (Löffler in sod., 1992). Köck in sod. (2006) poročajo, da se *RNaza LX* izraža na koncih glavne in latarelnih korenin med njihovo rastjo, ko rastlini primanjkuje fosfata. Na vršičkih korenin je nameščena v celicah povrhnjice.

Aminokislinsko zaporedje RNaza LX je 60 % podobno zaporedju RNaze LE (Löffler in sod., 1993). RNaza LE je zunajcelična RNaza paradižnika in jo regulira fosfat (Jost in sod., 1991). Inducira jo ranitev rastline (Lers in sod., 1998). RNaza LX ima, za razliko od RNaze LE, na C- koncu zaporedje aminokislin STNDDHDEF (Löffler in sod. 1993). Zadnje štiri aminokisline (peptid HDEF) na C- koncu proteina delujejo kot signal pri zadrževanju proteina v ER pri glivah in rastlinah in omogoči RNazi LX, da se kopiči v ER (Kaletta in sod., 1998; Lehmann in sod., 2001).

RNaza LX se kopiči med kalitvijo v endospermu semena in med senescenco v listih in cvetovih (še posebej v cvetnih listih) paradižnika. Predvidevajo, da se RNaza LX kopiči v

kompartmentih nastalih iz ER in se ob pretrganju membrane sprošča v citoplazmo. Tu naj bi RNaza LX skupaj s proteazami mobilizirala celične makromolekule (ribonukleinske kisline in proteine) med kalitvijo in senescenco. Zaznali so jo tudi v nerazvitih trahejnih elementih, kar nakazuje njeno vlogo pri diferenciaciji ksilema. V tem procesu programirane celične smrti z avtolizo nadzorovano propadajo rastlinske celice in se oblikuje sekundarna stena (Lehmann in sod., 2001).

Lehmann in sod. (2001) predvidevajo, da je uničenje membrane ER ali razdelkov, ki izvirajo iz njega, predpogoj, da RNaza LX lahko razgradi svoj substrat RNA. RNaza LX se že pred lizo celic kopiči v ER, vendar nima vpliva na celico. Domnevajo tudi, da ima RNaza LX fiziološko vlogo v programirani celični smrti (Lehmann in sod., 2001).

Lers in sod. (1998) so ugotovili, da se gena za RNazi LX in LE izraža pri senescenci listov in da se gen za RNazo LX močnejše izraža kot gen za RNazo LE. Majhno izražanje genov za RNaze so opazili pri cvetovih in odrezanih listih z rastline, ki so jim umetno sprožili senescenco. V steblih, koreninah in plodovih so zaznali bazalno izražanje. Etilen je aktiviral izražanje gena *RNaze LX* v mladih odrezanih listih.

Pomembna za razumevanje funkcije RNaze LX je raziskava z gensko spremenjenim paradižnikom, ki je imel s protismiselno tehnologijo inhibiran gen *RNaza LX* (Lers in sod., 2006). Pri teh rastlinah se je v primerjavi z divjim tipom protein, ki ga gen kodira pojavljal le v sledeh. V optimalnih rastnih razmerah se fenotip transgenskih rastlin ni bistveno razlikoval od divjega tipa. Pri fosfornem stradanju pa je za razliko od divjega tipa prišlo do kopičenja antocianov, ki so pokazatelji stresa. Koncentracija klorofila je bila podobna v obeh tipih rastlin. Gen za RNazo LX se izraža v listih med senescenco v bolj pozni stopnji procesa. Pri paradižniku z inhibirano *RNazo LX* sta zakasneni senescenca in abscizija. Rastlinam, ki so rastle v pomanjkanju fosfata, so brez znakov senescence skupaj s kličnimi listi odpadli nekateri listi. To se je zgodilo veliko prej pri divjemu tipu kot pri rastlini z inhibirano *RNazo LX*. Velikokrat so opazili epinastijo, ki je kazala, da so rastline v odgovor na stres sintetizirale veliko etilena. Za etilen je znano, da inducira proces abscizije pri rastlinah. Abscizijo listov so pri mladih rastlinah, ki so rastle v normalnih razmerah, povzročili z odstranitvijo listnih ploskev in izpostavitvijo rastlin etilenu. Listnih ploskev niso odstranili kličnim listom. Odstranitev listnih ploskev je zmanjšala pritok avksinov v listni pecelj in tako pospešila abscizijo le-tega. Opazili so, da so klični listi bolj občutljivi na etilen kot pravi listi, saj so odpadli prej. Pri paradižniku z inhibirano *RNazo LX* je prišlo do zakasnitve in manj odpadanja kličnih listov. V ločenem poskusu, pri katerem so abscizijo povzročili le z odstranitvijo listnih ploskev, so dodatno opazili, da je časovni vzorec abscizije odvisen tudi od namestitve lista. Pri divjem tipu in rastlinah z inhibirano *RNazo LX* so mlajši, višje nameščeni listi s procesom abscizije odpadali kasneje od starejših. Tako je med obema tipoma rastlin s staranjem listov prišlo še do večji razlik v absciziji listnih pecljev. Verjetno je izražanje *RNaze LX* v starejših listih večje, zaradi večje

občutljivosti na etilen. V isti raziskavi so tudi ugotovili, da se gen za RNazo LX izraža v abscizinskem območju zrelih rastlin v listnem peclju in plodu paradižnika, ne pa v abscizinskem območju listnega peclja mladih rastlin. Pri rastlinah z inhibirano *RNazo LX* se v primerjavi z divjim tipom *RNaza LX* skoraj ne izraža in okoliško tkivo vsebuje malo ali nič odgovarjajočega proteina.

Specifična funkcija RNaze LX ni znana. Hipotetično je lahko vpletena v PCS pri absciziji listov, čeprav še ni trdnih dokazov da PCS pri absciziji listov sploh poteče. Nekatere druge RNaze imajo vlogo pri PCS v različnih fizioloških procesih npr. v že omenjeni ksilogenezi, smrti alevronskih celic (Rogers in Rogers, 1999) in v razvoju endosperma (Young in Gallie, 2000). RNaza LX naj bi bila vključena v te procese, saj se izražanje gena, ki jo kodira, poveča med kalitvijo semena in ksilogenezo (Lehmann in sod., 2001).

2.6 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO V REALNEM ČASU

Verižna reakcija s polimerazo v realnem času (PCR v realnem času) temelji na metodi verižne reakcije s polimerazo (PCR), ki jo je razvil Kary Mullis v osemdesetih letih prejšnjega stoletja (Valasek in Repa, 2005). PCR je ena najmočnejših tehnologij v molekularni biologiji (Invitrogen, 2008). Specifičen del DNA lahko pomnožimo z DNA polimerazo in specifičnimi začetnimi oligonukleotidi in tako lahko naredimo več kot milijardo kopij. DNA polimerazi, ki se običajno uporabljata sta termostabilna encima polimerazi DNA *Taq* in *Pfu* (Valasek in Repa, 2005).

PCR reakcijo in PCR v realnem času sestavljajo trije glavni koraki, ki običajno potekajo v 40 ciklih (Invitrogen, 2008). (1) Denaturacija: dvoverižno DNA razklenemo v dve verigi s povišanjem temperature na 95 °C; (2) naleganje: reakcijsko zmes ohladimo, da začetni oligonukleotidi lahko nalegajo na enoverižno DNA matrico. Temperatura naleganja je 5 °C pod temperaturo taljenja začetnih oligonukleotidov (T_m); (3) podaljševanje: DNA polimeraza sintetizira novo verigo in nastane dvoverižna DNA. Aktivnost DNA polimeraze je pri 72 °C optimalna. Hitrost nastajanja nove verige je 100 baznih parov na sekundo.

V vsakem ciklu imamo teoretično dvakrat več produkta kot v predhodnem ciklu. V realnosti to ne drži, ker se po nekaj ciklih med reakcijo reaktanti porabijo in reakcija doseže plato. DNA se učinkovito podvaja samo do platoja, zato ne moremo izračunati začetne količine DNA iz izmerjene količine produkta po 40 ciklih reakcije. Z metodo PCR v realnem času merimo produkt v eksponencialni fazi, ko je pomnoževanje DNA še učinkovito. Meritve produkta so sorazmerne začetni količini DNA, zato PCR v realnem času omogoča kvantifikacijo. Pomnoženo količino DNA merimo po vsakem ciklu s pomočjo fluorescenčnih barvil (Valasek in Repa, 2005). Metoda PCR v realnem času tako

združuje podvojevanje DNA in detekcijo pomnoženih produktov, zato za detekcijo produkta gelska elektroforeza ni več potrebna (Bustin, 2005).

2.6.1 Metode zaznavanja pomnoženih produktov pri verižni reakciji s polimerazo v realnem času

2.6.1.1 Nespecifične metode zaznavanja pomnoženih produktov

Intrekalirajoča barvila so najbolj običajna metoda za detekcijo pomnožene DNA. Absorbirajo svetlobo nižje valovne dolžine in oddajajo svetlobo višje valovne dolžine (slika 5). Njihova fluorescenca se močno poveča pri vezavi na dvovijačno DNA (dsDNA). Intenziteta signala je odvisna od prisotne količine dsDNA. Več kot je dsDNA, večja je fluorescenca (Invitrogen, 2008). Na začetku se je uporabljal etidijev bromid, vendar ga je kmalu zamenjalo barvilo SYBR green I, ker ima večjo afiniteto do dvoverižne DNA (Gachon in sod., 2004). SYBR green I se veže na mali jarek DNA in oddaja tisočkrat večjo fluorescenco kot v raztopini. Barvila, ki se tudi uporabljajo, so BEBO, YOYO-1, TOTO-1 (Valasek in Repa, 2005). Metoda s fluorescentnimi barvili je nespecifična, ker se barvilo veže na dsDNA neodvisno od nukleotidnega zaporedja produkta (Invitrogen, 2008). Večjo specifičnost metode se zagotovi z analizo disociacijske krivulje pomnoženega produkta in določitvijo tališča produkta. V primeru več tališč, pomnoževanje ni bilo specifično in pri reakciji se je pomnoževalo več amplikonov (Valasek in Repa, 2005). Specifičnost procesa lahko preverimo še z gelsko elektroforezo in določevanjem nukleotidnega zaporedja pomnoženega produkta (Gachon in sod., 2004). Prednost nespecifične metode je enostavnost načrtovanja sond in poskusa. Razen dragih aparatov so materialni stroški nizki (Bustin, 2005).

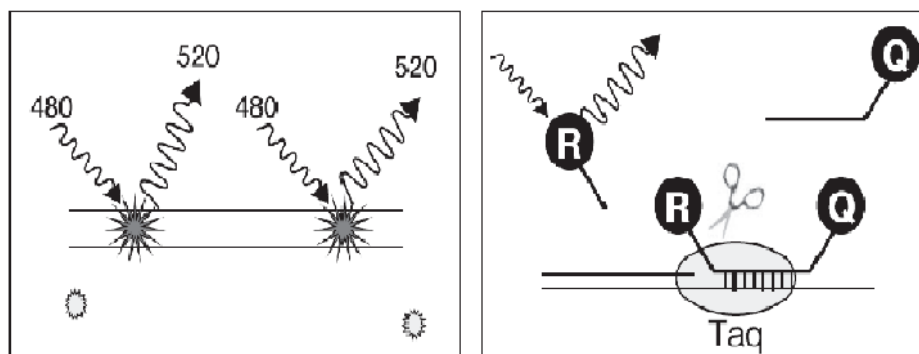
2.6.1.2 Specifične metode zaznavanja pomnoženih produktov

Pri specifičnih metodah zaznavanja imamo poleg dveh začetnih oligonukleotidov v reakciji še sondo, ki se komplemetarno veže s tarčnim zaporedjem med oba začetna oligonukleotida. Sonde so specifične za določeno zaporedje in imajo 5' in 3' konce označene s fluorescentnima barviloma. Na enem koncu ima sonda poročevalec (ang. reporter), na drugem pa dušilec (ang. quencher). Ob vezavi sonde na tarčno zaporedje sta fluorescentni barvili blizu skupaj in dušilec lahko absorbira poročevalski signal. Pojav imenujemo prenos fluorescentne resonančne energije (FRET, fluorescent resonance energy transfer). Energija se prenese od donorskega (poročevalec) k akceptorskemu (dušilec) fluoroforu (Valasek in Repa, 2005). Oddaljenost med fluoroforoma je lahko nekaj nanometrov (Gachon in sod., 2004). Med podaljševanje verige polimeraza DNA z nukleazno aktivnostjo 5' hidrolizira sondo. Barvili sta nato v raztopini dovolj oddaljeni, da

dušilec ne absorbira elektromagnetnega valovanja poročevalca (slika 5). Poročevalski signal lahko tako z detektorji zaznamo iz izmerimo. Fluorescentna barvila, ki se uporabljajo kot dušilci, so TAMRA, DABCYL in BHQ, kot poročevalec pa FAM, VIC, in NED. Te vrste sond se imenujejo hidrolizne sonde, na trgu jo na primer predstavlja sonda TaqMan®. Natančnost metode s hidroliznimi sondami in SYBR green I metode je podobna, prva metoda pa je bistveno bolj specifična, saj izmerimo samo količino produkta sekvenčno specifičnega podvojevanja (Valasek in Repa, 2005).

Na tržišču obstajajo tudi druge metode zaznavanja pomnoženih produktov kot so molekulske svetilke (Molecular Beacons), začetni oligonukleotidi Scorpion. Delujejo podobno kot hidrolizne sonde, torej na osnovi poročevalca in dušilca (Gachon in sod., 2004).

Za vsako tarčno zaporedje je potrebno načrtovati specifične oligonukleotidne začetnike in sondo. Uporaba te metode zaznavanja pomnoženih produktov je ekonomična samo, če se naredi na isti tarči veliko eksperimentov (Gachon in sod., 2004).



Slika 5: Princip delovanja SYBR green I in TaqMan sonde pri metodi PCR v realnem času (Valasek in Repa, 2005: 153).

2.6.2 Aparatura za PCR v realnem času

Za vzbujanje fluorescence imajo naprave različne vire svetlobe kot so laser, diode LED in žarnice (volfram halogenske ali kvarčne volfram halogenske). Detektorski sistem predstavljajo kamera CCD ali fotodiode. Pomemben del aparature je tudi sistem, ki ciklično spreminja in vzdržuje enako temperaturo vseh reakcijskih zmesi (Valasek in Repa, 2005). Hitrost spreminjanja temperature je limitni dejavnik, ki določa trajanje reakcije (Gachon in sod., 2004). Naprave to omogočijo z grelnim blokom, s temperiranim zrakom ali s kombinacijo obeh sistemov (Valasek in Repa, 2005). Light Cycler™ uporablja namesto cevki kapilare, ki jih namesto z grelnim blokom segreje s svetlobo. Čas potreben za segrevanje reakcijske zmesi se občutno zmanjša (iz 15 s na 1-2 s).

2.6.3 Oblikovanje začetnih oligonukleotidov

Izbira dobrih začetnih oligonukleotidov je najbolj pomemben parameter uspešnosti metode PCR v realnem času. Pri oblikovanju začetnih oligonukleotidov je priporočljivo: (1) da je dolžina pomnoženega odseka DNA od 80 do 250 baznih parov; daljši odseki se na pomnožujejo učinkovito; (2) da so začetni oligonukleotidi dolgi od 18 do 24 baznih parov, kar je pomembno za primerno temperaturo naleganja; (3) da so začetni oligonukleotidi specifični za tarčno zaporedje in ne vsebujejo notranjih sekundarnih struktur; (3) da ima par začetnih oligonukleotidov podobno temperaturo taljenja (dovoljena odstopanja so približno 5 °C) in vsebnost GC približno 50 % (Invitrogen, 2008).

