

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Maja KRIŽNIK

**VLOGA MALIH RNA (miRNA) PRI ODGOVORU
RASTLIN KROMPIRJA (*Solanum tuberosum* L.) NA
OKUŽBO S KROMPIRJEVIM VIRUSOM Y**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja Mikrobiologija

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Maja KRIŽNIK

**VLOGA MALIH RNA (miRNA) PRI ODGOVORU RASTLIN
KROMPIRJA (*Solanum tuberosum* L.) NA OKUŽBO S
KROMPIRJEVIM VIRUSOM Y**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij - 2. stopnja Mikrobiologija

**THE ROLE OF SMALLRNAs (miRNAs) IN THE RESPONSE OF
POTATO (*Solanum tuberosum* L.) TO INFECTION WITH POTATO
VIRUS Y**

M. SC. THESIS
Master Study Programmes: Field Microbiology

Ljubljana, 2014

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa 2. stopnje Mikrobiologija. Delo je bilo opravljeno na Nacionalnem inštitutu za biologijo, na Oddelku za biotehnologijo in sistemsko biologijo, Ljubljana.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorico magistrskega dela imenovala doc. dr. Blagajano Herzog Velikonja, za somentorico prof. dr. Kristino Gruden in za recenzentko doc. dr. Mojco Viršček Marn.

Mentorica: doc. dr. Blagajana Herzog Velikonja

Somentorica: prof. dr. Kristina Gruden

Recenzentka: doc. dr. Mojca Viršček Marn

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica : prof. dr. Darja ŽGUR BERTOK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: doc. dr. Blagajana HERZOG VELIKONJA
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

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

Članica: doc. dr. Mojca VIRŠČEK MARN
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svojega magistrskega dela na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je delo, ki sem ga oddala v elektronski obliki, identično tiskani verziji.

Maja Križnik

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du2
DK	UDK 578.2:578.864:633.491:581.2(043)=16.6
KG	virusi/ bolezni rastlin/ krompirjev virus Y/ PVY/ Désirée/ NahG-Désirée/ salicilna kislina/ miRNA/ molekularne tehnike/ RT-qPCR
AV	KRIŽNIK, Maja, dipl. biol. (UN)
SA	HERZOG VELIKONJA, Blagajana (mentorica)/ GRUDEN, Kristina (somentorica)/ VIRŠČEK MARN, Mojca (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij mikrobiologije
LI	2014
IN	VLOGA MALIH RNA (miRNA) PRI ODGOVORU RASTLIN KROMPIRJA (<i>Solanum tuberosum</i> L.) NA OKUŽBO S KROMPIRJEVIM VIRUSOM Y
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja Mikrobiologija)
OP	XIV, 89 str., 22 pregl., 23 sl., 95 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Z opazovanjem bolezenskih znamenj, zaznavanjem RNA virusa z obratnim prepisovanjem in verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (RT-qPCR) v enem koraku in zaznavanjem krompirjevega virusa Y N605 (PVY N605) z dodanim zelenim fluorescenčnim proteinom (GFP), smo analizirali širjenje in pomnoževanje virusa PVY N605 pri rastlinah sorte Désirée in transgenih rastlinah NahG-Désirée, ki ne vsebujejo salicilne kisline (SA). Ugotovili smo, da pomanjkanje SA bistveno vpliva na povečano občutljivost za virusno okužbo, kar se odraža v pojavu bolezenskih znamenj ter hitrejšem pomnoževanju virusa pri NahG-Désirée, medtem ko vsebnost SA v sorti Désirée ne preprečuje širjenja virusa. Prav tako smo pri analizi zgornjih neinokuliranih listih rastlin NahG-Désirée 11 in 18 dni po inokulaciji (dpi) zaznali hitrejšo pomnoževanje virusa PVY N605, v primerjavi z označenim virusom PVY N605-GFP. V interakciji med rastlino in virusom je lahko pomemben tudi regulatorni nivo malih RNA. Zato smo vpeljali metodo RT-qPCR v dveh korakih za analizo malih RNA (miRNA). Ugotovili smo, da na končni rezultat analize bistveno vpliva koncentracija RNA v reakciji obratnega prepisovanja, ponovljivost le-te in izbira referenčnega gena. S pomočjo RT-qPCR v dveh korakih smo določali količino petih izbranih miRNA pri dveh genotipsko različnih rastlinah krompirja pri zgodnjem odgovoru na okužbo. Ugotovili smo, da okužba rastlin sorte Désirée s PVY vodi v povečano količino miR168a, miR172a in miR390b, kar bi lahko igralo ključno vlogo pri vzpostavitvi tolerance na okužbo z virusom.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du2

DC UDC 578.2:578.864:633.491:581.2(043)=163.6

CX viruses/ plant diseases/ Potato virus Y/ PVY/ Désirée/ NahG-Désirée/ salicylic acid/ miRNA/ molecular techniques/ RT-qPCR

AU KRIŽNIK, Maja

AA HERZOG VELIKONJA, Blagajana (supervisor)/ GRUDEN, Kristina (co-advisor)/ VIRŠČEK MARN, Mojca (reviewer)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Microbiology

PY 2014

TY THE ROLE OF SMALL RNAs (miRNAs) IN THE RESPONSE OF POTATO (*Solanum tuberosum* L.) TO INFECTION WITH POTATO VIRUS Y

DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes: Field Microbiology)

NO XIV, 89 p., 22 tab., 23 fig., 95 ref.

LA sl

Al sl/en

AB To investigate replication and spread of the Potato virus Y N605 (PVY N605) in potato plants of cultivars Désirée and transgenic plants NahG-Désirée depleted in salicylic acid (SA) accumulation we monitored symptoms development, viral RNA amount with real-time reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) and fluorescence with the use of fluorescently labelled virus PVY N605 (PVY N605-GFP). We confirmed that the SA deficiency increase susceptibility to viral infection, which is reflected in the appearance of pronounced symptoms and faster replication of the virus in NahG-Désirée plants. Nevertheless, SA does not restrict the spread of the virus in cv. Désirée. We also observed faster multiplication of PVY N605 compared to PVY N605-GFP 11 and 18 days post inoculation (dpi). Additionally, miRNA regulatory level might be an important factor of plant immunity against the virus. We have established two-step (RT-qPCR) for the analysis of miRNA. We have found that final result of the analysis is affected by the concentration of the RNA in reverse transcription reaction, its repeatability as well as the choice of the reference gene used for normalization. We have studied the expression of five selected miRNA in two potato genotypes Désirée in NahG-Désirée in the early response to infection with PVY^{NTN}. We have found that the SA in plants Désirée leads to increased expression of miR168a, miR172a and miR390b, which could play a key role in the establishment of tolerance to infection against the virus.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PRILOG	XI
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XII
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 KROMPIR	3
2.2 VIRUS PVY	3
2.2.1 Organizacija genoma PVY in virusni proteini	4
2.2.2 Skupine različkov PVY in bolezenska znamenja	4
2.2.3 Odziv različnih sort krompirja na okužbo s PVY	5
2.2.4 Prenos, vstop in širjenje virusa	7
2.3 METODE ZA ZAZNAVANJE PVY	8
2.3.1 Encimski imunski test (ELISA)	8
2.3.2 Verižna reakcija s polimerazo v realnem času (qPCR)	8
2.3.3 Fluorescenčna mikroskopija	11
2.4 OBRAMBNI ODGOVOR RASTLINE	12
2.4.1 Vloga salicilne kisline	14
2.4.2 Vloga miRNA	16
2.5 KVANTITATIVNA ANALIZA miRNA	20
3 MATERIALI IN METODE	24
3.1 RASTLINSKI MATERIAL	24
3.1.1 Vzorci - pripravljen rastlinski material za analizo miRNA	24
3.1.2 Priprava rastlinskega materiala za preučevanje pomnoževanja in širjenja PVY-N605	25
3.1.2.1 Gojišča in raztopine za pripravo rastlinskega materiala	26
3.1.2.2 Mehanska inokulacija rastlin	26
3.1.2.3 Pobiranje rastlinskega materiala	27
3.2 SPREMLJANJE POJAVLJANJA BOLEZENSKIH ZNAMENJ	27
3.3 FLUORESCENČNA MIKROSKOPIJA	28
3.4 HOMOGENIZACIJA RASTLINSKEGA MATERIALA	28
3.5 IZOLACIJA RNA	28
3.5.1 Izolacija celokupne RNA s kompletom »MagMax™-96 Total RNA Isolation Kit« in z aparaturom »KingFisher«	28
3.5.2 Izolacija celokupne RNA z reagentom TRIzol	30
3.5.3 Izolacija celokupne RNA s kompletom »RNeasy Plant Mini Kit«	31
3.6 TRETIRANJE VZORCEV RNA Z ENCIMOM DNaza	32
3.7 MERJENJE KONCENTRACIJE, ČISTOSTI IN INTEGRITETE RNA	32
3.7.1 Pufri in reagenti za elektroforezo v agaroznem gelu	33