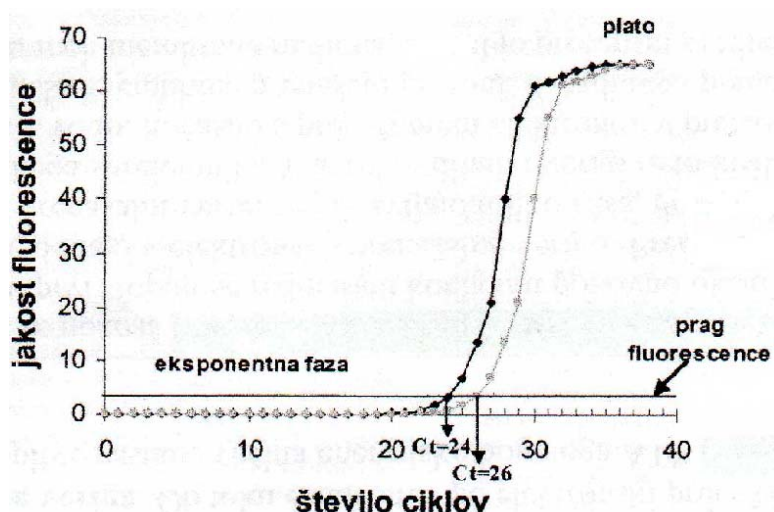
Izbrano zaporedje je potrebno analizirati, da preprečimo komplementarno hibridizacijo na 3' koncu znotraj samega in med začetnimi oligonukleotidi. Na trgu je veliko plačljivih in neplačljivih računalniških programov, ki po svojih algoritmih izračunajo pomembne lastnosti začetnih oligonukleotidov in na ta način ocenijo njihovo ustreznost. Tako uporabniki teh programov lahko izberejo začetne oligonukleotide z dobrimi osnovnimi lastnostmi. Oblikovanje dobrih začetnih oligonukleotidov je še posebej pomembno, ko uporabljamo interkalirajoča barvila kot metodo zaznavanja pomnoženih produktov (Invitrogen, 2008).

2.6.4 Analiza podatkov pri PCR v realnem času

Med potekom reakcije merimo fluorescenco reakcijske zmesi. Če izrišemo krivuljo odvisnosti fluorescence od števila cikla reakcije dobimo graf pomnoževanja, ki prikazuje kopičenje produkta v času (Invitrogen, 2008). Na grafu so vidne tri faze reakcije: bazna linija, eksponentna faza in plato (slika 6). Med fazo bazne linije je fluorescenca produkta nižja od signala ozadja in traja približno 3 do 15 ciklov. Ko akumulacija produkta doseže kritični prag, je fluorescenca produkta večja od ozadja. Fluorescenca nato v eksponentni ali logaritemsko-linearni fazi narašča linearno nekaj naslednjih ciklov. Iz te faze pridobimo podatke potrebne za izračun končnih rezultatov eksperimenta. Med zadnjo plato fazo fluorescenca doseže zgornjo najvišjo vrednost. Reaktantov začne primanjkovati in podvajanje ni več učinkovito. Količina produkta zato ni več proporcionalna začetni količini DNA. Ta faza ni več primerna za pridobivanje podatkov (Wang in sod., 2006).

V analizah rezultatov, pridobljenih s PCR v realnem času, pozitivno reakcijo detektiramo s kopičenjem fluorescenčnega signala. Prag je količina signala, ki kaže na statistično značilno povečanje signala glede na signal bazne linije. Običajno ga inštrumenti samodejno nastavijo na vrednost, ki je desetkrat večja od standardne deviacije vrednosti fluorescence v bazni liniji. Lahko pa je nastavljena ročno na poljubno vrednost. Pražni cikel (ang. threshold cycle, C_t) je cikel, pri katerem fluorescenca preseže nastavljeni prag.

Vrednost C_t je obratno sorazmerna začetni količini DNA (Invitrogen, 2008). To pomeni, da nižja kot je vrednost C_t , več nukleinske kisline je v vzorcu. Pri 40 ciklih pomnoževanja vrednosti C_t , ki so manjše od 29, pomenijo močno pozitivno reakcijo z veliko prisotne tarčne nukleinske kisline; vrednosti med 30 in 37 pomenijo pozitivno reakcijo, z zmerno količino tarčne nukleinske kisline; medtem ko vrednosti med 38 in 40 pomenijo šibko reakcijo, ki lahko nakazuje zelo nizko količino tarčne nukleinske kisline ali celo kontaminiran vzorec.



Slika 6: Graf pomnoževanja tarčnega zaporedja z metodo PCR v realnem času (Arco, 2004: 217).

2.6.4.1 Kvantifikacija

Kvantifikacijsko območje je široko do sedem velikostnih redov. Zato v vzorcu lahko določimo ekstremno nizke in visoke koncentracije tarčne DNA (Gachon in sod., 2004). Poznamo absolutno in relativno kvantifikacijo. Z absolutno kvantifikacijo določimo količino DNA oz. število kopij tarčne DNA v vzorcu (Invitrogen, 2008). Izračunamo jo iz umeritvene krivulje (Gachon in sod., 2004). Z relativno kvantifikacijo pa določimo razliko v izražanju gena v enem vzorcu v primerjavi z drugim.

Matematični model relativne kvantifikacije je $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (t.i. expression ratio) (Livak in Schmittgen, 2001). Vrednost C_t tarčnega gena je normalizirana z vrednostjo C_t referenčnega gena v vzorcu (enačba 2). Izražanje referenčnega gena se med poskusom ne sme spreminjati, ne glede na obdelavo vzorcev. Za referenčne gene so primerni standardni vzdrževalni geni, med katere sodijo *citokrom c oksidaza (COX)*, *β -aktin* in *rRNA*. Predstavljajo endogeno kontrolo, katere namen je izenačitev vzorcev glede na začetno količino DNA v reakciji. V načrt eksperimenta moramo vključiti kalibratorski vzorec, ki ga

največkrat predstavlja neobdelana kontrola. ΔC_t kalibratorskega vzorca uporabimo za izračun vrednosti $\Delta\Delta C_t$ (enačba 3). Nato lahko za vzorce izračunamo vrednost $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (enačba 1), ki je večkratnik ekspresije izbranega gena normaliziranega z referenčnim genom glede na neobdelano kontrolo. Predpogoj za uporabo tega matematičnega modela je identična učinkovitost pomnoževanja tarčnega in referenčnega gena (Livak in Schmittgen, 2001; Invitrogen, 2008).

$$\text{Relativno izražanje} = 2^{-\Delta\Delta C_t} \quad \dots(1)$$

$$\Delta C_{t \text{ vzorec}} = C_{t \text{ tarčni gen; vzorec}} - C_{t \text{ referenčni gen; vzorec}} \quad \dots(2)$$

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t \text{ vzorec}} - \Delta C_{t \text{ kalibrator}} \quad \dots(3)$$

2.6.5 Uporaba metode PCR v realnem času za detekcijo patogenih mikroorganizmov in gensko spremenjenih organizmov

Uporaba metode PCR v realnem času za kvantifikacijo stopnje okužbe rastlin s patogenimi mikrobi se povečuje od prvega poročila leta 1999 (Gachon, 2004). Ta način je hitreši, bolj specifičen in občutljiv v primerjavi s tradicionalnimi protokoli, ki temeljijo na opazovanju bolezenskih znamenj in štetju kolonij. Pri detekciji patogenov za izolacijo nukleinskih kislin ni potrebna predhodna izolacija patogena v čisti kulturi, ampak lahko iz rastlinskega materiala izoliramo celokupno DNA ali RNA in nato detektiramo specifično patogenovo (Andersen in sod., 2006). Najbolj pomembno pa je, da metodo lahko prenesemo na katerikoli sistem patogen- rastlina (Gachon, 2004).

Hitri testi z uporabo PCR v realnem času dajejo točne informacije o prisotnosti, infektivnosti, toksičnosti patogena in o njegovi biomasi, omogočajo hitrejšo in bolj uspešno odločitve o izvajanju ukrepov varstva rastlin pri pojavu bolezni. Hitro in natančno določanje je še posebej pomembno pri karantenskih patogenih, ki jih skušajo države omejiti in izkoreniniti (Weller in sod., 2000, Gachon in sod., 2004). Pravilna in hitra identifikacija je nujna tudi pri zagotavljanju varnosti živil (Gachon in sod., 2004, Andersen in sod., 2006).

Na Oddelku za biotehnologijo in sistemsko biologijo Nacionalnega inštituta za biologijo je PCR v realnem času standardna metoda za rutinsko detekcijo gensko spremenjenih organizmov v hrani in krmi (Buh Gašparič in sod., 2010). V diagnostiko so uvedli različne protokole za PCR v realnem času za detekcijo virusov (Kogovšek in sod., 2008, Gutiérrez-Aguirre in sod. 2008, 2009). Pomembni so novi protokoli za detekcijo patogenih bakterij, vključno s karantenskimi (Dreo in sod. 2007; Hren in sod. 2007; Pirc in sod. 2009; Nikolić in sod. 2010) v različnih rastlinah.

Z metodo PCR v realnem času so raziskovalci Nacionalnega inštituta za biologijo že izvedli več raziskav sprememb v genskem izražanju v krompirju (Baebler in sod. 2009) in vinski trti (Hren in sod. 2009a,b), okuženih z različnimi povzročitelji. Pokazalo se je, da je za uspešno uporabo metode nujno prilagoditi več stopenj protokola, še posebej samo izolacijo nukleinske kisline, saj se tkiva rastlin zelo razlikujejo po vsebnosti različnih inhibitorjev, tako znotraj rastline kot med rastlinskimi vrstami.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 GOJENJE PARADIŽNIKA

Semena paradižnika (*Lycopersicon esculentum* Mill.) sorte VF36 smo dobili od dr. Amnona Lersa z Department of Postharvest Science v Volcani Center v Izraelu. Semena smo površinsko sterilizirali z raztopino NaClO (varekina). V čaši smo redčili 25 ml varekine z 75 ml vode in dodali semena. Raztopino smo mešali na magnetnem mešalu 15 minut. Semena smo nato sprali z vodo. Kalili smo jih v stekleni petrijevki, ki je imela na dnu moker papirnat robček, nad njim pa filterski papir. Po približno štirih dneh, ko so semena skalila, smo kalice posadili v ločke napolnjene s prstjo, tako da sta bili v enem lončku dve rastlini. Rastline smo pred indukcijo abscizije listov gojili od pet do šest tednov v rastni komori.

3.2 INDUKCIJA ABCIZIJE

Abscizijo smo inducirali tako, da smo najprej rastlinam odrezali listne ploskve prvih štirih ali petih listov (začeli smo pri spodnjem najstarejšem listu in nadaljevali rezanje navzgor proti mlajšim listom). Nato smo čez 36 ur rastline izpostavili etilenu v 20-literski anaerobni komori, opremljeni s sistemom za izmenjavo atmosfere. Atmosferski zrak smo zamenjali z etilenom do koncentracije etilena $5 \mu\text{l l}^{-1}$ z nekajkratnim ponavljanjem izsesavanja zraka in polnjenjem komore z etilenom. Rastline smo pustili v komori z etilenom do vzorčenja, do pojava znamenj abscizije ali 6, 12, 24 ali 48h.

3.3 VZORČENJE

3.3.1 Prva metoda vzorčenja

Vzorčili smo abscizinska območja listov, na meji med listnim peceljem in stebлом. Nastala so pri tistih listih, kjer smo listu odrezali listno ploskev in je ostal samo še pecelj, ki se je pod vplivom etilena značilno ukrivil (pojav epinastije).

Ker smo v poskusu želeli dokazovati mRNA za RNazo LX, smo pri delu morali paziti na kontaminacijo rastlinskega tkiva z vsepovsod prisotno RNazo, ki bi lahko razgradila iskano mRNA. Pri delu smo uporabljali rokavice, saj so neželeni encimi tudi na koži. Za rezanje smo uporabljali skalpel, ki smo ga med delom čistili z 70-odstotnim etanolom, ki inhibira RNaze in prepreči kontaminacijo tkiva z njimi. Sprotno čiščenje skalpela je bilo potrebno

tudi za preprečevanje kontaminacije vzorcev z drugimi vzorci in njihovo mRNA. S skalpelom smo rezali peceljno in stebelno stran abscizinskega območja (slika 7) ločeno ali pa skupaj. Primerjalni košček vzorčnega tkiva, ki ni bil ločen na peceljni in stebelni del, je tehtal med 120 in 260 mg. Po rezanju smo vzorce takoj ohladili v tekočem dušiku, jih zavili v aluminijsko folijo in jih zopet predstavili v tekoč dušik, dokler jih po končanem delu nismo shranili v zamrzovalni skrinji pri -80°C .

3.3.2 Druga metoda vzorčenja

Označili smo 2-ml centrifugirke z varnostnim zapiranjem z etiketo z imenom vzorca in jo prelepili z lepilnim trakom. Okoli abscizinskega območja (slika 7) smo zajeli manj okoljnega tkiva. Pri nekaterih listih smo z rezilom ločili stebelno in peceljno stran abscizinskega območja in dobili za eno abscizinsko območje lista dva vzorca. Označili smo steblo in pecelj. Vzorcev nismo tehtali, primerjalni je imel okoli 14 mg.

3.3.3 Tretja metoda vzorčenja

Pri tretjem poskusu smo si izbrali šest časovnih točk in za si vsako pripravili tri rastline. Označili smo 2-ml centrifugirke z varnostnim zapiranjem z etiketo z imenom vzorca in jo prelepili z lepilnim trakom. Pokrove centrifugirk smo preluknjali z injekcijsko iglo, da smo omogočili izenačevanje tlakov med ohlajanjem in taljenjem vzorca. Vsako centrifugirko smo stekali. Ločeno smo vzorčili peceljni in stebelni del abscizinskega območja (slika 7). Koščke tkiva smo rezali z skalpelom, ki smo ga pri vsakem vzorčenju očistili z etanolom. Vzorce smo shranili v stekleno centrifugirko in jih pred zamrznitvijo v tekočem dušiku ponovno stekali. Tako smo lahko izračunali maso vsakega vzorca. Njihova masa je bila od 6 do 45 mg. Po končanem delu smo vzorce shranili v zamrzovalni skrinji pri -80°C .



Slika 7: Vzorčenje abscizinskega območja lista paradižnika.

3.4 HOMOGENIZACIJA VZORCEV

Vzorci smo homogenizirali z napravo TissueLyser (Qiagen). Tkivu v 2-ml centrifugirke z varnostnim zapiranjem smo dodali železno kroglico. Eppendorfove centrifugirke smo naložili v posebne bloke, ki so bili pred delom shranjeni pri -80 °C. Bloke smo vstavili v napravo TissueLyser (Qiagen) in jih najprej stresali 1 minuto pri 20 Hz, nato smo vzorce obrnili in jih stresali še 1 minuto pri 20 Hz.

3.5 IZOLACIJA CELOKUPNE RNA

3.5.1 Izolacija s kompletom RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)

Homogeniziranemu vzorcu v mikrocentrifugirki smo dodali 450 µl pufru RLT iz kompleta RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen), zmes premešali in tri minute inkubirali pri 56 °C. Nato smo zmes prenesli na kolono QIAshredder, vstavljeno v 2 ml-centrifugirko in centrifugirali 2 min pri 14000 vrtljajih na minuto. 400 µl supernatanta smo prenesli v novo mikrocentrifugirko in mu dodali 200 µl 96-odstotnega etanola. Vzorec smo prenesli v kolono RNeasy mini spin in centrifugirali 30 sek pri 14000 vrtljajih na minuto. Zgornji del kolone smo prenesli v novo 2 ml-centrifugirko, dodali 600 µl pufru RW1 iz kompleta (RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)) in centrifugirali 30 sek pri 14000 vrtljajih na minuto. Kolono smo nato prenesli v novo 2 ml-centrifugirko brez pokrovčka, dodali 500 µl pufru RPE in centrifugirali 30 sek pri 14000 vrtljajih na minuto. Kolono smo ponovno prenesli v novo 2 ml-centrifugirko brez pokrovčka, dodali 500 µl pufru RPE in centrifugirali 2 min pri 14000 vrtljajih na minuto. Kolono smo še enkrat prenesli v novo 2 ml-centrifugirko in centrifugirali 1 min pri 14000 vrtljajih na minuto. Na koncu smo kolono prenesli v 1,5 ml-centrifugirko in dodali 50 µl vode RNase free water segrete na 56 °C in inkubirali pri sobni temperaturi. Po 15 minutah smo kolono v 1,5 ml-centrifugirki centrifugirali 1 minuto pri 14000 vrtljajih na minuto. Izolirano RNA smo shranili pri 80 °C.

DNA smo iz vzorcev odstranili v encimom Dnaza I (Invitrogen). Vzorcem na ledu smo dodali reakcijsko mešanico, ki je vsebovala Dnazo I, pufer in destilirano vodo. Inkubirali smo 15 min in vmes nekajkrat vzorec močno premešali. Na koncu smo dodali EDTA in inkubirali 10 min pri 65 °C.

3.5.2 Izolacija s kompletom RNeasy Micro Kit (Quiagen)

Pufer RPE iz kompleta (RNeasy Micro Kit (Quiagen)) smo pripravili tako, da smo 11 ml koncentriranega pufera redčili z 44 ml 100-odstotnega etanola. 80-odstotni etanol smo pripravili z redčenjem 100-odstotnega etanola z vodo Rneasy free water v razmerju 1:4. Raztopino DNaze smo pripravili z raztapljanjem liofilizirane DNaze s predpisanim volumnom (550 ml) vode Rneasy free water. DNazo smo shranili pri -20 °C.

Homogeniziranemu vzorcu smo dodali 350 µl pufera RLT iz kompleta RNeasy Micro Kit (Quiagen), ga dobro premešali in centrifugirali 3 min pri 14000 vrtljajih na minuto. Supernatant smo prenesli v novo 2 ml-centrifugirko, mu dodali 175 µl 70-odstotnega etanola in ga premešali z pipetiranjem. Vzorec brez precipitata smo prenesli na kolono RNeasy MinElute in centrifugirali 30 sekund pri 14000 vrtljajih na minuto. Nato smo kolono prenesli v novo 2 ml-centrifugirko, dodali 350 µL pufera RW1, centrifugirali 30 sekund pri 14000 vrtljajih na minuto in kolono ponovno prenesli v novo 2 ml-centrifugirko. Pred izolacijo ali med izolacijo smo si pripravili reakcijsko mešanico DNaze I iz kompleta RNeasy Micro Kit (Quiagen). Za vsak vzorec smo naredili 80 µl reakcijske mešanice iz 10 µl delovne raztopine Dnaze I in 70 µl pufera RDD iz kompleta RNeasy Micro Kit (Quiagen). 80 µl reakcijske mešanice smo nanesti na membrano kolone in inkubirali 15 minut pri sobni temperaturi. Dodali smo 350 µL pufera RW1 iz kompleta RNeasy Micro Kit (Quiagen), centrifugirali 30 sekund in prenesli kolono v novo 2 ml-centrifugirko. Potem smo dodali 500 µL pufera RPE, centrifugirali 30 sekund pri 14000 vrtljajih na minuto in prenesli kolono v novo 2 ml-centrifugirko. Dodali smo 500 µL 80-odstotnega etanola, centrifugirali 2 minuti pri 14000 vrtljajih na minuto in prenesli kolono v novo 2 ml-centrifugirko. RNA smo posušili tako, da smo odprli pokrovčke kolone in centrifugirali 5 minut. Kolono smo prenesli v novo 1,5 ml-centrifugirko in dodali 14 µl vode brez RNaz. Pred elucijo smo počakali 10 minut in nato centrifugirali 10 minut pri 14000 vrtljajih na minuto. Kolone smo zavrgli in zaprli pokrovčke 1,5 ml-centrifugirk. Vzorce smo shranili pri -80°C.

3.6 KONTROLA KAKOVOSTI IZOLIRANE RNA

3.6.1 Merjenje koncentracije izolirane RNA

Koncentracijo izolirane RNA smo izmerili spektrofotometrično z inštrumentom Nanodrop 1000. Aparat smo priklopili na računalnik in preko računalniškega programa oddajali ukaze za meritve. V začetnem meniju smo izbrali možnost merjenja koncentracije RNA. Aparat smo umerili z vodo, ki ni vsebovala RNaz in nato izmerili koncentracijo RNA v posameznem vzorcu. Za posamezno meritev smo porabili 1 µl vzorca.

3.6.2 Agarozna gelska elektroforeza

V erlenmajerici smo pripravili 1,5 % agarozni gel, tako da smo v mikrovalovni pečici raztopili agarozo v pufru TAE. Raztopini agaroze smo dodali barvilo SYBR Safe (Invitrogen) v razmerju 1 μ l barvila na 10 ml raztopine agaroze. Vsebino erlenmajerice smo prelili v elektroforetsko banjico, vstavili v njo glavniček, jo pokrili z aluminjasto folijo in počakal 45 minut. Ko je nastal kompakten gel, smo glavniček odstranili in nanegli vzorce (3 μ l) redčene z nanašalnim pufrom (3 μ l) in označevalec velikosti (100bp). Banjico smo namestili v elektroforetsko komoro, v njo dodali toliko pufru TAE, da je prekril gel, jo pokrili s pokrovom, nastavili pogoje elektroforeze (čas 30 min, tok 500 mA, moč 250W, napetost 80V) in zagnali elektroforezo.

3.7 OBRATNO PREPISOVANJE RNA ZA PCR V REALNEM ČASU

Celokupno RNA smo v postopku obratnega prepisovanja prepisali v komplementarno verigo, imenovano komplementarna DNA (cDNA). Uporabili smo komplet High Capacity cDNA archive kit (Applied Biosystems). Naredili smo 50 μ l reakcije obratnega prepisovanja.

V prvi stopnji smo denaturirali totalno RNA. V 0,5 ml-mikrocentrifugirki smo zmešali 2 μ l 25 $\times$ dNTP in 5 μ l 10 $\times$ naključnih heksamerov. Nato smo dodali 9,5 μ l RNA in 20,5 μ l DEPC vode in vsebino še enkrat premešali in nato centrifugirali. Mikrocentrifugirke smo postavili v GenAmp[®] PCR System 9700 (Perkin Elmer) in inkubirali 5 minut pri 95 °C. Nato smo jih postavili na led za 5 min.

Med tem smo si pripravili reakcijsko mešanico za obratno prepisovanje.

Sestava reakcijske mešanice:

- 4,5 μ l DEPC voda
- 5 μ l 10 $\times$ RT pufer
- 1 μ l inhibitor RNaze
- 2,5 μ l Mul V transkriptaza

V drugem koraku smo izvedli reakcijo obratnega prepisovanja. V 0,5 ml-mikrocentrifugirki smo združili 13 μ l reakcijske mešanice za obratno prepisovanje in denaturirano RNA, ki smo jo v prvi stopnji postavili na led. Vsebino smo premešali in centrifugirali. Mikrocentrifugirke smo postavili v GenAmp[®] PCR System 9700 (Perkin Elmer) in inkubirali najprej 10 min pri 25 °C in nato 120 min pri 37 °C. Na koncu smo

vklučili še korak za vzdrževanje vzorcev pri 4 °C. Po končanem obratnem prepisovanju smo sintetizirano cDNA shranili pri -20 °C.

3.8 PCR V REALNEM ČASU

Z metodo PCR v realnem času smo določali izražanje genov za *RNazo LX* in poligalakturonazi *TAPG1* in *TAPG4*. Za normalizacijo podatkov smo izbrali gen za citokrom C oksidazo (*COX*). Za *COX* smo uporabili metodo zaznavanja pomnoženih produktov TaqMan. Produkta *RNaze LX* smo zaznavali z metodo SYBR Green I.

3.8.1 Načrtovanje začetnih oligonukleotidov za *RNaze LX*

Za določanje izražanja *RNaze LX* smo načrtovali začetne oligonukleotide na podlagi zaporedja gena, ki smo ga našli v javno dostopni bazi podatkov GenBank. Zaporedje smo odprli s programom Primer3 Output in upoštevali prednastavljene parametre načrtovanja, ki so se nanašali na delež G in C nukleotidov (20-80 %), T_m (57-60 °C), dolžino začetnih oligonukleotidov (optimalna dolžina je 20 nukleotidov). Izmed ponujenih možnosti smo izbrali dve, ki smo ju še sami oblikovali, da smo parametre optimizirali. S programom PrimerExpress™ 2.0 smo dodatno preverili, da izbrani začetni oligonukleotidi ne tvorijo sekundarnih struktur in dimerov. Specifičnost začetnih oligonukleotidov za *RNazo LX* smo preverili z javno dostopnim programom Basic Local Alignment Tool (BLAST). Vnesli smo zaporedje začetnega oligonukleotida in naredili primerjavo z znanimi zaporedji v bazah podatkov. Še posebej smo bili pozorni, da začetni oligonukleotid ne prilega znanim genom paradižnika, npr. *Rnazi LE*, katere zaporedje je zaporedju *RNaze LX* 60-odstotno podobno (Löffler in sod., 1993).

Prvi par začetnih oligonukleotidov (oznaka: RNaza LX-1)

- F1: 5'-TCTATGGCCAAACTACAAAGATGGT-3'
- R1: 5'-AGAACTCAGATTCATCCAAAGAGCTT-3'

Drugi par začetnih oligonukleotidov (oznaka: RNaza LX-2)

- F2: 5'-CCTATTTCCAAAGTCACTTGACTT-3'
- R2: 5'-CCTTGGGTTTAATCCCTGCATTG-3'

3.8.2 Načrtovanje začetnih oligonukleotidov za *TAPG1* in *TAPG4*

Začetni oligonukleotidi za poligalakturonazo TAPG1:

- F: 5'-AGGCTGGAAACAACAAGAGTTAGG-3'
- R: 5'-CCCAAGTTTAACTCTCACACCATT-3'

Začetni oligonukleotidi za poligalakturonazo TAPG4:

- F: 5'-GAATCCCAAGAGCAAGGAGTACAA-3'
- R: 5'-CATTGCTAGGTCTTGCCCATGT-3'

3.8.3 Izvedba PCR v realnem času

PCR v realnem času smo izvedli v 5 µl reakcijah. Vsaka reakcija je vsebovala 2 µl cDNA in 3 µl reakcijske mešanice. Uporabljali smo neredčeno, 10 krat in 100 krat redčeno cDNA. Reakcijsko mešanico za *COX* smo pripravili v mikrocentrifugirki iz reagenta TaqMan PCR Universal Master Mix (Applied Biosystems), sonde in začetnih oligonukleotidov. Za *RNazo LX* in poligalakturonazna gena *TAPG1* ter *TAPG5* pa smo pripravili reakcijsko mešanico iz SYBR mastermix (Applied Biosystems) in začetnih oligonukleotidov.

Reakcijske mešanice za:

COX

- 0,075 µl ddH₂O
- 2,5 µl 2×TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)
- 0,125 µl 10 µM sonde (končna koncentracija je bila 250 nM)
- 0,15 µl 30 µM smiselne (F) in protismiselne (R) začetnega oligonukleotida (končna koncentracija je bila 900nM)
- 2 µl cDNA

RNazo LX, poligalakturonazi *TAPG1* in *TAPG4*

- 0,2 µl ddH₂O
- 2,5 µl SYBR mastermix (Applied Biosystems)
- 0,15 µl 30 µM smiselne (F) in protismiselne (R) začetnega oligonukleotida (končna koncentracija je bila 900nM)
- 2 µl cDNA

Vzorci smo nanašali na optično ploščico formata 96 (Applied Biosystems) po vnaprej pripravljenem načrtu. Najprej smo na ploščo nanesli v vse luknjice 2 μ l cDNA. Nato smo nanesli ustrezne reakcijske mešanice. Končni volumen v vsaki luknjici je bil 5 μ l. Vsak vzorec smo na ploščico nanesli v treh ponovitvah. Pred začetkom in na koncu nanašanja vzorcev za posamezni tarčni gen smo na posebno mesto nanesli namesto cDNA sterilizirano dH₂O, ki nam je služila kot kontrola kontaminacije (NTC – ang. no template control). Ploščico smo pokrili z lepljivo folijo (ABI PRISM[®] Optical Adhesive Covers, Applied Biosystems) in jo centrifugirali 1 min pri 1000 g.

PCR reakcijo smo izvedli v aparaturi ABI PRISM[®] 7900 HT Fast Real-Time PCR pri standardnih pogojih pomnoževanja:

- 2 minuti pri 50 °C
- 10 minut pri 95 °C (aktivacija polimeraze)
- 45 ciklov pri pogojih
 - o 10 sekund pri 95 °C (denaturacija DNA)
 - o 1 minuta pri 60 °C (vezava začetnih oligonukleotidov in pomnoževanje DNA)
- 15 sekund pri 95 °C, 15 sekund pri 60 °C, 15 sekund pri 95 °C (disociacijska krivulja)

3.8.4 Analiza podatkov

Analizo začetnih podatkov reakcij PCR v realnem času smo izvedli v programu SDS 2.3 (Applied Biosystems), s katerim smo preverili uspešnost podvojevanja cDNA posameznih reakcij. Glede na nastavljeno linijo fluorescenčnega praga (threshold) nam je program izračunal vrednosti Ct. Te vrednosti smo izvozili v tekstovno datoteko in jih obdelali s programom Microsoft Excel.

Za vsak vzorec smo izračunali vrednost ΔC_t , ki je razlika med vrednostima Ct tarčnega gena (*RNaza LX*, *TAPG1*, *TAPG4*) in normalizatorskega gena (*COX*).

$$\Delta C_{t\text{ vzorec}} = C_{t\text{ tarčni gen}} - C_{t\text{ COX}} \quad \dots(4)$$

Nato smo za kalibratorske vzorce določili peceljno in stebelno stran območja abskizije pri intaktni kontroli z neporezanimi listi (K0) in izračunali vrednost $\Delta\Delta C_t$, ki je razlika med vrednostjo ΔC_t vzorca in intaktne kontrole.

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t\text{ vzorec}} - \Delta C_{t\text{ K0}} \quad \dots (5)$$

Na koncu smo izračunali še relativno izražanje RNaze LX po naslednji enačbi:

$$\text{Relativno izražanje} = 2^{-\Delta\Delta C_t} \quad \dots(6)$$

Relativno izražanje (ang. expression ratio) je razmerje števila kopij mRNA za tarčni gen v vzorcu in intaktni kontroli. Vrednost relativnega izražanja 1 pomeni, da je v vzorcu prisotno enako število kopij mRNA kot v intaktni kontroli. Če je izražanje določenega gena v vzorcu večje kot v kontroli, je vrednost večja kot 1. Konkretno pomeni izračunana vrednost relativnega izražanja večkratnik števila kopij v vzorcu v primerjavi z intaktno kontrolo. Pri vrednostih med 0 in 1 pa se tarčni gen izraža v manjšem številu kopij v vzorcu kot v intaktni kontroli, njegovo relativno izražanje je manjše.

4 REZULTATI

4.1 PRIPRAVA RASTLINSKEGA MATERIALA

Za poskus izražanja *RNaze LX* smo vzgojili rastline paradižnika. Po petih do šestih tednih smo inducirali abscizijo listov tako, da smo rastlinam odrezali listne ploskve prvih štirih listov (od spodnjega najstarejšega lista navzgor) in nato po 36 urah izpostavili rastline etilenu v brezračni komori (slika 9) do vzorčenja. Slike od 8 do 13 prikazujejo rastline pri tretjem poskusu določitve izražanja *RNaze LX* v začetku februarja 2009.



Slika 8: Dve kontrolni rastlini paradižnikaz neporezanimi listi (intaktna kontrola- K0) in kontrolna rastlina paradižnika s porezanimi listi po12h (K12).



Slika 9: Indukcija abscizije listov paradižnika z etilenom.



Slika 10: Rastline paradižnika po indukciji abscizije listov paradižnika z etilenom po 12h (E12).



Slika 11: Rastline paradižnika po indukciji abscizije listov z etilenom po 48h (E48).

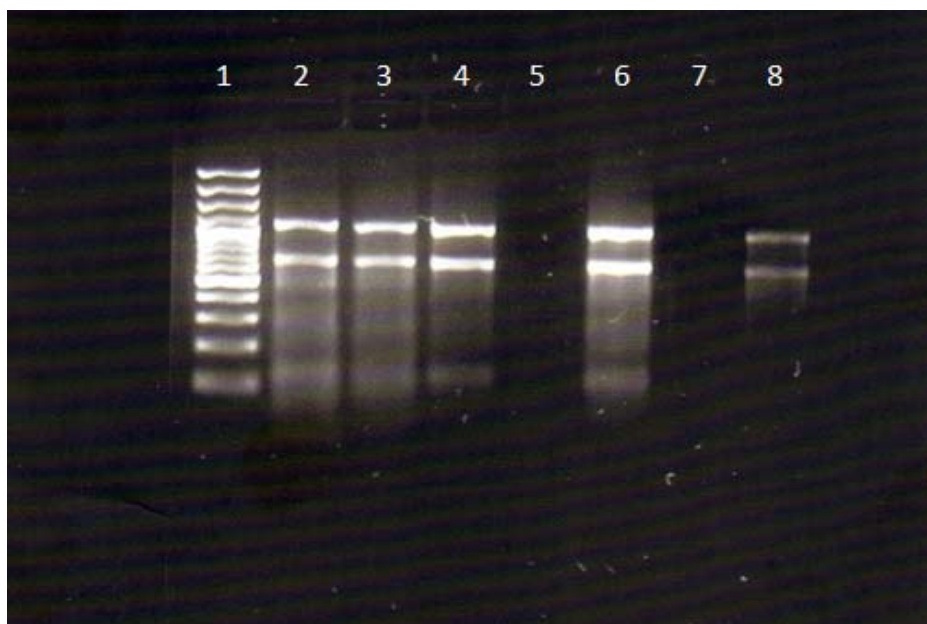


Slika 12: Rastline paradižnika po indukciji abscizije listov z etilenom po 48h, vidna je epinastija.