3.8 PCR V REALNEM ČASU	33
3.8.1 Analizirani pomnožki	33
3.8.2 RT- qPCR v dveh korakih	34
3.8.2.1 Obratno prepisovanje malih RNA	35
3.8.2.2 Obratno prepisovanje celotne populacije mRNA	35
3.8.2.3 qPCR	36
3.8.3 RT-qPCR v enem koraku	38
3.9 OBDELAVA PODATKOV IN STATISTIČNO VREDNOTENJE REZULTATOV	39
4 REZULTATI	41
4.1 POMNOŽEVANJE IN ŠIRJENJE VIRUSA PVY N605 PO RASTLINI	42
4.1.1 Bolezenska znamenja	42
4.1.2 Zaznavanje virusa PVY N605-GFP s fluorescenčno mikroskopijo	45
4.1.3 Določanje količine virusne RNA	46
4.2 VPELJAVA METODE KVANTITATIVNE ANALIZE miRNA	49
4.2.1 Primerjava načinov izolacije RNA	49
4.2.2 Testiranje učinkovitosti izolacije snoU6 RNA kot potencialne kandidatke za referenčno RNA	52
4.2.3 Vpliv količine RNA v vzorcu na obratno prepisovanje	54
4.2.4 Ponovljivost obratnega prepisovanja v analizi miRNA	56
4.2.5 Ponovljivost qPCR v analizi miRNA	58
4.2.6 Določanje dinamičnega območja qPCR v analizi miRNA	58
4.3 SPREMEMBE V KOLIČINI MOLEKUL miRNA PO OKUŽBI S PVY	59
4.3.1 miR168a	59
4.3.2 miR172a	60
4.3.3 miR390b	61
4.3.4 miR482a	61
4.3.5 miR5300	62
5 RAZPRAVA	63
5.1 POMNOŽEVANJE IN ŠIRJENJE VIRUSA PVYN605 PO RASTLINI	63
5.1.1 Bolezenska znamenja	64
5.1.2 Širjenje virusa	65
5.2 VPELJAVA METODE KVANTITATIVNE ANALIZE miRNA	67
5.3 DOLOČANJE KOLIČINE miRNA	73
6 SKLEPI	76
7 POVZETEK	78
8 VIRI	81
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Vzorci rastlinskega materiala, iz katerih smo izolirali RNA s pomočjo reagenta TRIzol	24
Preglednica 2: Vzorci rastlinskega materiala NahG-Désirée, iz katerih je bila RNA izolirana s pomočjo kompleta »RNeasy Plant Mini Kit«.....	25
Preglednica 3: Rastlinski material dveh genotipskih različic krompirja Désirée in NahG-Désirée za preučevanje širjenja in pomnoževanja virusa PVY N605 oz. PVY N605-GFP 26	
Preglednica 4: Priprava mešanic »Lysis/Binding Solution«, »Bead Mix« in »Diluted TURBO™ Dnase«.....	29
Preglednica 5: Shema nanosa raztopin na ploščico »KingFisher-96«.....	29
Preglednica 6: Priprava 10- μ l reakcijske mešanice za razgradnjo DNA	32
Preglednica 7: Nukleotidna zaporedja začetnih oligonukleotidov (F, R) in sond (P), specifična za pomnožek PVYuni-cDNA, ki so jih oblikovali Kogovšek in sod. (2008) in za pomnožek COX-cDNA, ki so jih oblikovali Weller in sod. (2000).....	34
Preglednica 8: Nukleotidna zaporedja analiziranih miRNA	34
Preglednica 9: Reakcijska mešanica za obratno prepisovanje z uporabo kompleta »TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit«.....	35
Preglednica 10: Reakcijska mešanica za obratno prepisovanje z uporabo kompleta »High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit«.....	36
Preglednica 11: Priprava reakcijske mešanice za pomnoževanje cDNA/ miRNA	36
Preglednica 12: Priprava reakcijske mešanice za pomnoževanje cDNA/ COX-mRNA.....	37
Preglednica 13: Priprava reakcijske mešanice za pomnoževanje cDNA/ St-snoU6 RNA..	37
Preglednica 14: Uporabljene redčine cDNA za qPCR.....	37
Preglednica 15: Reakcijski mešanici za pomnožek COX-cDNA in PVYuni-cDNA za RT-qPCR v enem koraku.....	38
Preglednica 16: Bolezenska znamenja pri rastlinah Désirée in NahG-Désirée po inokulaciji z neoznačenim in s proteinom GFP označenim virusom PVY N605 v treh časovnih točkah.	43
Preglednica 17: Statistična analiza razlik v relativni koncentraciji virusa v treh časovnih točkah v odvisnosti od genotipske različice virusa ali krompirja.....	48

Preglednica 18: Koncentracija in čistost RNA v vzorcih po izolaciji z reagentom TRIzol in s kompletoma »RNeasy Plant Mini Kit« in »MagMaxTM-96 Total RNA Isolation Kit«.. 50

Preglednica 19: Reakcijski parametri obratnega prepisovanja..... 55

Preglednica 20: Prikaz relativnega števila kopij posamezne miRNA v odvisnosti od uporabljene koncentracije RNA za obratno prepisovanje 55

Preglednica 21: Reakcijski parametri qPCR v analizi miRNA 59

Preglednica 22: Primerjalna analiza vsebnosti miRNA z RT-qPCR ali NGS..... 73

KAZALO SLIK

Slika 1: Prikaz zgradbe PVY. Virusni genom RNA obdan s številnimi kopijami plaščnega proteina (CP) (Swiss Institute of Bioinformatics, 2008)	4
Slika 2: Struktura genoma PVY (Sochor in sod., 2012).....	4
Slika 3: Obročasta nekroza gomoljev krompirja (PTNRD) (<i>Solanum tuberosum</i> L.), ki jo na občutljivih sortah krompirja povzroča PVY (USDA..., 2014)	5
Slika 4: Shematski prikaz možnih interakcij med rastlino in virusom (Kogovšek in Ravnikar, 2013: 5)	6
Slika 5: Shematski prikaz metode RT-qPCR z oligonukleotidi z zanko in hidrolizno sondo TaqMan za analizo miRNA. FP-smiselni začetni oligonukleotid, RP-protismiselni začetni oligonukleotid (Life Technologies Corporation, 2011:27).....	23
Slika 6: Shematični prikaz spodnjih inokuliranih in zgornjih neinokuliranih listov.....	27
Slika 7: Shema poteka eksperimentalnega dela.....	41
Slika 8: Bolezenska znamenja rastlin Désirée po okužbi z virusom PVY N605	42
Slika 9: Bolezenska znamenja rastlin NahG-Désirée po okužbi z virusom PVY N605	44
Slika 10: Slepo inokulirana rastlina krompirja NahG-Désirée in s PVY N605 okužena rastlina	44
Slika 11: Bolezenska znamenja rastlin NahG-Désirée po okužbi z virusom PVY N605. ..	45
Slika 12: Zaznavanje fluorescence proteina GFP.....	46
Slika 13: Fluorescenca zgornjega neinokuliranega lista rastline NahG-Désirée.....	46
Slika 14: Grafični prikaz relativnega števila kopij gena za plaščni protein PVY v odvisnosti od analizirane genotipske različice krompirja in časa po inokulaciji pri rastlinah: a) okuženih z virusom PVY N605 in b) okuženih z virusom PVY N605-GFP.	47
Slika 15: Preverjanje čistosti RNA z aparaturo »NanoDrop«..	50
Slika 16: Preverjanje kvalitete izolirane RNA z agarozno gelsko elektroforezo	51
Slika 17: Količina miR172a v primerjavi s COX-mRNA v odvisnosti od uporabljene metode izolacije RNA pri dveh analiziranih vzorcih RNA sort krompirja Désirée in PW363.	52

Slika 18: Količina miR172a v primerjavi z snoU6 RNA v odvisnosti od uporabljene metode izolacije RNA pri dveh analiziranih vzorcih RNA sort krompirja Désirée in PW363..	53
Slika 19: Količina snoU6 RNA v primerjavi s COX-mRNA v odvisnosti od uporabljene metode izolacije RNA pri dveh analiziranih vzorcih RNA sort krompirja Désirée in PW363.	54
Slika 20: Grafični prikaz razlik v ponavljanju obratnega prepisovanja različnih miRNA..	57
Slika 21: Grafični prikaz razlik v relativni količini cDNA-kopij miR482a med prvo in drugo qPCR vzorcev NahG-Désirée.....	58
Slika 22: Količina petih miRNA: a) normalizirano na COX-mRNA, b) normalizirano na snoU6 RNA pri rastlinah krompirja Désirée in NahG-Désirée po okužbi s PVY ^{NTN}	60
Slika 23: Količina petih miRNA: a) normalizirano na COX-mRNA, b) normalizirano na snoU6 RNA pri vzorcih rastlin NahG-Désirée v odvisnosti od vrste izolacije.	62

KAZALO PRILOG

Priloga A: Rastlinski material, ki smo ga uporabili za preučevanje širjenja in pomnoževanja PVY N605 in PVY N605-GFP v RT-qPCR v enem koraku

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A	absorbanca (absorbance)
AGO	protein družine Argonavi(protein argonaute)
gen COX	gen, ki ima zapis za citokrom oksidazo (cytochrome oxidase gene)
bp	bazni par (base pair)
CaMV	virus mozaika cvetače (Cauliflower mosaic virus)
cDNA	komplementarna DNA (complementary DNA)
CMV	virus mozaika kumar (Cucumber mosaic virus)
CP	plaščni protein (coat protein)
CV	koeficient variacije (coefficient of variation)
Cq	cikel kvantifikacije, kjer fluorescenca preseže nastavljeni prag (quantification cycle)
DIECA	dietilditiokarbamat (diethyldithiocarbamate)
DNA	deoksiribonukleinska kislina (deoxyribonucleic acid)
DNaza	deoksiribonukleaza (deoxyribonuclease)
dNTP	deoksiribonukleotid trifosfat (deoxyribonucleotide triphosphate)
dpi	dni po inokulaciji (days post inoculation)
E	učinkovitost pomnoževanja pri reakciji PCR v realnem času (efficiency)
EDTA	etilendiamintetraocentna kislina (ethylenediaminetetraacetic acid)
ELISA	encimski imunski test (enzyme-linked immunosorbent assay)
FAM	6-karboksi-fluorescein (6-carboxyfluorescein)
FP	smiselni začetni oligonukleotid (forward primer)
FRET	prenos fluorescenčne resonančne energije (fluorescence resonance energy transfer)
g	relativna centrifugalna sila (relative centrifugal force)
gDNA	genomska DNA (genomic DNA)
GFP	zeleni fluorescenčni protein (green fluorescent protein)
HR	preobčutljivostna reakcija (hypersensitive reaction)
HYL1	RNA vezavni protein, ki se povezuje z DCL (Hypostatic leaves 1)
LAR	lokalno pridobljena odpornost (local acquired resistance)
MGB	molekula, ki se veže na mali žleb DNA (minor groove binder)
miRNA	mikro RNA (micro RNA)
mRNA	informacijska RNA (messenger RNA)
NGS	določanje nukleotidnega zaporedja nove generacije (next-generation sequencing)
NO	dušikov oksid (nitric oxide)
nt	nukleotid (nucleotide)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (polymerase chain reaction)

pH	negativni logaritem koncentracije vodikovih ionov (negative logarithm of the hydrogen ion concentration)
PPV	virus šarke (Plum pox virus)
pre-miRNA	prekurzorska molekula mikro RNA (precursor of miRNA)
pri-miRNA	primarni prepis mikro RNA (primary transcripts of microRNA)
PTGS	post-transkripcijsko utišanje genov (post-transcriptional gene silencing)
PTNRD	obročasta nekroza gomoljev krompirja (potato tuber necrosis disease)
PVX	krompirjev virus X (Potato virus X)
PVY	krompirjev virus Y (Potato virus Y)
PVY ^N	nekrotičen sev virusa PVY (Potato virus Y ^N)
PVY ^{NTN}	nekrotičen različek NTN krompirjevega virusa Y (Potato virus Y ^{NTN})
R ²	koeficient determinacije (coefficient of determination)
RDV	»Rice dwarf virus«
RISC	RNA-inducirani utiševalni kompleks (RNA induced silencing complex)
RNA	ribonukleinska kislina (ribonucleic acid)
ROS	reaktivne kisikove zvrsti (reactive oxygen species)
ROX	6-karboksi-X-rodamin (6-Carboxyl-X-rhodamine)
RP	protismiselni začetni oligonukleotid (reverse primer)
rpm	obrati na minuto (revolutions per minute)
rRNA	ribosomska ribonukleinska kislina (ribosomal RNA)
RSV	»Rice stripe virus«
RT	obratno prepisovanje (reverse transcription)
RT-PCR	obratno prepisovanje in verižna reakcija s polimerazo (Reverse transcription polymerase chain reaction)
RT-qPCR	obratno prepisovanje in verižna reakcija s polimerazo v realnem času (real-time RT-PCR)
SA	salicilna kislina (salicylic acid)
SAG	β-O-D-glukozilsalicilna kislina (SA 2-O-β-D-glucoside)
SAR	sistemska pridobljena odpornost (systemic acquired resistance)
SHMV	virus mozaika ločnate krotalarije (Sunn-hemp mosaic virus)
siRNA	mala interferenčna RNA (small interfering RNA)
TAE	raztopina Trisa, acetata in EDTA (Tris-acetate-EDTA buffer)
TAMRA	6-karboksi-tetrametilrodamin (6-Carboxytetramethylrhodamine)
ta-siRNA	trans-delujoča siRNA (trans-acting siRNA)
TBSV	virus razraščanja in pritlikavosti paradižnika (Tomato bushy stunt virus)
TCV	virus kodravosti repe (Turnip crinkle virus)
T _m	temperatura taljenja, pri kateri je 50 % DNA v obliki enojne verige (melting temperature)
TMV	virus mozaika tobaka (Tobacco mosaic virus)

ToLCV	»Tomato leaf curl new delhi virus«
ToMV	virus mozaika paradižnika (Tomato mosaic virus)
UNG	uracil-N-glikozilaza (uracil-N-glycosylase)
UTR	neprevedljiva regija (untranslated region)
UV	ultravijolično (ultraviolet)

1 UVOD

Rastline so zaradi pritrjenega načina življenja izpostavljene najrazličnejšim oblikam stresa, ki vpliva na njihovo preživetje, razmnoževanje, rast in razvoj. Posledice stresa se odražajo v zmanjšanju kakovosti in količine pridelka, kar je zlasti pomembno pri pridelovanju ekonomsko donosnih poljščin kot je krompir (*Solanum tuberosum* L.), ki ga prav tako kot ostale rastline napadajo številni škodljivci in povzročitelji bolezni (bakterije, glive in virusi). Med virusnimi okužbami je gospodarsko najbolj pomembna okužba s krompirjevim virusom Y (PVY).

Razumevanje kompleksne interakcije med krompirjem in PVY je že dolgo časa predmet intenzivnih raziskav, saj je ključno za iskanje rešitev za varstvo rastlin, s čimer bi preprečili izgube pridelka. Pri tem je pomembno preučevanje širjenja in pomnoževanja virusa v rastlini, za kar obstaja več pristopov, ki nam omogočajo vpogled. Pri raziskovalnem delu smo preučevali širjenje in pomnoževanje PVY iz skupine N (izolat PVY N605). Opazovali smo pojav bolezenskih znamenj, uporabili metodo obratnega prepisovanja in verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (RT-qPCR) ter spremljali širjenje virusa z dodanim zelenim fluorescenčnim proteinom (GFP).

Znano je, da imajo pri odgovoru na okužbo z virusi pomembno vlogo hormoni, predvsem salicilna kislina (SA), ki povzroči kopičenje obrambnih snovi in zavira razširjanje virusa po rastlini. Eden od pogosto uporabljenih načinov za preučevanje njene vloge predstavlja uporaba transgenih rastlin, ki zaradi gena *nahG* niso sposobne akumulacije SA. Iz posledic, ki jih ima pomanjkanje SA pri teh rastlinah, lahko sklepamo na njeno vlogo v obrambnem odgovoru proti virusom.

V zadnjem času so ugotovili, da imajo pomembno vlogo pri odgovoru na okužbe z virusi tudi male RNA, mikro RNA (miRNA), kratke, nekodirajoče molekule, ki sodelujejo v post-transkripcijskem utišanju genov (PTGS) in s tem nadzorujejo številne biološke procese celične proliferacije, diferenciacije in smrti. Na podlagi poznavanja nukleotidnih zaporedij miRNA in razvoja metode RT-qPCR je v današnjem času mogoča tudi analiza miRNA.

1.1 NAMEN DELA

Namen dela je bil opazovati pojavljanje in oblike bolezenskih znamenj, pomnoževanje in širjenje PVY N605 pri genotipsko različnih rastlinah krompirja Désirée in NahG-Désirée. Glede na morebitne razlike v pomnoževanju PVY N605 in pojavu bolezenskih znamenj pri genotipsko različnih rastlinah krompirja bi lahko sklepali na pomembnost oz. vlogo SA pri obrambi krompirja proti virusu. Razlike smo zaznavali z opazovanjem bolezenskih

znamenj, z uporabo RT-qPCR in fluorescenčno označenega virusa PVY N605-GFP. Pridobljeni rezultati bi lahko pripomogli k bolj natančni razlagi odnosa med rastlino in virusom, kjer je ključnega pomena tudi vedenje o tem, v kateri fazi in kako hitro se virus širi od mesta okužbe.

Prav tako je bil namen dela vpeljati metodo RT-qPCR v dveh korakih za analizo miRNA. Znano je namreč, da lahko na rezultat RT-qPCR vpliva več parametrov kot so metoda izolacije in koncentracija RNA (ribonukleinskih kislin), ponovljivost obratnega prepisovanja in qPCR ter izbira referenčnega gena. Vpeljana metoda bo omogočila analizo miRNA in določanje količine izbranih miRNA pri dveh genotipsko različnih rastlinah krompirja pri zgodnjem odgovoru na okužbo, saj gre v tem času za dejanski obrambni odgovor rastline in ne za posledico okužbe.

1.2 HIPOTEZE

Predvidevali smo, da bodo transgene rastline NahG-Désirée, ki niso zmožne akumulacije SA, bolj dovzetne in občutljive za okužbo s PVY N605, v primerjavi z netransgenimi rastlinami, kar se lahko kaže v obliki močnejšega pojavljanja bolezenskih znamenj in hitrejšega pomnoževanja ter širjenja virusa. Poleg tega smo predpostavljali, da bo pojavljanje bolezenskih znamenj in širjenje virusa tudi v primeru okužbe s PVY-GFP pri obeh preučevanih genotipsko različnih rastlinah krompirja različno.

Predvidevali smo, da bodo nekateri od preizkušenih parametrov, ki vplivajo na RT-qPCR, vplivali tudi na rezultat preučevanja miRNA po okužbi, ter da se bo količina miRNA po okužbi z virusom spremenila in bo situacija drugačna pri Désirée kot pri NahG-Désirée, saj naj bi bila regulacija izražanja na nivoju miRNA močno povezana tudi s hormonsko regulacijo.