Slika 13: Rastline paradižnika po indukciji abscizije listov z etilenom po 48h, primerjava velikosti listnih peceljev.

Pri paradižniku, ki je bil vzgojen v oktobru 2008, smo abscizijo inducirali z rezanjem listnih ploskev in izpostavitvijo rastlin etilenom 48h. Kontrolne rastline so bile intaktne in s porezanimi listi. Vzorčili smo na prvi način (glej Materiali in metode). Iz vzorcev tkiva smo izolirali RNA s kompletom RNeasy Plant Mini Kit in odstranili DNA z DNazo I. Kakovost izolirane RNA smo preverili z agarozno gelsko elektroforezo (slika 14) in z merjenjem koncentracije RNA z inštrumentom Nanodrop 1000 (preglednica 1).

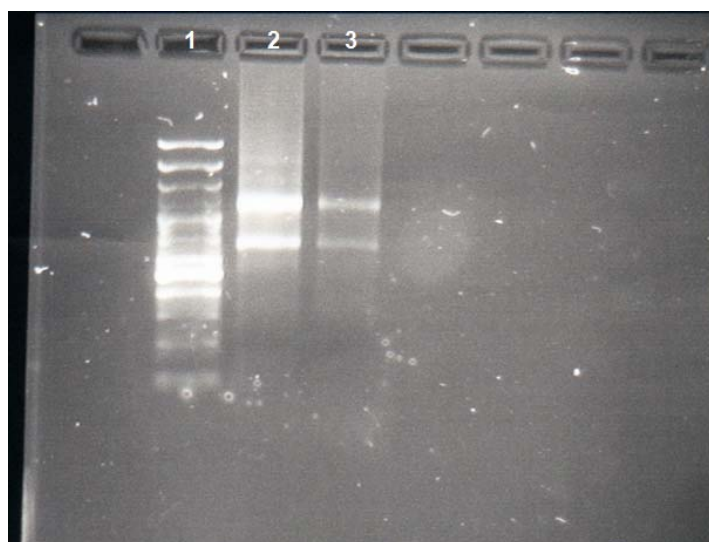


Slika 14: Agarozna gelska elektroforeza izolirane RNA iz vzorcev abscizinskega območja listov paradižnika s kompletom RNeasy Plant Mini Kit. Vzorce si sledijo iz leve proti desni v naslednjem zaporedju: 1- označevalec velikosti (100 bp), 2- neporezana kontrola, 3- porezana kontrola (napaka pri nanašanju), 4- stebelni del in 5- listni del abscizinskega območja (rastlina obdelana z etilenom 48h), 6- stebelni in listni del abscizinskega območja skupaj (rastlina obdelana z etilenom 48h), 7- listni del abscizinskega območja (rastlina obdelana z etilenom 48h) pred dodatkom Dnaze I, 8 - porezana kontrola ponovni nanos.

Preglednica 1: Meritve koncentracije izolirane RNA iz vzorcev abscizinskega območja listov paradižnika z inštrumentom Nanodrop 1000.

Vzorec abscizinskega območja paradižnika	koncentracija RNA (ng/μl)
neporezana kontrola	203,9
neporezana kontrola pred dodatkom Dnaze I	421,2
porezana kontrola (napaka pri nanašanju)	92,4
stebelni del abscinskega območja (etilen 48h)	141,3
listni del abscizinskega območja (etilen 48h)	9,4
stebelni in listni del absc. območja skupaj (etilen 48h)	187,1
listni del absc. območja pred dodatkom Dnaze I (etilen 48h)	19,0

Ker smo domnevali, da se RNaza LX izraža samo v eni ali nekaj plasteh celic, smo v nadaljnjih poskusih spremenili način vzorčenja. Pri novem načinu vzorčenja smo pobirali manjše kose rastlinskega materiala. Posledično smo morali za izolacijo RNA zamenjati protokol in uporabiti komplet RNeasy Micro Kit. Ponovno smo si pripravili rastlinski material. Rastline so rastle od začetka novembra do sredine decembra 2008. Abscizijo smo inducirali z rezanjem listnih ploskev in izpostavitvijo rastlin etilenu za 24 ali 48h. Kontrolne rastline so bile intaktne. Vzorce smo pobirali po drugi metodi vzorčenja (glej Materiali in metode), za izolacijo RNA uporabili komplet RNeasy Micro Kit. Kakovost izolirane RNA smo preverili z agarozno gelsko elektroforezo (sliki 15 in 16) in z merjenjem koncentracije RNA z inštrumentom Nanodrop 1000 (preglednici 2 in 3).



Slika 15: Agarozna gelska elektroforeza izolirane RNA iz vzorcev abscizinskega območja listov paradižnika s kompletom RNeasy Micro Kit. Vzorci si sledijo iz leve proti desni v naslednjem zaporedju: 1-označevalec velikosti (100 bp), 2- stebelni in listni del abscizinskega območja skupaj - 5. list (rastlina obdelana z etilenom), 3- stebelni in listni del abscizinskega območja skupaj – 4. list (kontrolna rastlina).

Preglednica 2: Meritve koncentracije izolirane RNA iz vzorcev abscizinskega območja listov paradižnika z inštrumentom Nanodrop 1000; izolacija s kompletom RNeasy Micro Kit.

Vzorec abscizinskega območja paradižnika	koncentracija RNA (ng/μl)
stebelni in listni del absc. območja skupaj -5.list (etilen 48h)	165,9
stebelni in listni del absc. območja skupaj -4. list (kontrola)	56,6

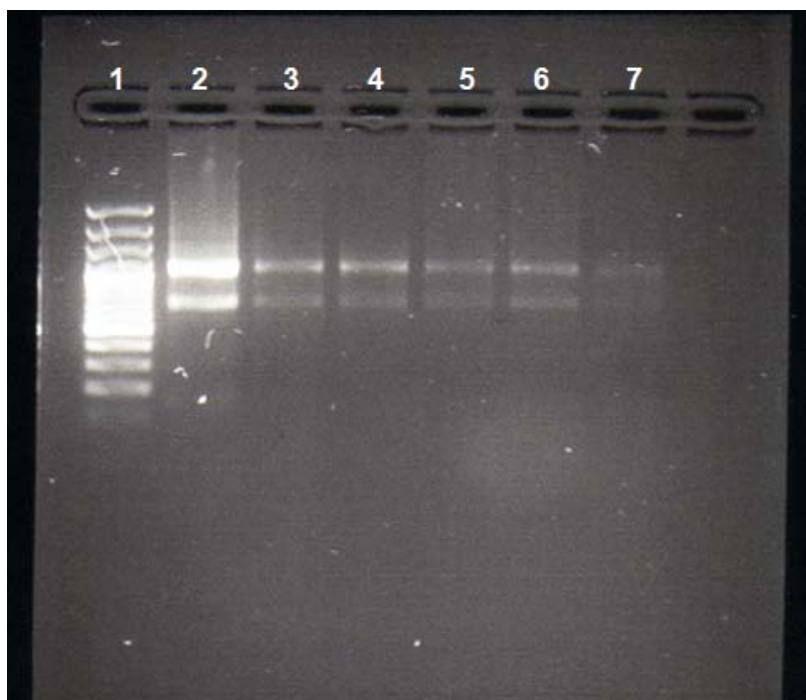


Slika 16: Agarozna gelska elektroforeza izolirane RNA iz vzorcev abscizinskega območja listov paradižnika s kompletom RNeasy Micro Kit (Qiagen). Vzorci si sledijo iz leve proti desni v naslednjem zaporedju: 1- označevalec velikosti (100 bp), 2- stebelna stran abscizinskega območja -3. list (kontrola), 3- listna stran abscizinskega območja - 3. list (kontrola), 4- stebelna stran abscizinskega območja - 3. list (etilen), 5- listna stran abscizinskega območja - 3. list (etilen).

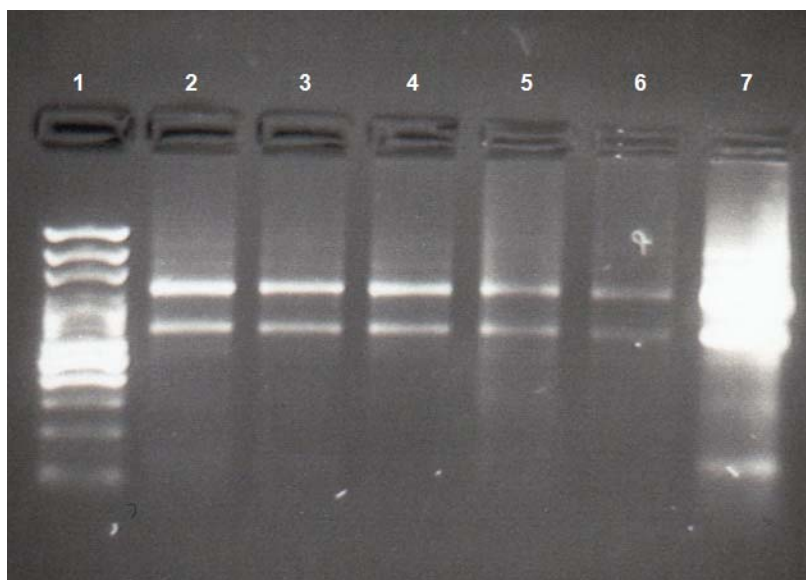
Preglednica 3: Meritve koncentracije izolirane RNA iz vzorcev abscizinskega območja listov paradižnika z inštrumentom Nanodrop 1000; izolacija s kompletom RNeasy Micro Kit.

Vzorec abscizinskega območja paradižnika	koncentracija RNA (ng/μl)
stebelni del absc. območja -3. list (kontrola)	96,5
listni del absc. območja -3. list (kontrola)	8,9
stebelni del absc. območja -3. list (etilen 24h)	29,1
listni del absc. območja -3. list (etilen 24h)	4,2

Pri obeh poskusih smo dobili iz listnega peclja manj RNA kot iz stebela. Ker je bil možen vzrok tudi premajhna količina pecelnega tkiva, smo se odločili, da vse vzorce stehtamo. Naredili smo bolj natančen načrt vzorčenja (glej Materiali in metode). Za poskus smo si izbrali šest časovnih točk in si za vsako pripravili tri rastline. Rastline smo vzgajali do začetka februarja 2009. Abscizijo listov smo sporožili tako, da smo rastlinam odrezali listne ploskve prvih štirih listov in jih izpostavili etilenu za 6, 12 ali 48h. Kontrolne rastline so predstavljale prve tri časovne točke. Prva je bila intaktna kontrola (oznaka K0), ki ni imela odrezanih listov. Ponovno smo vzorčili 12 in 36h po rezanju listnih ploskev (oznaka K12 in K36). Rastline, ki so bile izpostavljene etilenu, so predstavljale naslednje tri časovne točke (oznaka E6, E12 in E48). Pri eni rastlini smo RNA izolirali iz abscizinskega območja tretjega lista. Uporabili smo komplet RNeasy Micro Kit. Kakovost izolirane RNA smo preverili z agarozno gelsko elektroforezo (sliki 17 in 18) in z merjenjem koncentracije RNA z inštrumentom Nanodrop 1000 (preglednica 4).



Slika 17: Agarozna gelska elektroforeza izolirane RNA iz vzorcev abscizinskega območja listov paradižnika. Vzorci si sledijo iz leve proti desni v naslednjem zaporedju: 1-označevalec velikosti (100 bp), 2- KO-1-L3S, 3- KO-1-L3P, 4- K12-1-L3S, 5- K12-1-L3P, 6- K36-1-L3S, 7- K36-1-L3P. Razlaga oznake vzorcev: KO-1-L3S (Kontrola, 0h, 1. Rastlina, List, tretji (3), Steblo), KO-1-L3P (Kontrola, 0h, 1. Rastlina, List, tretji (3), Pecelj). Podobno so označeni ostali vzorci.



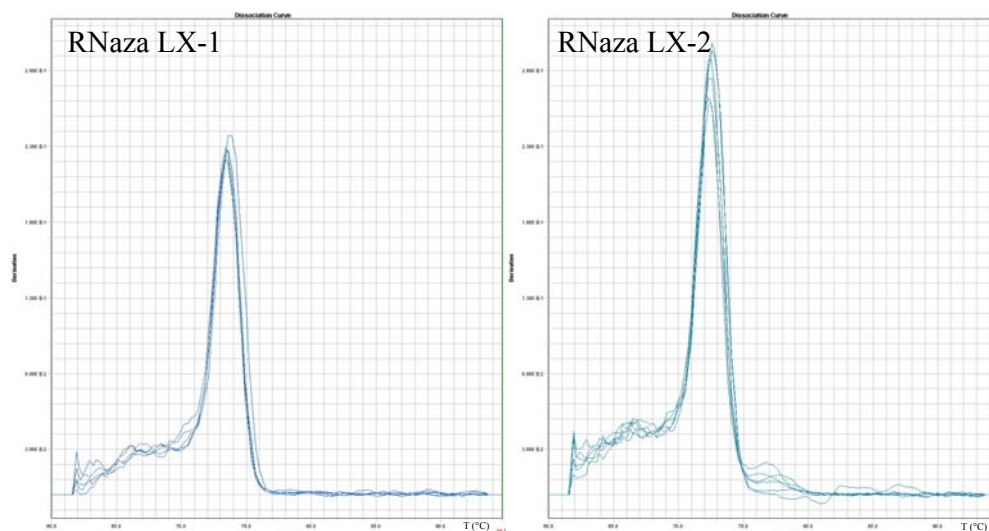
Slika 18: Agarozna gelska elektroforeza izolirane RNA iz vzorcev abscizinskega območja listov paradižnika. Vzorci si sledijo iz leve proti desni v naslednjem zaporedju: 1-označevalec velikosti (100 bp), 2- E6-1-L3S, 3- E6-1-L3P, 4- E12-1-L3S, 5- E12-1-L3P, 6- E48-1-L3P, 7- E48-1-L3S. Razlaga oznake vzorcev: E6-1-L3S (Etilen, 6h, 1. Rastlina, List, tretji (3), Steblo). Podobno so označeni ostali vzorci.

Preglednica 4: Meritve koncentracije izolirane RNA iz vzorcev abskizinskega območja listov paradižnika z inštrumentom Nanodrop 1000.

	vzorec- abs.o. paradižnika	koncentracija RNA (ng/μl)	masa tkiva (mg)
KONTROLA	KO-1-L3S	434,3	37
	KO-1-L3P	74,0	24
	K12-1-L3S	57,8	21
	K12-1-L3P	35,5	17
	K36-1-L3S	78,7	17
	K36-1-L3P	56,4	13
ETILEN	E6-1-L3S	131,4	34
	E6-1-L3P	93,1	37
	E12-1-L3S	100,9	14
	E12-1-L3P	100,3	17
	E48-1-L3S	728,9	45
	E48-1-L3P	59,2	20

4.2 IZRAŽANJE GENA *RNaze LX*

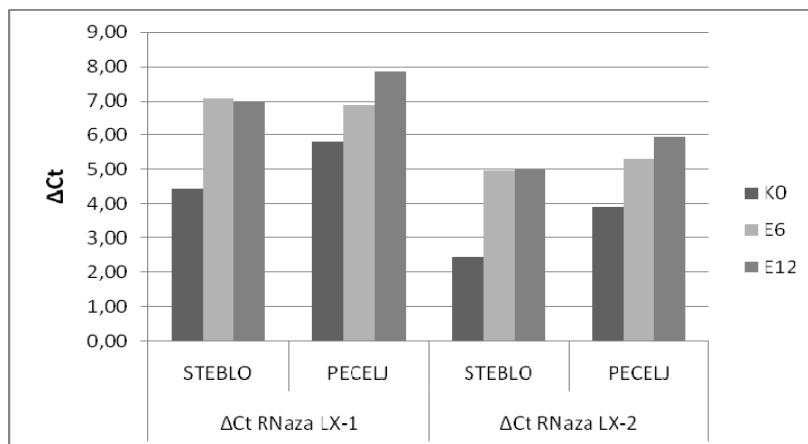
Oba para načrtovanih začetnih oligonukleotidov sta bila specifična za pomnoževanje *RNaze LX* in nista tvorila dimerov, kar smo preverili z disociacijsko krivuljo (slika 19).



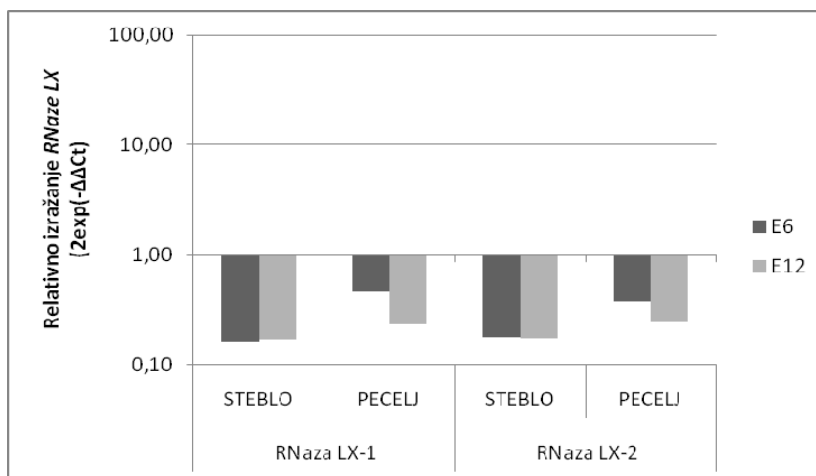
Slika 19: Disociacijski krivulji cDNA *RNaze LX*. Uporabljena sta bila dva para začetnih oligonukleotidov, RNaza LX-1(levo) in RNaza LX-2 (desno).

Za normalizatorski gen smo izbrali *COX*. Kot rezultat reakcije smo dobili vrednosti Ct za *RNazo LX* in *COX*, iz katerih smo izračunali ΔCt (enačba 4) (slika 20), $\Delta\Delta Ct$ (enačba 5) in $2\exp(-\Delta\Delta Ct)$ (enačba 6) (slika 21).

Z metodo PCR v realnem času smo preverili izražanje *RNaze LX* v intaktni kontroli in po indukciji abscizije z etilenom 6 in 12h v tretjem najstarejšem listu na stebelu. Izražanje je bilo večje v intaktni kontroli (K0) kot pri rastlinah z inducirano abscizijo (E6 in E12) (slika 21).



Slika 20: Vrednosti ΔCt za stebelno in peceljno stran abscizinskega območja po indukciji abscizije z etilenom po 6 in 12h v tretjem najstarejšem listu na stebelu paradižnika. Uporabili smo dva para začetnih oligonukleotidov, RNaza LX-1 in RNaza LX-2. Nižje vrednosti ΔCt pomenijo večjo količino mRNA gena *RNaze LX* v vzorcu.

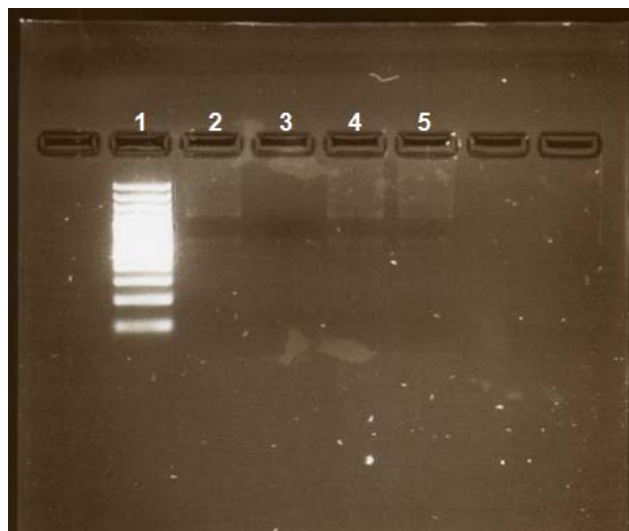


Slika 21: Relativno izražanje *RNaze LX* v stebelnem in peceljnem delu abscizinskega območja tretjega najstarejšega lista paradižnika po indukciji abscizije z etilenom po 6 in 12h v tretjem najstarejšem listu na stebelu glede na kontrolo pred indukcijo (K0). Uporabili smo dva para začetnih oligonukleotidov, RNaza LX-1 in RNaza LX-2. Prikazane so vrednosti $2\exp(-\Delta\Delta Ct)$ na logaritemski skali z osnovo 10. Vrednosti $2\exp(-\Delta\Delta Ct)$ med 0 in 1 pomenijo manjše izražanje *RNaze LX* kot pri kontrolni rastlini. Vrednosti večje kot 1 bi pomenile večje izražanje gena.

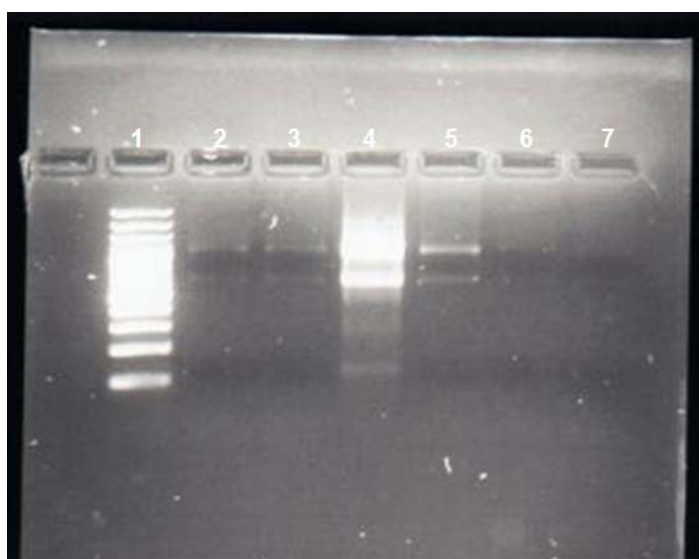
V nadaljnjem poskusu smo za vsako časovno točko (K0, K12, E6, E12, E48) izolirali RNA iz iz peceljne in stebelne strani abscizinskega območja najstarejšega lista pri dveh rastlinah. Uporabili smo komplet RNeasy Micro Kit. Kakovost izolirane RNA smo preverili z agarozno gelsko elektroforezo (slike 22, 23, 24) in z merjenjem koncentracije RNA z inštrumentom Nanodrop 1000 (preglednica 5).

Preglednica 5: Meritve koncentracije izolirane RNA iz abscizinskega območja najstarejšega lista paradižnika z inštrumentom Nanodrop 1000.

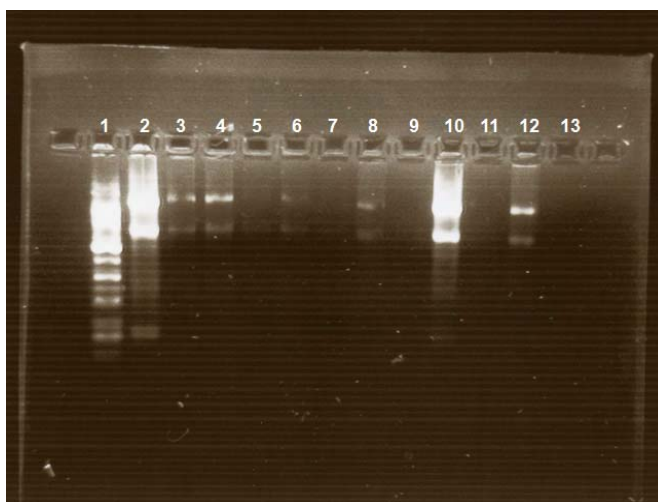
	Vzorec abs. o. pradižnika	koncentracija RNA (ng/μl)	masa tkiva (mg)
KONTROLA	K0-1-L1S	27,2	9
	K0-1-L1P	3,6	5
	K0-2-L1S	19,8	19
	K0-2-L1P	27,2	10
	K0-3-L1S	25,5	9
	K0-3-L1P	12,5	5
	K12-1-L1S	14,5	21
	K12-1-L1P	11,0	9
	K12-2-L1S	21,5	16
	K12-2-L1P	15,5	8
ETILEN	E6-1-L1s	339,2	27
	E6-1-L1p	30,2	24
	E6-3-L1s	37,8	16
	E6-3-L1p	9,0	9
	E12-2-L1s	14,7	19
	E12-2-L1p	5,0	10
	E12-3-L1s	26,2	13
	E12-3-L1p	7,7	9
	E48-1-L1s	274,0	28
	E48-1-L1p	6,9	15
	E48-3-L1s	45,1	21
	E48-3-L1p	5,2	10



Slika 22: Agarozna gelska elektroforeza izolirane RNA iz peceljne in stebelne strani abscizinskega območja najstarejšega lista paradižnika. Vzorci si sledijo iz leve proti desni v naslednjem zaporedju: 1-označevalec velikosti (100 bp), 2- K0-1-L1S, 3- K0-1-L1P, 4- K0-2-L1S, 5- K0-2-L1.

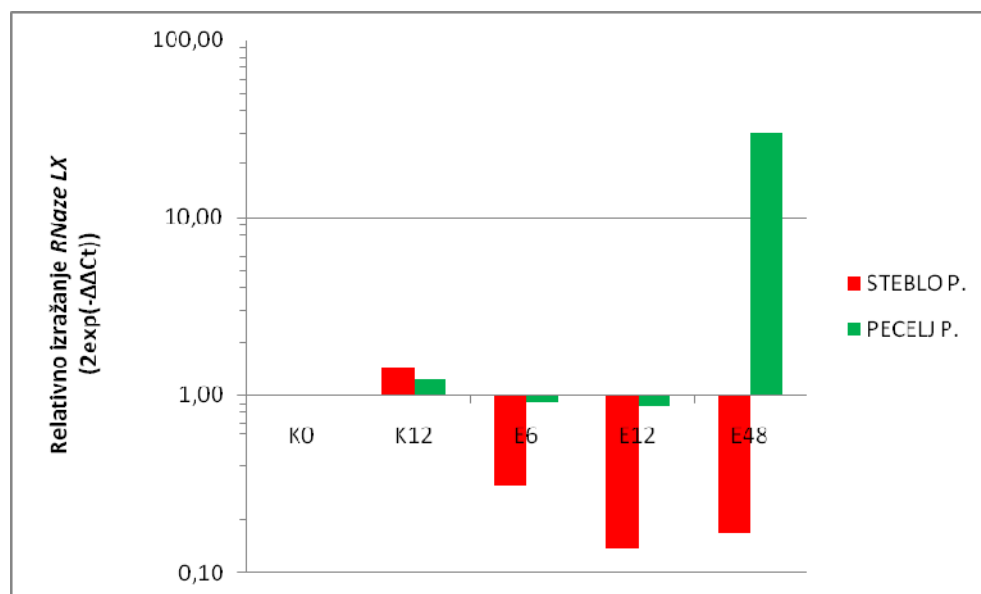


Slika 23: Agarozna gelska elektroforeza izolirane RNA iz iz peceljne in stebelne strani abscizinskega območja najstarejšega lista paradižnika. Vzorci si sledijo iz leve proti desni v naslednjem zaporedju: 1-označevalec velikosti (100 bp), 2- KO-3-L1S, 3- KO-3-L1P, 4- K12-1- L1S, 5- K12-1-L1P, 6- K12-2-L1S, 7- K12-2-L1P.



Slika 24: Agarozna gelska elektroforeza izolirane RNA iz peceljne in stebelne strani abscizinskega območja najstarejšega lista paradižnika. Vzorci si sledijo iz leve proti desni v naslednjem zaporedju: 1-označevalec velikosti (100 bp), 2- E6-1-L1s, 3- E6-1-L1p, 4- E6-3-L1s, 5- E6-3-L1p, 6- E12-2-L1s, 7- E12-2-L1p, 8- E12-3-L1s, 9- E12-3-L1p, 10- E48-1-L1s, 11- E48-1-L1p, 12- E48-3-L1s, 13- E48-3-L1p.

S parom začetnih oligonukletidov RNaza LX-2 smo analizirali izražanje gena *RNaza LX* v vzorcih iz petih časovnih točk (K0, K12, E6, E12 in E48) v najstarejših listih dveh rastlin. Iz vrednosti Ct vzorcev smo izračunali ΔCt (enačba 4) in $\Delta\Delta Ct$ (enačba 5) in $2^{\exp(-\Delta\Delta Ct)}$ (enačba 6) (slika 25). Relativno izražanje *RNaze LX* na stebelni in peceljni strani abscizinskega območja najstarejših listov je različno (slika 25). V prvih 12h po indukciji abscizije z etilenom so vrednosti relativnega izražanja *RNaze LX* na peceljni strani glede na kontrolo (K0) nespremenjene, na stebelni strani so vrednosti 7-krat manjše (E12). Po 48 urni indukciji abscizije z etilenom (E48) ostanejo vrednosti relativnega izražanja na stebelni strani nespremenjene, na peceljni strani pa opazimo 30-krat povečano relativno izražanje gena *RNaza LX* glede na kontrolo (K0).

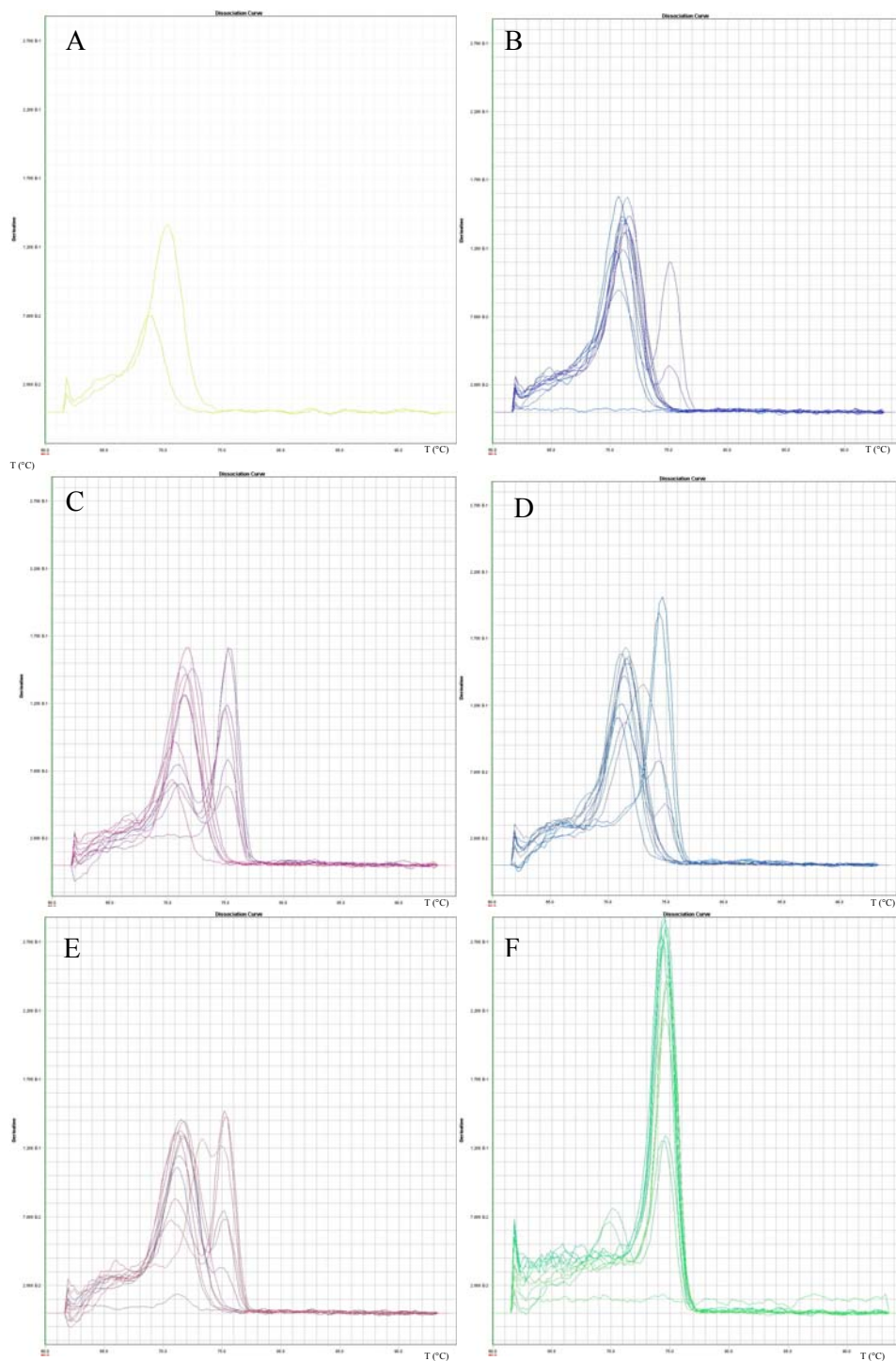


Slika 25: Relativno izražanje *RNase LX* v stebelnem in peceljnem delu območja abscizije pri najstarejših listih paradižnika. Prikazane so vrednosti $2^{\exp(-\Delta\Delta Ct)}$ na logaritemski skali z osnovo 10. Vrednosti relativnega izražanja med 0 in 1 pomenijo manjše izražanje gena *RNase LX* v vzorcu kot pri kontrolni rastlini (K0). Vrednosti večje kot 1 pomenijo večje izražanje gena.