2 PREGLED OBJAV

2.1 KROMPIR

Krompir (*Solanum tuberosum* L.) je gomoljnica in sodi v družino razhudnikovk (*Solanaceae*). Je zel s stebli, katere nadzemni del zraste do 1 meter visoko in ima liho pernate liste. Cvetovi so beli do vijoličasti, v oblikah socvetij, ki dosežejo premer do 2,5 cm. V primerjavi z drugimi razhudniki, ki oblikujejo užitne plodove nad zemljo, je pridelek pri krompirju gomolj, odebeljeni podzemni del stebela. Ljudje ga gojimo zaradi potrebe po hrani in krmi za domače živali. Krompir izvira iz Južne Amerike, natančneje iz perujskih Andov, od koder so ga v 16. stoletju v Evropo prinesli španski osvajalci, k nam pa je prišel v času vladanja Marije Terezije (Kocjan Ačko in Goljat, 2005). Krompir danes gojijo po vsem svetu, zato je po razširjenosti pridelovanja poleg riža, koruze in žita uvrščen med štiri najpomembnejše poljščine na svetu (Singh in sod., 2008).

Na svetu trenutno obstaja več tisoč različnih sort krompirja. V primerjavi s samoraslim večletnim krompirjem so gojene sorte enoletne, večina jih spada v vrsto *Solanum tuberosum*. Razlikujejo se po videzu in po bioloških lastnostih za rast ter razvoj, kot so potrebe po toploti, vlagi, svetlobi, hranilih ter po odpornosti proti povzročiteljem bolezni in škodljivcem (Kocjan Ačko in Goljat, 2005). Za pridelovalce krompirja je pomembno, da je sorta rodovitna, prilagojena klimatskih pogojem rasti in odporna proti čim širšemu spektru povzročiteljem bolezni. Pridelovalci vsako leto nekaj sort opustijo, prav tako se vsako leto pojavijo nove sorte kot rezultat dela žlahtniteljev. Včasih je bila med najbolj priljubljenimi in razširjenimi srednje pozna sorta Igor, ki pa je bila zaradi okužbe s PVY izrinjena iz pridelave (Kus, 1994). Danes je ena izmed najbolj razširjenih sort krompirja sorta Désirée.

2.2 VIRUS PVY

PVY spada v družino *Potyviridae* in rod *Potyvirus* ter je med najbolj preučevanimi rastlinskimi virusi in eden od petih najpomembnejših rastlinskih povzročiteljev bolezni, ki zmanjšuje donos in kakovost poljščin. Velja za ekonomsko najpomembnejši in najnevarnejši virus, ki vpliva na pridelavo krompirja po celem svetu. Izpade pridelka pa povzroča tudi pri drugih predstavnikih iz družine razhudnikovk kot so tobak (*Nicotiana tabacum*), paprika (*Capsicum annuum*) in paradižnik (*Solanum lycopersicum*) in okužuje tudi nekatere vrste iz družin nebinovk (*Asteraceae*), križnic (*Brassicaceae*), lobodovk (*Chenopodiaceae*), ščitnic (*Amaranthaceae*), komelinovk (*Commelinaceae*) in metuljnic (*Fabaceae*) (Warren in sod., 2005).

2.2.1 Organizacija genoma PVY in virusni proteini

PVY je paličast, rahlo upognjen virus, z dolžino 680-900 nm in premerom 11-15 nm. Genom predstavlja linearna, enoverižna, pozitivno usmerjena molekula RNA, dolga približno 10 kilobaz in predstavlja 5 % mase delca, ki jo obdaja približno 2000 kopij plaščnega proteina (CP) (Slika 1) (Urcuqui-Ichima in sod., 2001).



Slika 1: Prikaz zgradbe PVY. Virusni genom RNA obdan s številnimi kopijami plaščnega proteina (CP) (Swiss Institute of Bioinformatics, 2008)

Na 5'-koncu RNA genoma je kovalentno vezan protein Vpg, ki omogoča začetek podvojevanja verige RNA. 3'-konec genoma je poliadeniliran (poli(A)) rep. Virusna RNA se prevede v en sam 340-370 kDa velik poliprotein, ki se med in po translaciji avtoproteolitično razcepi na deset proteinov. Trije izmed njih imajo proteazno aktivnost (P1, Hc-Pro, NIa), NIb je virusna od RNA odvisna RNA-polimeraza, ostali proteini P3, 6K1, CI, 6K2 in Vpg pa sodelujejo pri pomnoževanju virusne RNA in premikanju virusa po rastlini. Edini strukturni protein CP tvori plašč virusnega delca (Revers in sod., 1999). Poleg tega ima pomembno vlogo pri prenosu virusa z listnimi ušmi, premikanju virusa po rastlini in reguliranju pomnoževanja virusa (Urcuqui-Ichima in sod., 2001). Nedavno so odkrili še enajsti protein P3N-PIPO, ki naj bi nastal zaradi zamika bralnega okvira pri translaciji in sodeluje pri premikanju virusa med celicami (Slika 2) (Vijayapalani in sod., 2012).



Slika 2: Struktura genoma PVY (Sochor in sod., 2012)

2.2.2 Skupine razlikov PVY in bolezenska znamenja

PVY spada v eno najbolj genetsko raznolikih skupin znotraj rastlinskih virusov. Med pomnoževanjem genoma namreč prihaja do izmenjave genetskega materiala med različki preko rekombinacij, poleg tega encim od RNA odvisna RNA-polimeraza nima mehanizmov kontrolnega branja (»proofreading«), zaradi česar je precejšnja pojavnost mutacij (Kogovšek in Ravnikar, 2013).

Posledice so vidne v pojavu številnih različkov virusa, ki jih uvrščamo v več skupin: PVY^O, PVY^C, PVY^N, PVY^Z, PVY^E. Virusi skupin PVY^O so splošno razširjeni. Pri krompirju sprožijo nastanek blagih do hudih nekroz na listih in steblih, pojav milega mozaika in odpadanje listov. Bolezenska znamenja, ki se pojavijo na tobaku se kažejo v obliki mozaika in gubanja listov. Virusi skupine PVY^N sprožijo nastanek blagega mozaika, prav tako tudi razvoj hudih žilnih, stebelnih nekroz in nekroz na listnih pecljih. Pri sortah, ki imajo gen za odpornost proti virusu, ne pride do sprememb (Singh in sod., 2008). Na tobaku sprožijo nastanek močnih nekroz in gubanje ter hitrejše propadanje listov (Nie in sod., 2012).

V zadnjem času se je pojavilo več novih različkov PVY^{NTN}, PVY^W, PVY^Z in PVY^N. Najbolj znan in preučevan je različek PVY^{NTN}, ki se serološko bistveno ne razlikuje od različka PVY^N. Nastal naj bi z rekombinacijo med virusi skupin PVY^N in PVY^O. Gre za najhujši različek PVY, ki povzroča ogromne izgube predvsem pri pridelavi krompirja in tobaka. Na rastlinah krompirja povzroča nastanek obročkastih kloroz in nekroz. Na gomoljih se razvijejo obročkaste nekroze, zaradi katerih je bolezen dobila ime obročkasta nekroza gomoljev krompirja (Slika 3). Na tobaku sproži nastanek žilnih nekroz in mozaika (Singh in sod., 2008).



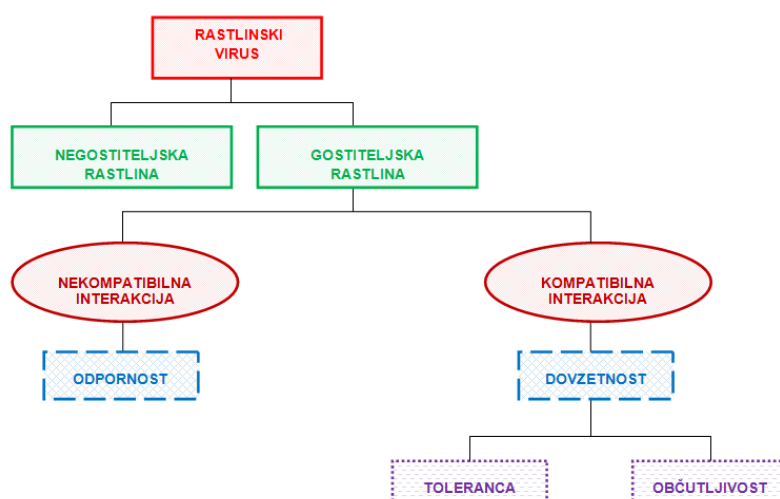
Slika 3: Obročasta nekroza gomoljev krompirja (PTNRD) (*Solanum tuberosum* L.), ki jo na občutljivih sortah krompirja povzroča PVY (USDA..., 2014)

2.2.3 Odziv različnih sort krompirja na okužbo s PVY

Pojav in intenziteta bolezenskih znamenj nista odvisna le od tipa virusnega različka, ampak tudi od vrste gostiteljske rastline in njenega genotipa. Določen patogen lahko namreč okuži le določene rastlinske vrste. Rastline, ki niso gostitelji za določen virus, preprečijo odstranjevanje plaščnega proteina, sintezo virusnih proteinov, preprečujejo kopičenje virusa in ne razvijejo bolezenskih znamenj. Pri rastlinah, ki so gostitelji pa je lahko interakcija z virusom bodisi kompatibilna bodisi nekompatibilna (Slika 4). Pri kompatibilni interakciji so rastline dovzetne za okužbo, pri njih pride do razvoja bolezenskih znamenj, kar je posledica sposobnosti virusa, da obide obrambne mehanizme rastline. Čeprav

obramba rastline v tem primeru ni učinkovita, je odgovor na okužbo vseeno prisoten in prav tako kot pri nekompatibilni interakciji kompleksen, a verjetno gre za prešibak in/ali prepočasen odgovor, da bi preprečil širjenje virusa in razvoj bolezenskih znamenj (Kogovšek in Ravnikar, 2013).

Za okužbo dovzetne rastline so lahko bodisi tolerantne ali občutljive. Ena najbolj občutljivih sort za PVY^{NTN} je sorta Igor, ki na okuženih listih razvije številne lokalne klorozne obročke, okolica kloroz postane rumena in klorozni obročki se spremenijo v nekroze, kar vodi v hitro propadanje lista. Na listnih peceljih in stebelu se lahko pojavijo tudi črtaste nekroze. Rastline v primerjavi z zdravimi hitreje rumenijo, predčasno odmirajo in kažejo bolezenska znamenja palmovega drevesa. Po približno desetih dneh po okužbi so na rastlinah prisotni le še zgornji listi, na katerih se pojavlja mozaik in gubanje listne površine (Mehle in sod., 2004). Bolezenska znamenja so vidna tudi na vseh gomoljih v obliki obročkastih nekroz. Sekundarno okužene rastline, ki zrastejo iz okuženih gomoljev kažejo mozaik, nekroze na poganjkih in okrog žil ter so velikokrat deformirane (Kogovšek in Ravnikar, 2013).



Slika 4: Shematski prikaz možnih interakcij med rastlino in virusom (Kogovšek in Ravnikar, 2013: 5)

Pri tolerantni sorti Pentland Squire okužba s PVY^{NTN} ne sproži niti lokalnih niti sistemskih bolezenskih znamenj, čeprav lahko rastline kopičijo visoke koncentracije virusa (Mehle in sod., 2004). Prav tako pod tolerantne sorte spada sorta Désirée. Inokulirani in zgornji neinokulirani listi poleg rumenenja razvijejo le blage nekroze (Mehle in sod., 2004; Baebler in sod., 2011).

Pri nekompatibilni interakciji so rastline odporne proti okužbi. Na PVY^{NTN} odporne sorte, kot sta sorti Sante in Rywal, omejijo virus na primarno mesto okužbe, preprečujejo njegovo pomnoževanje in sistemsko razširjanje ter ne izražajo bolezenskih znamenj

(Kogovšek in Ravnikar, 2013). Virus se lahko pomnoži v okuženi celici in premakne le v nekaj sosednjih celic. Po 24 urah po inokulaciji virus v rastlini ni več prisoten (Mehle in sod., 2004).

Odpornost proti PVY omogočajo geni odpornosti Ry in Ny. Prvi izvirajo iz *Solanum tuberosum* subsp. *andigena* ali iz divje vrste *Solanum stoloniferum* in *Solanum chacoense*, gene Ny pa vsebujejo le določene sorte krompirja (Kogovšek in Ravnikar, 2013).

2.2.4 Prenos, vstop in širjenje virusa

Škoda, ki jo virus povzroča na krompirju ni enkratna, ampak trajna, saj se virus prenaša z vegetativnim razmnoževanjem, pri čemer iz gomoljev zraste nova generacija okuženih rastlin. S tem prihaja do izrojevanja krompirja (Arends in Kus, 1999), ki se navadno pokaže že med rastjo z okužbami in poškodbami nadzemnega dela rastline. Iz leta v leto je vse več okužb na izkopanih gomoljih, ki dajejo vse manjši pridelek na hektar (Kocjan Ačko in Goljat, 2005).

Najhitrejši in najtežje obvladljiv način prenosa PVY v naravi predstavlja prenos z listnimi ušmi. Listna uš ob okušanju rastlinskega soka okužene rastline že v nekaj sekundah pridobi virusne delce, ki jih nato prenese na zdrave rastline, tudi nekaj kilometrov daleč. Virus se v žuželki ne razmnožuje, ampak zgolj prenaša na njenem ustnem aparatu. Z nekaj zaporednimi vbodi v zdravo tkivo rastline kužnost žuželke mine (Warren in sod., 2005).

PVY vstopi v rastlino skozi mehanske poškodbe ali s pomočjo listnih uši. Po vstopu virusa v celico se najprej virusna RNA loči od proteinskega plašča, sledi translacija, pri kateri je virusna pozitivno usmerjena RNA kot informacijska RNA (mRNA). Sintezi proteinov sledi podvojevanje genoma, pri čemer encim od RNA odvisna RNA-polimeraza najprej sintetizira komplementarno negativno usmerjeno RNA, ki je potem kot matrica za sintezo novih pozitivno usmerjenih RNA. Po sintezi virusne RNA in proteinov se virusni delci sestavijo in tvorijo cele virusne delce, ki se lahko širijo iz ene celice v drugo skozi plazmodezme in vse do prevodnega tkiva (običajno do floema). Po vstopu v prevodni sistem se virus lahko sistemsko razširi po celotni rastlini (Carrington in sod., 1996). Hitrost širjenja v zgornje liste in korenine naj bi bila enakomerna in neodvisna od občutljivosti sorte krompirja (Mehle in sod., 2004).

Širjenje virusa je povezano s širjenjem fotoasimilatov. Ti nastajajo v listih, ki aktivno fotosintetizirajo, in nato potujejo v predele rastline, ki te fotoasimilate porabljajo (Mas in Pallas, 1996). Podobno kot se fotoasimilati v splošnem prenašajo iz spodnjih listov rastline v korenine in iz zgornjih listov rastline v razvijajoče poganjke, je širjenje virusov odvisno od položaja okuženih listov, ki delujejo kot vir za nadaljnjo sistemsko okužbo (Gilbertson in Lucas, 1996).

A pomembno se je zavedati, da količina virusa v rastlini ni vedno odvisna od občutljivosti sorte. To so pokazali Mehle in sod. (2004) z raziskavo na treh različno odpornih sortah. Ugotovili so, da se virus najbolj namnoži v tolerantni sorti Pentland Squire in pri manj občutljivi sorti Desirée kot pri zelo občutljivi sorti Igor. Kaže, da je bolj pomembna dinamika virusnega pomnoževanja, saj so najbolj očitne razlike med fenotipi (simptomatski, asimptomatski) v začetni fazi virusnega pomnoževanja in v razvoju prvih lokalnih bolezenskih znamenj (Mehle in sod., 2004).

2.3 METODE ZA ZAZNAVANJE PVY

Za spremljanje širjenja PVY po rastlini obstajajo različne metode. Najbolj enostavna vključuje spremljanje pojavljanja in oblik bolezenskih znamenj na listju in gomoljih, vendar je takšno določanje virusa dolgotrajno in zahtevno. Prav tako ni uporabno v primeru preučevanja tolerantnih rastlin, ki navzven ne kažejo znakov okužbe, zato je nujna uporaba bolj specifičnih metod (Mehle in sod., 2004), ki vključujejo bodisi določanje prisotnosti virusnih proteinov kot je virusni plaščni protein (encimski imunski test, prenoswestern) bodisi zaznavanje popolnih virusnih delcev z elektronsko mikroskopijo ali določanje in kvantifikacijo virusnih nukleinskih kislin (RT-qPCR).

2.3.1 Encimski imunski test (ELISA)

Za zaznavo virusa v rastlini se lahko poslužujemo seroloških metod, kot je npr. ELISA, ki temelji na reakciji med virusnim antigenom, ki ga predstavlja virusni plaščni protein, in za antigen specifičnimi protitelesi. Reakcijo zaznamo kot obarvanje vzorca zaradi hidrolize kromogenega substrata z encimom. Gre za eno najpogostejše uporabljenih metod za zaznavanje rastlinskih virusov. Je enostavna, cenovno ugodna in ponovljiva metoda. Vendar ima nižjo občutljivost v primerjavi z RT-PCR in zato ni primerna za določanje virusa v tkivih, ki vsebujejo le majhno število virusov, kot so gomolji in korenine. Za metodo izbire velja PCR, saj je občutljivost le-te 10^5 - 10^7 -krat večja v primerjavi z ELISA, prav tako s slednjo ni mogoče ločiti med različki PVY^{NTN} in PVY^N (Kogovšek in sod., 2008).

2.3.2 Verižna reakcija s polimerazo v realnem času (qPCR)

Verižna reakcija s polimerazo je metoda za hitro pomnoževanje specifičnih odsekov DNA (deoksiribonukleinske kisline) *in vitro*. Razvoj metode je pomenil velik napredek v molekularni biologiji, saj je pripomogla k rešitvi mnogih problemov kot so ugotavljanje genske stabilnosti, zaznavanje povzročiteljev bolezni in polimorfizmov, kloniranje DNA ter analiza izražanja genov (Klein, 2002).

Nadgradnja klasične PCR je qPCR, ki temelji na zaznavanju fluorescence pomnoževanega tarčnega odseka DNA med samo reakcijo pomnoževanja. Pomembna razlika metode PCR v realnem času od klasične metode PCR je v tem, da omogoča kvantifikacijo tarčnega odseka DNA v preiskovalnem vzorcu, saj je od začetnega števila kopij tarčnega zaporedja nukleinske kisline odvisno, koliko ciklov bo potrebnih, da lahko zaznamo fluorescenco poročevalske molekule (Bustin in sod., 2005). PCR v realnem času prav tako ne zahteva dodatne obdelave po pomnoževanju, kot je ločevanje pomnožkov v agaroznem gelu, zato se izognemo možnostim navzkrižne kontaminacije (Valasek in Repa, 2005).