4.3 IZRAŽANJE POLIGALAKTURONAZNIH GENOV *TAPG1* IN *TAPG4*

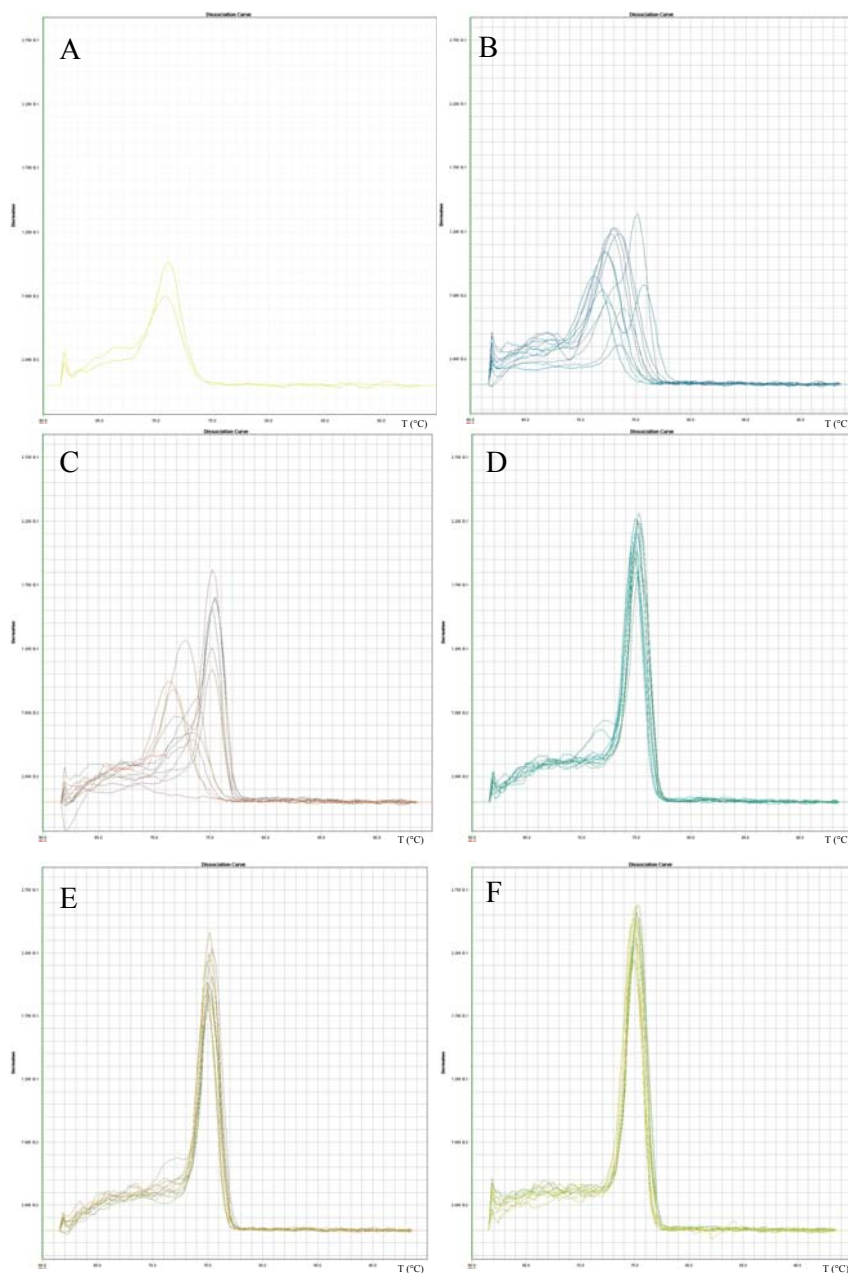
Izražanje poligalakturonaznih genov *TAPG1* in *TAPG4* smo ocenili na peceljni in stebelni strani območja listnega abscizinskega območja.

Na sliki 26 so predstavljene disociacijske krivulje za *TAPG1*. Slika 25 A predstavlja negativno kontrolo, ki smo jo nanesli na ploščo pred začetkom in na koncu nanašanja vzorcev za tarčni gen *TAPG1*. Na posebno mesto na plošči smo namesto cDNA *TAPG1* nanesli sterilizirano vodo. Disociacijska krivulja teh vzorcev ima pri nižji temperaturi vrh, ki predstavlja dimere začetnih oligonukleotidov. Dimeri so bili prisotni pri vzorcih K0, K12, E6 in E12 (slika 26 B, C, D in E). Pri vzorcih K12 sta prisotna 2 vrha, tisti pri nižji temperaturi zaradi dimerov, dodaten vrh pa zaradi pomnoženega produkta cDNA *TAPG1* pri reakciji (slika 26 C). Podobno kot v vzorcih K12 sta dva vrhova prisotna še v vzorcih E6 in E12 (slika 26 D, E). Pri vzorcih E48 je viden en vrh (slika 26 F), ki je nastal zaradi pomnoževanja odseka produkta cDNA *TAPG1* pri reakciji. V vzorcih te časovne točke je bilo prisotne dovolj matrične DNA, na katero so lahko nalegali začetni oligonukleotidi. Pri ostalih časovnih točkah v vzorcih ni bilo dovolj matrične DNA in posledično so lahko začetni oligonukleotidi tvorili dimere.



Slika 26: Disociacijske krivulje cDNA *TAPG1*. Vzorci si sledijo zgoraj od leve proti desni: negativna kontrola (A), K0 (B), K12 (C), E6 (D), E12 (E) in E48 (F).

Na sliki 27 so predstavljene disociacijske krivulje za cDNA *TAPG4*. Pri negativni kontroli (slika 27 A) je pri nižji temperaturi vrh, ki predstavlja dimere začetnih oligonukleotidov. Prav tako so dimeri prisotni pri vzorcih K0 in K12 (slika 27 B,C). Pri vzorcih K12 sta prisotna 2 vrha (slika 27 C), dodaten vrh je nastal zaradi pomnoževanja odseka produkta cDNA *TAPG4* pri reakciji. Pri vzorcih E6, E12 in E48 je prisoten le en vrh (slika 27 E, D, F), ki pripada pomnoženemu produktu reakcije.

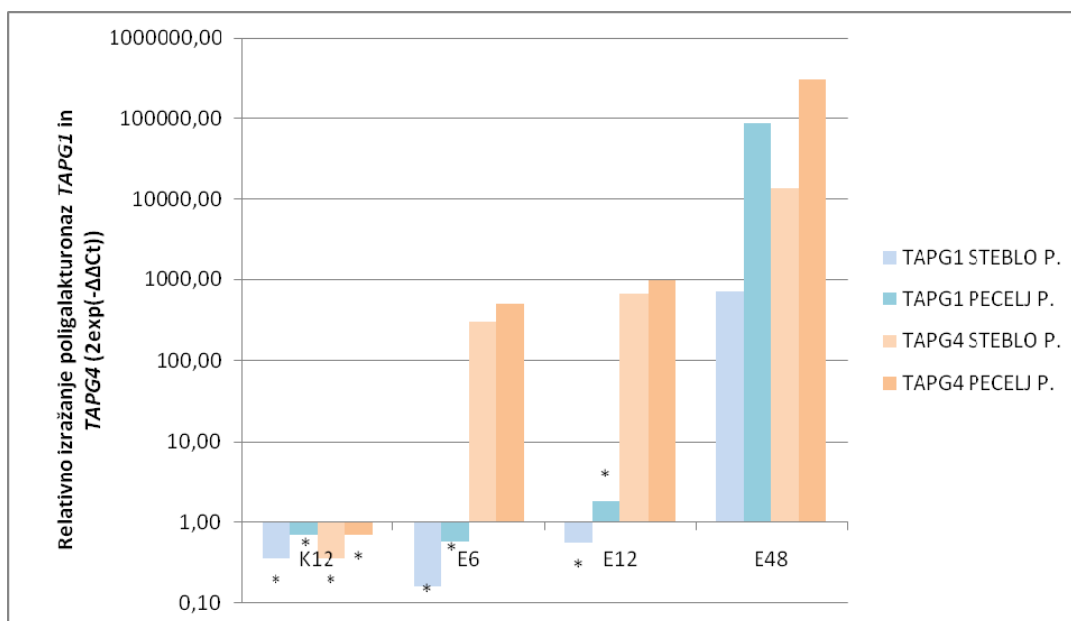


Slika 27: Disociacijske krivulje cDNA *TAPG4*. Vzorci si sledijo od leve proti desni: negativna kontrola (A), K0 (B), K12 (C), E6 (D), E12 (E) in E48 (F).

Poligalakturonazi *TAPG1* in *TAPG4* se izražata med abscizijo listov pri paradižniku (Kalaitzis in sod., 1997), zato izražanja genov, ki ju kodirata, v abscizinskem območju pred začetkom procesa nismo pričakovali. S predvideno odsotnostjo matrične cDNA *TAPG1* oz. *TAPG4*, na katero bi lahko nalegali začetni oligonuklotidi, je zelo verjetno povezano nastajanje dimerov začetnih oligonukleotidov pri inatknih kontrolah (slika 26 B). Da smo lahko kljub temu primerjali izražanje genov v kontroli in začetnih stopnjah po obdelavi rastlin z etilenom, z izražanjem istih genov v času abscizije, smo vrednostim Ct vzorcev iz kontrole in zgodnjih časov po obdelavi z etilenom dodelili arbitrarno vrednost 40, pri kateri detekcija skoraj ni več mogoča. Tako korigirane rezultate smo nato uporabili za izračun relativnega izražanja genov ($2^{\exp(-\Delta\Delta Ct)}$) (slika 28).

Po 6 in 12 urni izpostavitvi rastlin etilenu opazimo povečano izražanje poligalakturonaznega gena *TAPG4* (slika 28). Kljub temu, da relativnega izražanja *TAPG1* nismo mogli izračunati zaradi nastanka dimerov začetnih oligonukleotidov, se verjetno ta gen v manjši meri že izraža, kar vidimo iz disociacijskih krivulj (slika 26 D, E). Po 48 urni izpostavitvi rastlin etilenu se povečano izražata oba poligalakturonazna gena *TAPG1* in *TAPG4* (slika 28). Izražanje *TAPG1* je 48 ur po indukciji abscizije z etilenom na peceljni strani skoraj 100 000-krat večje kot 12 ur po indukciji.

Po 6 in 12 urni izpostavitvi rastlin etilenu ni bistvenih razlik med vrednostmi relativnega izražanja poligalakturonaze *TAPG4* med obema stranema abscizinskega območja, po 48 urah opazimo, da so vrednosti relativnega izražanja za ta gen 10 krat večje na peceljni kot na stebelni strani. Pri poligalakturonazi *TAPG1* so vrednosti relativnega izražanja približno 100 krat večje na peceljni kot na stebelni strani (slika 28).



Slika 28: Prikazane so vrednosti $2\exp(-\Delta\Delta C_t)$ za poligalakturonazna gena *TAPG1* in *TAPG4* na stebelni in peceljni strani abscizinskega območja najstarejšega lista paradižnika v porezani kontroli po 12h (K12) in po izpostavitvi rastlin etilenu za 6, 12 ter 48h (E6, E12 in E48). Vrednosti $2\exp(-\Delta\Delta C_t)$ so bile izračunane glede na intaktno kontrolo (K0), ki smo ji dodelili arbitrarno vrednost 40. Arbitrarno vrednost 40 smo dodelili tudi vsem vzorcem označenih z *. Vrednosti večje kot 1 pomenijo večje izražanje gena *TAPG1* ali *TAPG4* v vzorcu kot pri kontrolni rastlini (K0), vrednosti med 0 in 1 pomenijo manjše izražanje gena.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Raziskava diplomske naloge je del skupnega projekta skupine dr. Amnona Lersa z Department of Postharvest Science v Volcani Center v Izraelu o vlogi RNaze LX pri absciziji listov, cvetov in plodov češnjevega paradižnika. V skupini dr. Lersa so že ugotovili, da se pri absciziji listov češnjevega paradižnika *RNaza LX* izraža v abscizinskem območju, mi pa smo skušali natančneje umestiti to izražanje v prostorski in časovni okvir.

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Indukcija abscizije

Abscizijo listov smo inducirali pri pet do šest tednov starih paradižnikih. Abscizijo smo pri vseh poskusih sprožili z odstranitvijo listnih ploskev in izpostavitvijo rastlin etilenu (slika 9). Odstranitev listnih ploskev zmanjša pritok avksinov v listni. Koncentracija etilena in avksinov ter dejavniki, ki jo spreminjajo, vplivajo na občutljivost tkiva za ta dva hormona. Zato zmanjšana proizvodnja avksina v listni ploskvi pri starem listu poveča občutljivost abscizinskega območja za etilen (Sexton in Trawavas, 1987; Sexton, 1997, cit. po Taylor in Whitelaw, 2001). Posledično po sprožitvi abscizije na tak način starejši listi hitreje odpadejo kot mlajši (Lers in sod., 2006).

5.1.2 Izolacija RNA

V prvem poskusu smo vzorčili relativno velike kose rastlinskega tkiva z maso okrog 100 mg in iz njih izolirali RNA. RNA smo uspešno izolirali le iz vzorcev, ki so zajemali celotno abscizinsko območje ali iz vzorcev na stebelni strani območja, medtem ko je bila izolacija s peceljne strani neuspešna. Kakovost izolirane RNA je bila dobra, saj na gelu agarozne elektroforeze nismo videli razgrajene RNA, ki bi lahko nastala zaradi protokola izolacije (slika 14).

Ker smo domnevali, da se *RNaza LX* izraža le v eni ali nekaj plasteh celic, smo v nadaljnjih poskusih spremenili način vzorčenja. Pri novem načinu vzorčenja smo pobirali manjše kose rastlinskega materiala. Posledično smo morali za izolacijo RNA zamenjati protokol in uporabiti komplet RNeasy Micro Kit, ki je namenjen za izolacijo RNA iz zelo majhne količine vzorca. S to nalogo smo komplet tudi uvedli v izolacijske postopke v laboratorijih Nacionalnega inštituta za biologijo, kjer je bilo večina diplomskega dela opravljenega. Z novim protokolom smo iz tkiva, ki je zajemalo celotno abscizinsko območje ali samo stebelno stran, lahko izolirali RNA v dovolj visoki koncentraciji (sliki 15 in 16), da smo jo v naslednjem koraku lahko uporabili za metodo PCR v realnem času.

Tudi z novim načinom vzorčenja nismo uspeli izolirati RNA iz peceljne strani abscizinskega območja. Možen vzrok bi lahko bila premajhna količina rastlinskega tkiva. Druga razlaga, bi bila, da izražena *RNaza LX* na peceljni strani hidrolizira svoj substrat RNA in ga zato ne moremo izolirati. Tretji možen vzrok neuspešne izolacije pa bi bila razgradnje RNA z RNazami, ki so prisotne vsepovsod, in pri preprečevanju kontaminacije vzorcev z njimi nismo bili dovolj uspešni. Koščki tkiva iz peceljne strani so bili majhni, njihova površina pa proporcionalno večja, kot pri večjih koščkih tkiva iz stebelne strani. Tako bi lahko RNaze v večji meri razgradile mRNA na površini manjših koščkov.

Zaradi prvega navedenega možnega vzroka neuspešnosti izolacije RNA iz peceljne strani abscizinskega območja, smo se odločili, da pri naslednjem pobiranju vzorcev vse koščke tkiva stehamo. Odločili smo se, da pri abscizinskem območju ločeno vzorčimo stebelno in peceljno stran, saj smo imeli namen natančneje lokalizirati izražanje *RNaze LX*. Pri tretjem poskusu smo tako naredili natančno shemo pobiranja vzorcev. Izbrali smo šest časovnih točk (K0, K12, K36, E6, E12 in E48) in si za vsako smo pripravili tri rastline. Po indukciji abscizije in vzorčenju smo vse vzorce stehali. Najprej smo izolirali RNA iz tretjega najstarejšega lista na stebelu. Masa vzorcev iz stebelne in peceljne strani je bila od 17 do 45 mg, kar je zadoščalo za izolacijo velike količine RNA. V nadaljnjem koraku smo RNA izolirali še iz najstarejših listov, ki so imeli bolj droben listni pecelj kot tretji listi (slika 13). Posledično so bili tudi koščki tkiva manjši, z maso od 5 do 28 mg (preglednica 5). Iz teh vzorcev smo izolirali manjšo količino RNA kot iz tretjih listov, iz nekaterih vzorcev peceljne strani samo 5 do 9 ng/ml (preglednica 5). Čeprav RNA, izolirane iz teh vzorcev nismo zaznali na gelu pri agarozni elektroforezi, s katero smo preverjali njeno kakovost (slika 24), smo jo dokazali v nadaljevanju poskusa s PCR v realnem času.