Reakcija poteka v cikličnem termostatu in je sestavljena iz 3 faz:

- denaturacije DNA pri temperaturi 90-95 °C,
- prileganje začetnih oligonukleotidov na komplementarno zaporedje na enoverižni DNA pri temperaturi 40-60 °C (odvisno od nukleotidnega zaporedja začetnih oligonukleotidov in sonde),
- podaljševanje komplementarne verige DNA s polimerazo DNA pri temperaturi 72 °C

Za sledenje pomnožkov obstaja več načinov, ki ji razdelimo na nespecifične in specifične. Nespecifični način zaznavanja vključuje uporabo interkalirajočih barvil, kot je SYBR Green, ki se vežejo na vsako novo nastalo dvoverižno DNA, kar povzroči 1000-krat večjo emisijo fluorescence v primerjavi z nevezano molekulo v raztopini. Večja kot je količina dvoverižne DNA, večja bo fluorescenca. Pomanjkljivost metode je v tem, da zaznavamo tudi nespecifične produkte in dimere začetnih oligonukleotidov, kar povzroča napake pri kvantifikaciji. Zato je potrebno po reakciji preveriti specifičnost nastalih pomnožkov s talilno krivuljo (Valasek in Repa, 2005).

Pod specifične načine zaznavanja uvrščamo uporabo hidrolizne sonde Taqman, ki se specifično veže na tarčni odsek pomnožka med obema začetnima oligonukleotidoma in ima na 5'-koncu vezano fluorescentno reportersko barvilo, npr. FAM (6-karboksi-fluorescein) ter na 3'-koncu vezano fluorescentno dušilno barvilo, npr. TAMRA (6-karboksi-tetrametilrodamin). Ko je sonda intaktna prihaja do fluorescentnega resonančnega prenosa energije (FRET) iz reporterskega na dušilno barvilo, zato ne fluorescira. Po začetku podaljševanja polimeraza zaradi svoje 5'-eksonukleazne aktivnosti razgrajuje sondo, zaradi česar se reportersko barvilo loči od dušilnega. Posledica tega je fluorescenca reporterskega barvila, ki narašča sorazmerno z nastajanjem pomnožka (Benes in Castoldi, 2010). Poleg zgoraj omenjene obstajajo tudi sonde Taqman MGB, ki imajo nefluorescentno dušilno barvilo ter na 3'-koncu vezano molekulo MGB (minor groove binder), ki se z visoko afiniteto veže na mali žleb DNA. Sonde Taqman MGB imajo lahko zaradi te modifikacije višje temperature prileganja začetnih oligonukleotidov (T_m) in so lahko krajše, zaradi česar so tudi bolj specifične (Bustin, 2002).

Poleg omenjenih reagentov reakcije vsebujejo termostabilno polimerazo DNA (polimeraza Taq; encim iz bakterije *Thermus aquaticus*) in pasivno referenčno barvilo ROX (6-karboksi-X-rodamin), s katerim normaliziramo fluorescentni signal (Wong in Medrano, 2005) ter encim uracil-DNA glikozilazo, ki razgrajuje dvoverižne nukleinske kisline z uracilom. S tem se uničijo pomnožki predhodnih reakcij, ker so dvoverižne molekule in vsebujejo uracil, ne pa tarčne DNA, ki vsebujejo timin (Longo in sod., 1990).

Metoda je zelo občutljiva in hitra, saj zaznava že manj kot pet kopij tarčnega zaporedja, kar omogoča analizo majhnih vzorcev in ima širok dinamični obseg kvantifikacije (7 redov velikosti). To omogoča simultano primerjalno analizo velikega števila vzorcev z različnimi količinami DNA (Heid in sod., 1996). A ima tudi omejitve. Pomnoževanje motijo določene inhibitorne substance, prisotne v bioloških vzorcih, kot so fenoli, celuloza, urea, hemoglobin itd. Potencialna rešitev je bodisi uporaba za inhibitorne substance neobčutljivih alternativnih polimeraz ali uporaba bolj redčenih vzorcev (Valasek in Repa, 2005).

Za preučevanje izražanja genov in za zaznavanje virusov RNA je pred qPCR potrebno še obratno prepisovanje RNA v cDNA. Uspešnost metode je odvisna od integritete RNA. Slednja je v primerjavi z DNA izredno nestabilna, zato morajo biti vsi postopki skrbno izvedeni, da se doseže relevantnost analize. Dokazano je namreč, da se v primeru razgrajene RNA zaporedja, ki so bližje repu poli-A, učinkoviteje prepisujejo kot tiste bližje 5'-koncu (Swift in sod., 2000).

Prav tako je potrebno pred obratnim prepisovanjem odstraniti genomsko DNA, da preprečimo njeno pomnoževanje v qPCR, kar bi privedlo k napačni določitvi absolutne ali relativne količine mRNA (Bustin, 2002).

Pri obratnem prepisovanju uporabljamo različne začetne oligonukleotide, ki so lahko bodisi naključni, oligo-dT ali gensko specifični začetni oligonukleotidi. Naključni oligonukleotidi so najmanj specifični, saj se vežejo na različna mesta na RNA. Oligo-dT se vežejo na poli-A konec mRNA in so bolj specifični. Še večjo specifičnost imajo specifični začetni oligonukleotidi, ki se vežejo na točno določeno tarčno zaporedje (Bustin in sod., 2005).

Reakcijo obratnega prepisovanja in qPCR lahko izvedemo v enem ali dveh korakih. V prvem primeru izvedemo obe reakciji v isti mikrocentrifugirki. Pri metodi v dveh korakih tečeta reakcija obratnega prepisovanja in nato qPCR v ločenih mikrocentrifugirkah.

Za zaznavanje PVY so Kogovšek in sod. (2008) oblikovali in optimizirali začetne oligonukleotide in sonde za zaznavanje vseh različkov PVY, tako, da so določili del zaporedja gena za plašni protein, ki je prisoten pri vseh različkih. Za zaznavanje PVY naj

bi bila najprimernejša metoda RT-PCR v enem koraku, saj so učinkovitosti pomnoževanja zelo dobre. Poleg tega pomnoževanje ni moteno, kljub zelo koncentriranim vzorcem. Virus zaznamo pri nižjih koncentracijah kot z uporabo ostalih metod in pred pojavom bolezenskih znamenj. Prednosti metode so v prihranku časa, v zmanjšanju možnosti kontaminacije, ker vse poteka v eni mikrocentrifugirki in v možnosti hkratne analize večjega števila vzorcev (Kogovšek in sod., 2008).

Za kvantifikacijo produktov RT-qPCR sta dva načina: absolutna in relativna. Z absolutno kvantifikacijo določimo količino cDNA v vzorcu z uporabo standardne krivulje. Predmet relativne kvantifikacije pa so spremembe v izražanju tarčnega gena glede na referenčni gen (Wong in Medrano, 2005). Nujni predpogoj natančne relativne kvantifikacije je izbira primerne metode normalizacije. Z njo popravimo vire tehnične variabilnosti, nastale med analizo kot so razlike v začetni količini vzorca, učinkovitosti izolacije RNA, ki se odražajo v različni količini in kvaliteti RNA, razlike v učinkovitosti reakcije obratnega prepisovanja in PCR v realnem času (Kulcheski in sod., 2010).

Metodo kvantifikacije lahko normaliziramo glede na prvotno število celic, na vhodno količino RNA ter z uporabo zunanjih (luciferazna mRNA) in notranjih kontrol. Slednji način, ki temelji na uporabi referenčnega gena, ki se v celici stabilno izraža, je dolgo časa veljal za najboljšo izbiro. Pri rastlinah so se kot referenčni geni najpogosteje uporabljali geni za ribosomsko RNA (18S, 25S), ubikvitin, aktin, elongacijski faktor 1- α , gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenazo, TATA-vezavni proteinin citokrom oksidazo, vendar je bilo dokazano, da le-ti niso primerni kot splošno uporabni normalizatorji, saj njihovo izražanje ni vselej stabilno. Največkrat se ti geni stabilno izražajo le v določenem organizmu, tkivu in pod določenimi eksperimentalnimi pogoji, zato je ključno, da se za vsak eksperiment testira več potencialnih referenčnih genov in izbere najprimernejšega (Wieczorek in sod., 2013). Za doseg relevantnih rezultatov, velja danes za najboljšo izbiro normalizacija na vsaj tri referenčne gene (Lilly in sod., 2011).

2.3.3 Fluorescenčna mikroskopija

Eno od novejših metod zaznavanja PVY predstavlja uporaba virusa PVY, označenega z zelenim fluorescenčnim proteinom (GFP). Virusno sledenje poteka z opazovanjem zelene fluorescence pod mikroskopom, ki nastane po obsevanju proteina GFP s svetlobo kratke valovne dolžine (395 nm) in njegovim oddajanjem vidne svetlobe daljše valovne dolžine v območju zelenega spektra (509 nm). Metoda poleg zaznavanja virusa omogoča določitev celic, v katerih se virus aktivno pomnožuje ter njegovo hitrost širjenja med celicami. Prav tako poleg *ex vivo* omogoča tudi *in vivo* sledenje širjenja virusa po rastlini, s čimer se izognemo invazivnim posegom v rastlino (Rupar, 2014).

Rupar (2014) je v sodelovanju s francoskim inštitutom INRA s pomočjo infektivnih klonov izolata PVY N605 skonstruiral z zelenim fluorescentnim proteinom označen PVY (PVY N605-GFP). Gen za protein GFP so vstavili v genom PVY med gen, ki kodira protein N1b in gen, ki kodira CP. Na N- in C-koncu so ga obdali s prepoznavnima mestoma za proteinazo N1a, ki GFP po translaciji odcepi iz poliproteina, zato fluorescenco GFP zaznamo v citoplazmi celic, kjer se virusni proteini aktivno sintetizirajo (Rupar, 2014).