5.1.3 Izražanje gena *RNaza LX*

Z analizo disociacijske krivulje smo ugotovili, da sta oba para začetnih oligonukleotidov za *RNazo LX* specifična (slika 19). Če začetni oligonukleotidi ne bi bili specifični, potem bi namesto enega vrha dobili dva ali več. Dodaten vrh lahko predstavljajo dimeri začetnih oligonukleotidov, ki imajo vrhove pri nižjih temperaturah. Ob analizi podatkov tako ni bilo nespecifičnih pomnoževanj, ki bi vplivale na vrednosti Ct.

Za oba para začetnih oligonukleotidov smo z metodo $2^{\text{exp}(-\Delta\Delta\text{Ct})}$ dobili primerljive rezultate (slika 21), čeprav so vrednosti ΔCt vseh vzorcev za okoli 2 večje za prvi par začetnih oligonukleotidov kot za drugi (slika 20). Čeprav sta bila oba para začetnih oligonukleotidov primerna za nadaljnje raziskave, smo se odločili za uporabo drugega para, ker je bil bolj občutljiv. Vzroki za različno obnašanje začetnih oligonukleotidov so

lahko dostopnost začetnih oligonukleotidov do matrice, njihove sekundarne strukture, delež CG in zaporedje baz začetnih oligonukleotidov.

Pri absciziji tretjih najstarejših listov rastlin, ki so bile izpostavljene etilenu 6 in 12 ur, smo z metodo PCR v realnem času opazili izražanje *RNaze LX*, ki je bilo celo manjše kot pri kontroli. Kljub temu smo opazili določene razlike v izražanju med stebelnim in peceljnim delom abscizinskega območja. Na peceljni strani je bila količina transkripta za *RNazo LX* nekoliko večja kot na stebelni strani (slika 21). Kakšno je izražanje *RNaze LX* v tretjih listih po 48h za enkrat ne vemo.

Poskus po 48 urni izpostavitvi etilena smo opravili na najstarejših listih. Pri teh listih je bilo izražanje *RNaze LX* na peceljni strani abscizinskega območja v prvih 12h po sprožitvi abscizije podobno kot pri kontroli, na peceljni strani pa zelo zmanjšano (slika 25). Po 48h je raven transkripta na stebelni strani ostala nespremenjena, se pa je značilno povečala na peceljni strani (slika 25).

5.1.4 Izražanje genov *TAPG1* in *TAPG4*

Pri analizi disociacijskih krivulj za poligalakturonazni gen *TAPG1* smo opazili, da je prišlo do tvorbe dimerov začetnih oligonukleotidov pri pomnoževanju odseka cDNA *TAPG1* pri vzorcih iz časovnih točk K0, K12, E6 in E12 (slika 26 B, C, D, E). Le pri E48 je bila količina matrične cDNA *TAPG1* dovolj velika, da do dimerov ni prišlo (slika 26 F). Disociacijske krivulje za poligalakturonazni gen *TAPG4* kažejo, da je že pri vzorcih iz časovne točke E6 dovolj matrične cDNA *TAPG4*, ki kompetitivno prepreči tvorbo dimerov začetnih oligonukleotidov (slika 27 D). Iz rezultatov disociacijskih krivulj vidimo, da se poligalakturonazni gen *TAPG4* začne izražati bistveno prej kot *TAPG1*, kar opazimo tudi na grafu relativnega izražanja (slika 28).

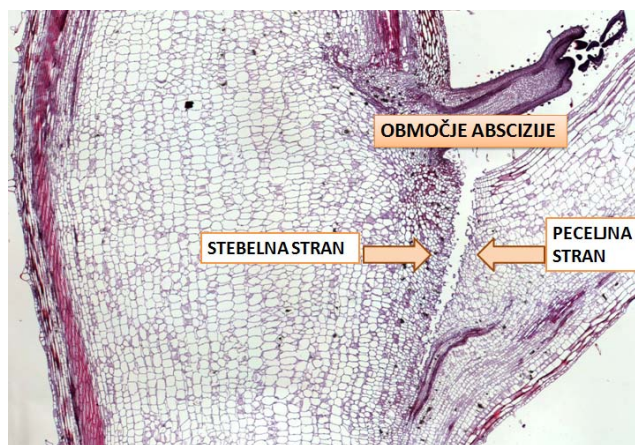
Količina transkripta je za oba poligalakturinazna gena primerljiva 48 ur po indukciji abscizije z etilenom, a se zelo razlikuje v zgodnejših stopnjah. Medtem ko se *TAPG4* izrazi že 6 ur po indukciji, transkripta *TAPG1* 12 ur po sprožitvi abscizije nismo zasledili na stebelni strani in le v sledovih na peceljni strani. 48 ur po indukciji se je raven izražanja *TAPG4* povečala, a primerjalno s *TAPG1* precej manj. Rezultati poskusa se skladajo s podatki o teh genih v abscizinskem območju lista (Kalaitzis in sod., 1997). Pomemben prispevek naše raziskave pa je odkritje, da sta transkripta *TAPG1* in *TAPG4* različno razporejena na peceljni in stebelni strani.

5.1.5 Abscizija in programirana celična smrt

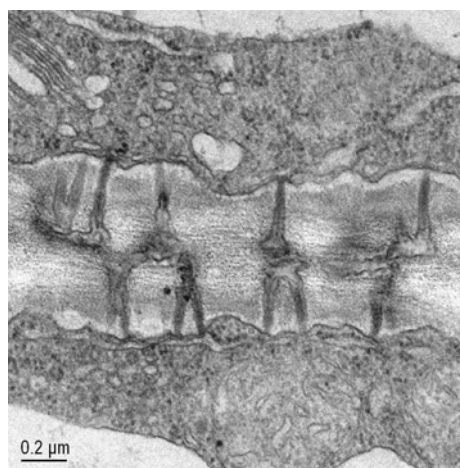
Čeprav specifična vloga RNaze LX ni znana, vse več dokazov potrjuje njeno povezanost s PCS. Kljub splošnemu prepričanju, da je abscizija oblika PCS, pa to do sedaj še ni bilo nedvoumno pokazano. Poskusi v tej diplomski nalogi, skupaj z vzporednimi poskusi naše raziskovalne skupine kažejo, da je hipoteza o PCS v abscizinskem območju pravilna. Z barvanjem z Evans modrim smo opazili mrtve celice okoli abscizinske plasti pred začetkom abscizije (slika 3); prav tako sta se v območju sprožili proteazna in nukleazna aktivnost, ki sta vključeni v procese PCS (Lers in sod., 2006).

PCS na peceljni strani abscizinskega območja potrjujejo tudi naše vzporedne raziskave na mikroskopski (slika 29) in ultrastrukturni ravni. Ultrastrukturne spremembe so se pojavile že po štirih urah izpostavitve rastlin etilenu, v polni meri pa so bile izražene po izpostavitvi rastlin etilenu za 48 ur (Tušek s sod. 2009).

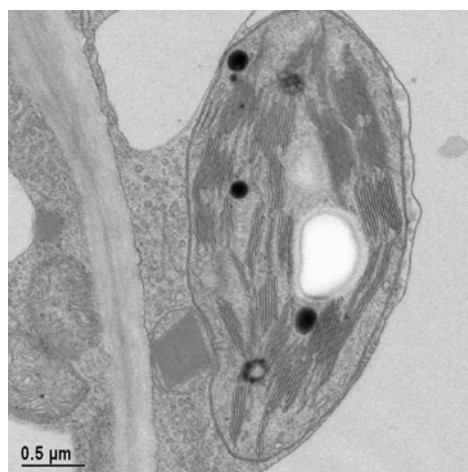
Na stebelni strani so bile celice videti metabolno aktivne. Med seboj so bile povezane s številnimi razvejanimi plazmodezmami (slika 30), vsebovale so zelo veliko ER, veliko Golgijevih aparatov in številne dobro razvite kloroplaste (slika 31), ki so obdajali nenavadno oblikovana ameboidna jedra celic (slika 32). Razgradnja pektinskih osrednjih lamel med celicami je v časovni korelaciji z izražanjem poligalakturonaznih genov, katerih proteinski produkti lamele razgrajujejo (slika 33).



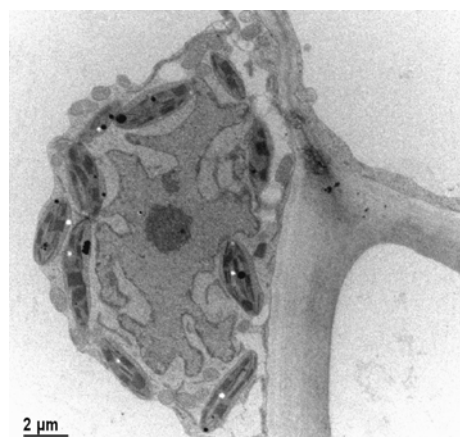
Slika 29: Prerez območja abscizije pri paradižniku, svetlobni mikroskop (Tušek in sod., 2009).



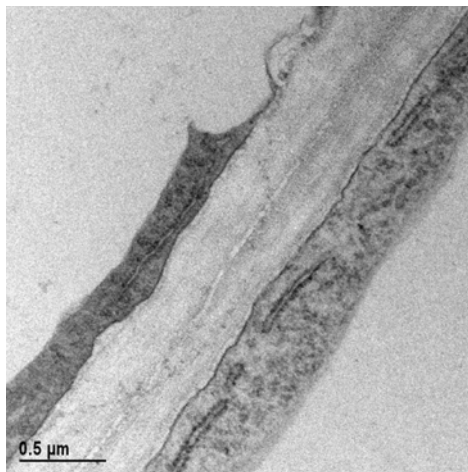
Slika 30: Na stebelni strani absizinskega območja lista paradižnika so pri treh do petih nizih celic razvite razvejane plazmodezme, ki so povezane s številnimi Golgijevimi aparati in ER, TEM (Tušek in sod., 2009).



Slika 31: Dobro razvit kloroplast na stebeli strani območja absizije absizinskega območja lista paradižnika, TEM. (Tušek in sod., 2009).

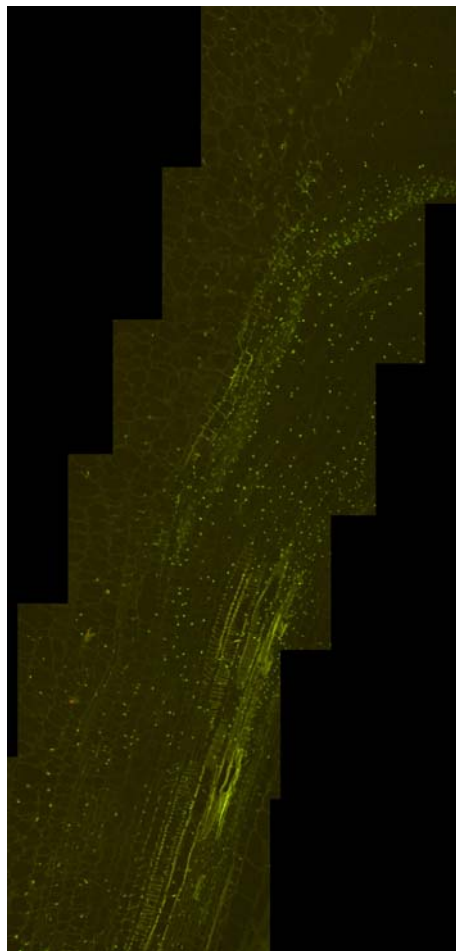


Slika 32: Ameboidno jedro s številnimi kloroplasti na stebelni strani absizinskega območja lista paradižnika, TEM. (Tušek in sod., 2009).

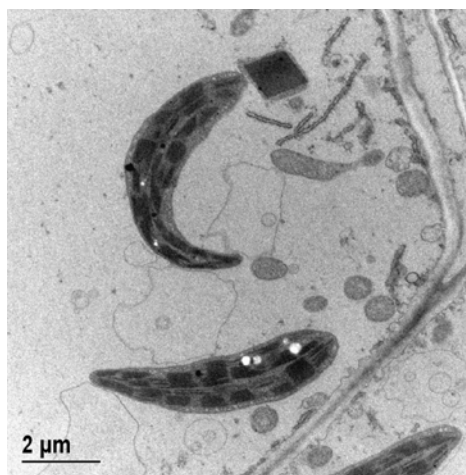


Slika 33: Na stebelni strani območja abskizije lista paradižnika se z delovanjem poligalakturonaz razgradi osrednja lamela med celicami in te po ločitvi ostanejo nepoškodovane, TEM (Tušek in sod., 2009).

V nasprotju s stebelno stranjo so celice na peceljni strani propadale z značilnimi znamenji PCS, kot je npr. pozitivna reakcija TUNEL in propadajoči kloroplasti (slika 34). Glede na veliko količino transkriptov za poligalakturonaze tudi na peceljni strani abskizinskega območja (slika 35) lahko sklepamo, da sodelujejo tudi pri razgradnji pektinskih molekul v osrednjih lamelah in/ali celičnih stenah na strani lista, ki bo propadla v programu PCS.



Slika 34: Barvanje TUNEL absizinskega območja lista paradižnika. Fluorescirajo jedra, ki so v procesu PCS. Zaradi avtofluorescence celičnih sten, je fluorescentni signal močan tudi v trahejnih elementih. (Kladnik A., 2009).



Slika 35: Dezintegrirani kloroplasti na peceljni strani absizinskega območja lista paradižnika, TEM (Tušek in sod., 2009).

5.2 SKLEPI

Izražanje gena za *RNazo LX* med procesom abscizije v listu paradižnika smo raziskovali z metodo PCR v realnem času, ki omogoča količinsko ovrednotenje mRNA v vzorcih. Metodo na Nacionalnem inštitutu za biologijo uporabljajo v diagnostiki različnih bakterij ali za proučevanje izražanja posameznih genov v izolirani RNA, a še ni bila vpeljana za določanje količine specifičnih mRNA v posameznih tkivih paradižnika. Z diplomskim delom smo uspešno prenesli in prilagodili obstoječo metodologijo za nove raziskave. Ponovno smo potrdili, da je metoda PCR v realnem času bistveno bolj občutljiva za detekcijo nukleinskih kislin, saj z njo zaznamo tako nizke koncentracije, ki so za druge metode pod mejo detekcije.

V nalogi smo potrdili hipotezo, da se *RNaza LX* izraža v abscizinskem območju in pokazali njeno specifično izražanje na peceljni strani območja.

Vzporedne raziskave potrjujejo, da je abscizija oblika PCS, ki pa poteka le na peceljni strani abscizinskega območja. V to PCS naj bi bila vključena tudi *RNaza LX*.

Potrdili smo hipotezo, da se količina transkripta za poligalakturonazi *TAPG1* in *TAPG4* časovno spreminja in je v korelaciji z razgradnjo osrednjih lamel med celicami v stebelnem delu abscizinskega območja. Pokazali smo tudi izjemno visoko raven izražanja genov za *TAPG1* in *TAPG4* na peceljni strani ter s tem njuno potencialno povezanost s PCS.

6 POVZETEK

Abscizija ali odpadanje delov rastline je fiziološki proces, ki je na molekulski ravni zelo slabo raziskan. Splošno je sprejeto, da je abscizija oblika programirane celične smrti (PCS), a raziskav in dokazov za to ni. Odpadanje delov rastline je posledica ločitve celic v abscizinskem območju. Pri listih je to območje na bazi listnega pecelja, kjer se ta stika s stebлом. Mesto ločitve celic je osrednja lamela, ki vsebuje velik delež pektinov. Hidrolizirajo jih poligalakturonaze, ki so le ene izmed mnogih proteinov, katerih količina se med abscizijo na tem območju poveča. Predhodne raziskave kažejo, da je v abscizijo vključena ribonukleaza LX (RNaza LX), a kako je prostorsko in časovno razporejena v abscizinskem območju ni znano. V diplomskem delu smo ugotavljali časovno in prostorsko razporeditev izražanja gena za RNazo LX v abscizinskem območju pecelja listov paradižnika, skupaj z genom za poligalakturonazi TAPG1 in TAPG4, ki naj bi prav tako sodelovali v procesu abscizije. Rezultati raziskave naj bi pomagali potrditi PCS v abscizinskem območju listov paradižnika. Za analizo izražanja genov v specifičnih celicah posebnih tkiv paradižnika smo prilagodili metodo PCR v realnem času.

Za raziskavo smo vzgojili 5 do 6 tednov star paradižnik (*Lycopersicon esculentum* Mill.) sorte VF36. Abscizijo prvih štirih ali petih najstarejših listov smo inducirali z rezanjem listnih ploskev in nato po 36 urah z izpostavitvijo rastlin etilenu za 6, 12, 24 ali 48h. V prvem poskusu smo s skalpelom rezali peceljno in stebelno stran abscizinskega območja ločeno ali pa skupaj. V drugem poskusu smo spremenili vzorčenje le toliko, da smo okoli abscizinskega območja zajeli manj okoljnega tkiva. V zadnjem poskusu smo vzorčili tako, da smo ločeno rezali peceljno in stebelno stran območja abscizije, ob tem zajeli manj okoljnega tkiva in vse vzorce stekali. Njihova masa je bila med 6 in 45 mg. Rastlinsko tkivo smo homogenizirali z napravo TissueLyser (Qiagen). Zaradi spremenjenega načina vzorčenja smo prilagodili protokol izolacije RNA. Namesto kompleta RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) smo pri manjših vzorcih uporabili komplet RNeasy Micro Kit (Qiagen). Koncentracijo izolirane RNA smo merili z inštrumentom Nanodrop 1000, njeno kakovost pa preverili z agarozno elektroforezo. RNA smo prepisali v cDNA s kompletom High Capacity cDNA archive kit (Applied Biosystems). Z metodo PCR v realnem času smo določali izražanje genov za RNazo LX in poligalakturonazi TAPG1 in TAPG4. Za RNazo LX smo načrtovali dva para začetnih oligonukleotidov, za poligalakturonazi TAPG1 in TAPG4 pa za vsako en par. Med reakcijo smo pomnožene produkte teh genov zaznavali z metodo SYBR Green I. Za normalizacijo podatkov smo izbrali gen za citokrom C oksidazo (COX). Zanj smo uporabili metodo zaznavanja pomnoženih produktov TaqMan. Iz pridobljenih Ct vrednosti smo izračunali relativno izražanje vseh treh tarčnih genov med abscizijo glede na intaktno kontrolo.

Pri prvem poskusu nismo mogli iz peceljnega dela abscizinskega območja izolirati celokupne RNA. Domnevali smo, da se *RNaza* izraža samo v nekaj plasteh celic abscizinskega območja zato smo za drug poskus prilagodili vzorčenje in izolacijo RNA. Tudi tokrat nismo mogli na peceljni strani izolirati RNA. Ker smo mislili, da je za to vzrok premajhna količina tkiva iz peceljne strani, smo pri tretjem poskusu vse vzorce stehtali. Pri tretjih najstarejših listih smo iz peceljne strani izolirali dovolj visoko količino RNA, da smo lahko izvedli PCR v realnem času. Ugotovili smo, da je bila količina transkripta *RNaza LX* po 6 in 12 urni indukciji z etilenom manjša na peceljni in stebelni strani abscizinskega območja. Z analizo disociacijskih krivulj smo ugotovili, da sta oba para začetnih oligonukleotidov za *RNazo LX* specifična. Z obema paroma smo dobili primerljive rezultate, vendar je bil drugi par bolj občutljiv. Z njim smo nadaljevali raziskavo v najstarejših listih paradižnika. Dokazali smo, da se po 12-urni indukciji abscizije z etilenom na peceljni strani abscizinskega območja količina transkripta *RNaze LX* glede na kontrolo ne spremeni, na stebelni strani pa se sedemkrat zmanjša. Po 48 urni indukciji se količina transkripta za *RNazo LX* na peceljni strani 30-krat poveča v primerjavi s kontrolo, na stebelni strani pa ostane približno enaka kot po 12 urni indukciji. Z analizo disociacijskih krivulj in relativnega izražanja smo potrdili, da se v procesu abscizije količina poligalakturonaznega transkripta TAPG4 poveča bistveno prej kot TAPG1, dokazali pa smo, da je po 48 urni indukciji abscizije z etilenom na peceljni strani količina transkripta TAPG1 približno 100-krat, TAPG4 pa približno 20-krat večja kot na stebelni strani.

Vpeljava metode PCR v realnem času za detekcijo izražanja genov v abscizinskem območju listov paradižnika je pomembno prispevala k boljšemu razumevanju abscizije na molekulski ravni. Skupaj z vzporednimi raziskavami smo pokazali, da se abscizinsko območje različno razvija na peceljni in stebelni strani ter da je le peceljna stran povezana s PCS.

7 VIRI

- Addicot F.T. 1982. Abscission. Berkley, University of California Press: 309 str.
- Andersen B., Smedsgaard J., Jørring I., Skouboe P., Pedersen L.H. 2006. Real-time PCR quantification of the AM-toxin gene and HPLC qualification of toxigenic metabolites from *Alternaria* species from apples. *International Journal of Food Microbiology*, 111, 2: 105-111
- Arko B. 2004. Tehnologija PCR v realnem času in možnost uporabe v laboratorijski diagnostiki in farmaciji. *Farmacevtski vestnik*, 2004, 55: 215-220
- Baebler Š., Krečič Stres H., Rotter A., Kogovšek P., Cankar K., Kok E., Gruden K., Kovač M., Žel, J., Pompe Novak M., Ravnikar M. 2009. PVY[*supra*]NTN elicits a diverse gene expression response in different potato genotypes in the first 12 h after inoculation. *Molecular Plant Pathology*, 10, 2: 263-275.
- Brown K. 1997. Ethylene and abscission. *Physiologia Plantarum*, 100, 3: 567-576
- Buh Gašparič M., Tengs T., La Paz J.L., Holst-Jensen A., Pla M., Esteve T., Žel J., Gruden K. 2010. Comparison of nine different real-time PCR chemistries for qualitative and quantitative applications in GMO detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396, 6: 2023–2029
- Bustin S.A. 2005. Real-time PCR. V: *Encyclopedia of diagnostic genomics and proteomics*. Vol. 2. Fuchs J., Podda M. (eds.). New York, Marcel Dekker: 1117-1125
- Campillo E., Lewis L.N. 1991. Identification and kinetics of accumulation of proteins induced by ethylene in bean abscission zones. *Plant Physiology*, 98, 3: 955–961
- Collazo C., Chacón O., Borrás O. 2006. Programmed cell death in plants resembles apoptosis of animals. *Biotechnología Aplicada*, 23: 1-10
- Cooper G. 2000. *The cell: a molecular approach*. 2nd ed. Washington, ASM Press: 689 str.
- Dermastia M. 2007. *Pogled v rastline*. Ljubljana, Nacionalni inštitut za biologijo: 237 str.
- Dreo T., Gruden K., Manceau C., Janse J.D., Ravnikar M. 2007. Development of a real-time PCR-based method for detection of *Xylophilus ampelinus*. *Plant Pathology*, 56, 1: 9-16
- Gachon C., Mingam A., Bénédicte C. 2004. Real-time PCR: what relevance to plant studies. *Journal of Experimental Botany*, 55, 402: 1445-1454
- Gonzalez-Carranza Z.H., Lozoy-Gloria E., Roberts J.A. 1998. Recent developments in abscission: shedding light on the shedding process. *Trends in Plant Science*, 3, 1: 10-14
- Gutiérrez-Aguirre I., Steyer A., Boben J., Gruden K., Poljšak-Prijatelj M., Ravnikar M. 2008. Sensitive detection of multiple rotavirus genotypes with a single reverse transcription–real-time quantitative PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 46, 8: 2547–2554

- Gutiérrez-Aguirre I., Mehle N., Delić D., Gruden K., Mumford R., Ravnikar M. 2009. Real-time quantitative PCR based sensitive detection and genotype discrimination of Pepino mosaic virus. *Journal of Virological Methods*, 162, 1-2: 46–55
- Hren M., Boben., Rotter A., Kralj P., Gruden K., Ravnikar M. 2007. Real-time PCR detection systems for Flavescence dorée and Bois noir phytoplasmas in grapevine: comparison with conventional PCR detection and application in diagnostics. *Plant Pathology*, 56, 5: 785–796
- Hren M., Nikolić P., Rotter A., Blejec A., Terrier N., Ravnikar M., Dermastia M., Gruden K. 2009. 'Bois noir' phytoplasma induces significant reprogramming of the leaf transcriptome in the field grown grapevine. *BMC Genomics*, 2009, 10: 460
- Hren M., Ravnikar M., Brzin J., Ermacora P., Carraro L., Bianco P.A., Casati P., Borgo M., Angelini E., Rotter A., Gruden K. 2009. Induced expression of sucrose synthase and alcohol dehydrogenase I genes in phytoplasma-infected grapevine plants grown in the field. *Plant Pathology*, 58, 1: 170-180
- Invitrogen. 2008. Real-time PCR from theory to practice. Carlsbad, Invitrogen: 37 str. <http://tools.invitrogen.com/content.cfm?pageid=12257> (september, 2010)
- Jost W., Bak H., Glund K., Terpstra P., Beintema J.J. 1991. Amino acid sequence of an extracellular, phosphate-starvation-induced ribonuclease from cultured tomato (*Lycopersicon esculentum*) cells. *European Journal of Biochemistry*, 198, 1: 1-6
- Kalaitzis P., Koehler S.M., Tucker M.L. 1995. Cloning of a tomato polygalacturonase expressed in abscission. *Plant Molecular Biology*, 28, 4: 647-656
- Kalaitzis P., Solomos T., Tucker M.L. 1997. Three different polygalacturonases are expressed in tomato leaf and flower abscission, each with a different temporal expression pattern. *Plant Physiology*, 113, 4: 1303-1308
- Kaletta K., Kunze I., Kunze G., Köck M. 1998. The peptide HDEF as a new retention signal is necessary and sufficient to direct proteins to the endoplasmic reticulum. *FEBS Letters*, 434, 3: 377-381
- Kladnik A., Chamusco K., Dermastia M., Chourey P. 2004. Evidence of programmed cell death in post-phloem transport cells of the maternal pedicel tissue in developing caryopsis of maize. *Plant Physiology*, 136: 3572-3581
- Kladnik A., Chamusco K., Chourey P., Dermastia M. 2005. *In situ* detection of programmed cell death in the maize caryopsis. *Periodicum Biologorum*, 107, 1: 11-16.
- Kladnik A. 2009. Barvanje TUNEL absizinskega območja pri paradižniku. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 1 slika
- Köck M., Stenzel I., Zimmer A. 2006. Tissue-specific expression of tomato ribonuclease LX during phosphate starvation-induced root growth. *Journal of Experimental Botany*, 57, 14: 3717–3726
- Kogovšek P., Gow L., Pompe-Novak M., Gruden K., Foster G.D., Boonham N., Ravnikar M. 2008. Single-step RT real-time PCR for sensitive detection and discrimination of Potato virus Y isolates. *Journal of Virological Methods*, 149, 1: 1–11

- Lehmann K., Hause B., Altmann D., Köck M. 2001. Tomato ribonuclease LX with the functional endoplasmic reticulum retention motif HDEF is expressed during programmed cell death processes, including xylem differentiation, germination, and senescence. *Plant Physiology*, 127: 463-449
- Lers A., Khalchitski A., Lomaniec E., Burd S., Green P.G. 1998. Senescence-induced RNases in tomato. *Plant Molecular Biology*, 36, 3: 439-449
- Lers A., Sonogo L., Green P.J., Burd S. 2006. Suppression of LX ribonuclease in tomato results in a delay of leaf senescence and abscission. *Plant Physiology*, 142: 710-721
- Lers A. 2009. Viability staining of the abscission zone tissue with Evans blue. Tel-Aviv, Agricultural Research Organisation: 1 slika
- Lim P.O., Kim H.J., Nam H.G. 2007. Leaf senescence. *Annual Review of Plant Biology*, 58: 115-136
- Livak K.J., Schmittgen T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods*, 25, 4:402-408
- Löffler A., Abel S., Jost W., Beintema J.J., Glund K. 1992. Phosphate-regulated induction of intracellular ribonucleases in cultured tomato (*Lycopersicon esculentum*) cells. *Plant Physiology*, 98: 1472-1478
- Löffler A., Glund K., Irie M. 1993. Amino acid sequence of an intracellular, phosphate-starvation-induced ribonuclease from cultured tomato (*Lycopersicon esculentum*) cells. *European Journal of Biochemistry*, 214, 3: 627-633
- Mishra A., Khare S., Trivedi P.K., Nath P. 2007. Ethylene induced cotton leaf abscission is associated with higher expression of cellulase (GhCel1) and increased activities of ethylene biosynthesis enzymes in abscission zone. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46, 1: 54-63
- Napier R.M. 2003. Auxins. V: Encyclopedia of applied plant sciences. Vol. 2. Thomas B. (ed.). Amsterdam, Academic Press: 985-995
- Nikolić P., Mehle N., Gruden K., Ravnika M., Dermastia M. 2010. A panel of real-time PCR assays for specific detection of three phytoplasmas from the apple proliferation group. *Molecular and Cellular Probes*, 24, 5: 303-309.
- Palavan-Unsal N., Buyuktuncer E.D., Tufekci M.A. 2005. Programmed cell death in plants. *Journal of Cell and Molecular Biology*, 4, 1: 9-23
- Pirc M., Ravnika M., Tomlinson J., Dreo, T. 2009. Improved fireblight diagnostics using quantitative real-time PCR detection of *Erwinia amylovora* chromosomal DNA. *Plant Pathology*, 58, 5: 872-881
- Procházková D., Wilhelmová N. 2007. Leaf senescence and activities of the antioxidant enzymes. *Biologia Plantarum*, 51, 3: 401-406
- Roberts J.A., Whitelaw C.A., Gonzalez-Carranza Z.H., McManus M.T. 2000. Cell separation in plants - models, mechanisms and manipulation. *Annals of Botany*, 86, 2: 223-235
- Roberts J.A., Elliot K.A., Gonzalez-Carranza Z.H. 2002. Abscission, dehiscence, and other cell separation processes. *Annual Review of Plant Biology*, 53: 131-158

- Rogers S.W., Rogers J.C. 1999. Cloning and characterization of a gibberellin-induced RNase expressed in barley aleurone cells. *Plant Physiology*, 119, 4: 1457-1464
- Schaller G.E. 2003. Ethylene. V: *Encyclopedia of applied plant sciences*. Vol. 2. Thomas B. (ed.). Amsterdam, Academic Press: 1019-1026
- Sexton R., Trewavas A.J. 1987. The control of abscission. V: *Models in plant physiology and biochemistry*. Vol. 2. Newman D.W., Wilson K.G. (eds.). Boca Raton, CRC Press: 149-151
- Taylor J.E., Whitelaw C.A. 2001. Signals in abscission. *New Phytologist*, 151, 2: 323-339
- Tušek-Žnidarič M., Kladnik A., Pompe Novak M., Dermastia M. 2009. Ultrastructural changes of cells in leaf abscission zone of tomato plant. V: MC 2009: [proceedings]. Vol. 2. Life Sciences: Microscopy Conference, Graz, Austria, 30 August - 4 September 2009, First Joint Meeting of Dreiländertagung & Multinational Congress on Microscopy. Pabst M.A., Zellnig G. (eds.). Graz, Verlag der Technischen Universität: 145-146
- Valasek M.A., Repa J.J. 2005. The power of real-time PCR. *Advances in Physiology Education*, 29: 151-159
- Yamada T., Ichimura K., van Doorn W.G. 2007. Relationship between petal abscission and programmed cell death in *Prunus yedoensis* and *Delphinium belladonna*. *Planta*, 226, 5: 1195-1205
- Young T.E., Gallie D.R. 2000. Programmed cell death during endosperm development. *Plant Molecular Biology*, 44, 3: 283-301
- Wang Y., Zhu W., Levy D.E. 2006. Nuclear and cytoplasmic mRNA quantification by SYBR green based real-time RT-PCR. *Methodes*, 39, 4: 356-362
- Weller S.A., Elphinstone J.G., Smith N.C., Boonham N., Stead D.E. 2000. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative, multiplex, real-time, fluorogenic PCR (TaqMan) assay. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 7: 2853-2858

ZAHVALA