Raziskave na rastlinah tobaka so pokazale, da metoda predstavlja močno orodje za zaznavanje in preučevanje širjenja PVY po gostiteljski rastlini, saj je protein GFP stabilen in netoksičen za rastlinske celice. S proteinom GFP označen virus je v okuženih rastlinah tobaka stabilen v vsaj treh pasažah iz rastline v rastlino in dva meseca v okuženi rastlini. Virus so lahko zaznali še pred pojavom bolezenskih znamenj in fluorescentni signal je koreliral s koncentracijo RNA. Prav tako so ugotovili, da prisotnost GFP ne vpliva na fitnes virusa, saj je z GFP označen virus biološko primerljiv z neoznačenim. Poleg rastlin tobaka, dokazano uspešno okužuje različne sorte krompirja *Solanum tuberosum* L. ter njegove divje sorodnike (Rupar, 2014).

2.4 OBRAMBNI ODGOVOR RASTLINE

Rastline imajo zapleten sklop obrambnih mehanizmov, ki so odgovorni za preprečevanje in zmanjšanje neugodnih učinkov, ki jih imajo nanje povzročitelji bolezni. Rastline imajo dva tipa obrambe, pasivno in aktivno. Pasivno obrambo predstavljajo fizične bariere kot so voskasta površina listov, trni, celična stena, debela povrhnjica itd., v primeru, da povzročitelji bolezni obidejo to bariero, se sprožijo aktivni obrambni mehanizmi. Uspešen aktivni obrambni odgovor je odvisen od pravočasne zaznave patogena in hitre in učinkovite aktivacije rastlinskih obrambnih mehanizmov. Aktivni odgovor rastline na okužbo z virusom je kompleksen in vključuje vrsto med seboj prepletenih signalnih poti, ki vplivajo na raznovrstne spremembe v metabolnih procesih in na nivoju izražanja genov, pri čemer se nekateri geni aktivirajo in drugi zavrejo (Mandadi in Scholthof, 2013).

Gostiteljska rastlina lahko okužbo omeji, v nasprotnem primeru pa se virus sistemsko razširi po celotni rastlini. Rezultat okužbe in progresivnega širjenja virusa po rastlini se kaže v obliki pojava bolezenskih znamenj. Ta predstavljajo vsoto biokemijskih in strukturnih sprememb na celičnem nivoju in sprememb v fiziologiji, ki so povezane z zmanjšano rastjo in razvojem rastline (Maule in sod., 2002).

Ko rastlina prepozna napad virusa, se prvi odgovori zgodijo na mestu vdora že v nekaj minutah. Gre za hitre dogodke, ki vodijo v morfološke in fiziološke spremembe okuženih celic in njihove okolice ter vključujejo sintezo reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS), spremembe v toku ionov, preureditve citoskeleta, fosforilacije/ defosforilacije proteinov,

sintezo dušikovega oksida (NO) in aktivacijo transkripcijskih faktorjev. Ti dogodki predstavljajo prvo obrambno linijo, katere namen je zmanjšati širjenje in pomnoževanje virusa in sprožiti spremembe v metabolnih poteh. Gre za primer aktivne obrambe, ki se imenuje preobčutljivostna reakcija (HR) in pripomore k izolaciji patogena na omejeno območje na mestu njegovega vdora, kar se pogosto doseže s programirano celično smrtjo tistih celic, ki so bile izpostavljene okužbi. Posledice se makroskopsko kažejo v pojavu nekroz na prizadetih listih. Izjemo predstavljajo okužbe rastlin s krompirjevim virusom X (PVX), z virusom razraščanja in pritlikavosti paradižnika (TBSV), virus mozaika cvetače (CaMV) in virus mozaika paradižnika (ToMV), ki ne vodijo v celično smrt okuženih celic, kljub temu pa ostaja virus omejen na območje na mestu vdora. Obratno velja za občutljive sorte, kjer pride do razvoja bolezni ne glede na pojav nekroz, kar pomeni, da celična smrt ni bistven obrambni odgovor, ki bi zagotovil odpornost proti virusom. Izid interakcije rastlina-virus naj bi v veliki meri določala hitrost in obseg obrambnega odgovora (Mandadi in Scholthof, 2013).

Obrambni odgovor vključuje tudi sintezo sekundarnih metabolnih snovi, predvsem produktov fenilpropanoidne poti. Gre za fenolne spojine, ki imajo neposredne protimikrobne učinke (fitoaleksini), ojačajo celične stene (lignini) in kot signalne molekule sodelujejo pri številnih obrambnih odgovorih (salicilna kislina, benzojska kislina). Prav tako pride do pospešenega prepisovanja in prevajanja s patogenezo povezanih obrambnih genov, ki kodirajo proteine kot so glukanaze, endohitinaze, proteinaze, proteazne inhibitorje, peroksidaze, defenzine itd., ter do aktivacije biosinteznih poti za sintezo ostalih signalnih molekul kot sta jasmonska kislina in etilen (Talarczyk in Hennig, 2001).

V primeru, da okužene celice zaradi HR propadejo, se številne spremembe, povezane z obrambnim odgovorom, odvijajo nadalje v sosednjih celicah, kar sproži povečano odpornost tkiva v okolici nekroze, čemur pravimo lokalno pridobljena odpornost (LAR), hkrati pa se mora signal o napadu virusa čim prej prenesti po celotni rastlini, da se lahko vzpostavi sistemsko pridobljena odpornost (SAR). Tako LAR kot tudi SAR lahko trajata več mesecev in zagotavljata odpornost proti širokemu spektru povzročiteljev bolezni (Mandadi in Scholthof, 2013).

Rastline imajo razvit še dodaten mehanizem za obrambo proti virusom s siRNA (malimi interferenčnimi RNA) posredovanim post-transkripcijskim utišanjem genov (PTGS), ki temelji na osnovi prepoznavanja virusnih RNA in vodi v specifično razgradnjo le-teh (Wang in sod., 2012), vendar ima večina rastlinskih virusov vključno s potivirusi, razvite protiobrambne mehanizme. S kodiranjem virusnih proteinov, ki zavirajo različne stopnje v PTGS, se lahko namreč utišanju izognejo (Feng in sod., 2011).

2.4.1 Vloga salicilne kisline

Salicilna kislina (SA), orto-hidroksibenzojska kislina oz. 2-hidroksibenzojska kislina, je preprosta fenolna spojina, katero uvrščamo k rastlinskim hormonom in je v različnih koncentracijah prisotna pri vseh rastlinah. Znano je, da vpliva na številne fiziološke in biokemijske procese v rastlini, kot so cvetenje, termogeneza, klitje semen in zapiranje listnih rež. Rastlinske celice vsebujejo le majhne koncentracije proste SA, saj se SA po sintezi pretvori v številne konjugate, najpogostejše z glukozilacijo, redkeje z esterifikacijo in metilacijo, lahko pa tudi z sulfonacijo in hidroksilacijo aromatskega obroča. Večina SA je v celici vezana v konjugirani obliki β -O-*D*-glukozilsalicilne kisline (SAG) (Dempsey in sod., 2011). Možna vloga teh mehanizmov je detoksifikacija in regulacija nivoja proste SA, saj je znano, da je le-ta v visokih koncentracijah toksična za rastlinske celice (Cronje in sod., 2004).

SA je ena najpomembnejših signalnih molekul pri obrambnem odgovoru rastline, in sicer za indukcijo izražanja s patogenezo povezanih obrambnih genov ter za vzpostavitev LAR in SAR (Kumar, 2014).

Dolgo časa so sklepali, da je SA mobilni signal, ki se prenese iz okuženih predelov v ostale predele rastline, saj ima ugodne fizikalno-kemijske lastnosti, primerne za transport po floemu na dolge razdalje. Vendar pa obstajajo dokazi, ki temu nasprotujejo. Na rastlinah tobaka so pokazali, da prosta SA verjetno ni mobilni signal za vzpostavitev SAR, je pa pomembna za signalno transdukcijo, saj so njeni konjugati biološko neaktivni. Metil-salicilat, kot eden od konjugantov SA, je hlapen in sklepajo, da ga ravno ta lastnost opredeljuje kot tisti signal, ki se prenaša po rastlini in tudi med rastlinami. Našli so ga tudi v prevodnem tkivu, kar kaže na to, da res potuje po rastlini. Tretiranje rastlin tobaka z metil-salicilatom je povečalo nivo SA v tkivu in izražanje s patogenezo povezanih obrambnih genov ter odpornost proti virusu mozaika tobaka (TMV). Ker je metil-salicilat biološko neaktiven mora potekati pretvorba nazaj v SA, saj lahko le slednja aktivira obrambni mehanizem v neokuženem tkivu in potencialno tudi v sosednji rastlini (Shah, 2009).

Vloga SA pri obrambi je bila prvič omenjena leta 1978, ko je White (1979) z injiciranjem SA v liste odporne sorte tobaka povečal odpornost rastline proti TMV, pri čemer je prišlo do 90-% zmanjšanja nekroz in do povečanega izražanja s patogenezo povezanih obrambnih genov (White, 1979). Prav tako so z apliciranjem SA v občutljive rastline tobaka, ki niso vsebovale genov za odpornost, inducirali odpornost proti TMV, ki se je kazala v zmanjšanju pomnoževanja virusa in zamudi pojavljanja bolezenskih znamenj (Chivasa in sod., 1997).

Številne kasnejše raziskave so podale še dodatne dokaze, ki potrjujejo vpletenost SA pri obrambnem odgovoru rastline, in sicer z uporabo transgenih rastlin, ki so izražale bakterijski gen *nahG*. Te rastline niso zmožne kopičiti večjih količin SA, saj jo encim salicilat hidroksilaza, ki je produkt gena *nahG*, pretvarja v katehol. Po okužbi s patogenom so te rastline imele prenizke koncentracije SA, zato jim ni uspelo sprožiti izražanje s patogenezo povezanih obrambnih genov in vzpostaviti SAR v zgornjih listih rastline. Rastline niso uspele preprečiti virusnega pomnoževanja in širjenja, ampak so namesto tega kazale povečano občutljivost z razvojem hudih bolezenskih znamenj (Vlot in sod., 2009).

Vloga SA pri tobaku in navadnem repnjakovcu (*Arabidopsis thaliana*) je dobro opisana, medtem ko je njena vloga v krompirju težje določljiva. Že s povečanjem starosti rastline in povečanjem svetlobne intenzitete pride namreč do povečanja nivoja SA, poleg tega ima krompir približno 100-krat višji osnovni nivo celokupne SA v primerjavi s tobakom in navadnim repnjakovcem. Zato se je postavilo vprašanje, kako poteka signalizacija pri rastlinah z visokim osnovnim nivojem SA in kako se lahko razvije SAR. Ugotovili so, da so rastline krompirja kljub visokim koncentracijam celokupne SA same sposobne vzdrževati nizek osnovni nivo proste SA, ki je podoben tistemu pri navadnemu repnjakovcu in tobaku. To potrjuje tudi dejstvo, da imajo rastline krompirja približno 99 % SA vezane v obliki SAG, kar rastlinam omogoča, da lahko ostanejo odzivne tudi na majhne koncentracije SA (Navarre in Mayo, 2004).

Krečič-Stres in sod. (2005) so ugotovili, da imajo sorte krompirja različni osnovni nivo SA in da le-ta ne korelira z odpornostjo proti virusu PVY^{NTN}. Pri odporni sorti Sante je namreč osnovni nivo nižji kot pri sorti Igor ali Désirée (Krečič-Stres in sod., 2005).

Vpletenost SA pri obrambi krompirja so pokazali z uporabo rastlin delno odporne sorte Désirée, ki so jih transformirali z genom *nahG* ter okužili s krompirjevo plesnijo (*Phytophthora infestans*). Pomanjkanje SA je vodilo v zmanjšano odpornost rastlin, ki se je odražala v hitrejši rasti in pomnoževanju plesni (Halim in sod., 2007). Podobne posledice okužbe, zaradi pomanjkanja SA so se kazale na NahG-transgenih rastlinah po okužbi s PVY^{NTN}. Virus se je v teh rastlinah hitreje pomnoževal in širil in sprožil nastanek hudih bolezenskih znamenj. Na osnovi teh ugotovitev so zaključili, da je SA vključena v preprečevanje premikanja virusa in njegovega sistemskega razsoja (Baebler in sod., 2011).

Poleg vpliva na povečanje odpornosti z zaviranjem začetka pomnoževanja in razvoja bolezni, s sprožitvijo izražanja s patogenezo povezanih obrambnih genov v primeru kompatibilnih interakcij, ima SA pomembno vlogo tudi pri nekompatibilnih interakcijah. Pri sorti krompirja Rywal, odporni proti PVY, se zaradi gena za odpornost Ny-1 razvije HR, ki vodi v programirano celično smrt, s katero rastline preprečijo pomnoževanje in razširjanje virusa. Dokazano je, da se pri tem poveča koncentracija proste SA, kar vodi v pospešeno kopičenje ROS, encimov za učvrstitev celičnih sten, lignina, sekundarnih

metabolitov in s patogenezo povezanih proteinov. Nasprotno pri transgenih rastlinah NahG-Rywal pomanjkanje SA, kljub izražanju gena Ny-1, vodi v zmanjšano koncentracijo obrambnih snovi in neovirano pomnoževanje in širjenje virusa po celotni rastlini (Baebler in sod., 2014).

SA dokazano lahko vpliva na vsaj tri glavne faze pri procesu virusne okužbe, to so pomnoževanje, premikanje skozi plazmodezme in širjenje po prevodnem tkivu. Ta večplastnost oz. lastnost obrambe na več nivojih ima pomembno vlogo pri zagotavljanju obrambe rastline pred določenimi virusi. V primeru, da se virus uspe izogniti obrambi na enem nivoju, npr. na nivoju pomnoževanja, lahko rastlina kljub temu prepreči bodisi njegovo premikanje iz celice v celico bodisi širjenje po rastlini (Singh in sod., 2004).

Signalna pot SA je kompleksna mreža med seboj prepletenih poti. Številne stimulatorne molekule, kot sta vodikov peroksid in NO, lahko aktivirajo sintezo SA in njeno signalizacijo, medtem ko jo lahko druge, kot je jasmonska kislina, zavirajo. SA je sposobna sprožiti sintezo svojih stimulatornih molekul in tako hkrati pospešiti svojo lastno biosintezo (Vlot in sod., 2009). Njeni učinki naj bi segali celo do nivoja post-transkripcijskega utišanja genov, ki predstavlja dodaten mehanizem odpornosti proti virusom, pri čemer naj bi povišana koncentracija SA, vodila v povečano izražanje gena za rastlinsko od RNA odvisno RNA-polimerazo, ki vpliva na sintezo t.i. siRNA, s katerimi rastlina prepozna virusne nukleinske kisline in sproži njihovo razgradnjo (Hunter in sod., 2013).

2.4.2 Vloga miRNA

Mikro RNA (miRNA) so male 19-24 baznih parov dolge, nekodirajoče molekule RNA, ki imajo ključno vlogo v post-transkripcijskem utišanju genov bodisi s katalizo cepitve tarčnih mRNA, bodisi z inhibicijo translacije. Odkritje, da miRNA regulirajo izražanje genov pri *Caenorhabditis elegans*, je pomenilo velik premik v razmišljanju na področju molekularne biologije. Molekule RNA kar naenkrat niso bile le preprosti vmesni členi med DNA in proteini, ampak se je njihova vloga začela primerjati s pomenom transkripcijskih faktorjev (Gommans in Berezikov, 2012).

Molekule miRNA kodirajo geni *MIR*. Najprej se s polimerazo RNA II prepišejo v primarne prepise *pri-miRNA* ter vežejo in cepijo z encimom RNAza III (DCL 1; »Dicer-like protein«) in s HYL1 (»Hypostatic leaves 1«) do prekursorske molekule miRNA (*pre-miRNA*) s strukturo lasnice. Iz slednje v nadaljevanju z pomočjo DCL1 in HYL1 nastane dvoverižni del miRNA, ki se zaradi nestabilnosti v jedru še metilira. Nastala dvoverižna miRNA se s pomočjo prenašalnega proteina HST prenese iz jedra v citoplazmo, kjer se ena od dveh verig miRNA, znana kot vodilna veriga (»guide strand«), poveže s proteinom

družine Argonavti (AGO1) v ribonukleoproteinski kompleks RISC (RNA-inducirani utiševalni kompleks). AGO1 vsebuje dve domeni, PAZ in Piwi. Prva je vezavna domena za miRNA, Piwi domena pa ima RNazno aktivnost. Nastali RISC se komplementarno pari s 3' neprevedljivo regijo (3'-UTR) tarčne mRNA in jo reprimira, bodisi z destabilizacijo in razrezom mRNA, bodisi z represijo translacije mRNA, druga veriga RNA (»passenger strand«) pa se razgradi (Jones-Rhoades in sod., 2006). Regulacija na post-transkripcijskem nivoju je dobro preučena, manj znanega je o regulaciji na nivoju transkripcije. Podobno kot velja za živalske, lahko določene rastlinske miRNA vplivajo na utišanje tarčnih genov z metilacijo DNA (Hu in sod., 2014).

Rastlinske miRNA so visoko komplementarne tarčnim mRNA, kar omogoča hitro in zanesljivo bioinformatično določanje potencialnih tarč miRNA. Do danes so bili razviti številni algoritmi, ki poleg sekvenčne komplementarnosti miRNA in mRNA upoštevajo tudi sekundarne strukture tarčne RNA in termodinamske lastnosti, osnovane na ocenjevanju energijsko ugodnih vezavnih mest. Kljub precej zanesljivim rezultatom napovedi je potrebno vsa predvidevanja tudi eksperimentalno potrditi (Veluchamy Remesh in sod., 2014). Za preučevanje interakcij miRNA-tarčna mRNA se uporabljajo transgene rastline, pri katerih se povečana količina določene miRNA doseže z izpostavitvijo njenega gena pod kontrolo močnega promotorja 35S. Njena prekomerna količina posledično vodi v zmanjšanje količine vseh njenih tarčnih mRNA in nivoja proteinov. Drug pristop je mutiranje gena za tarčno mRNA, s katerim onemogočimo komplementarno parjenje baz in utišanje gena (Jones-Rhoades in sod., 2006).

Znano je, da so učinki na regulacijo utišanja genov večplastni. Vsaka miRNA lahko regulira večje število genov in vsaka tarčna mRNA je regulirana z več molekulami miRNA. Določeni geni za miRNA se v rastlini konsitutivno izražajo, medtem ko se drugi izražajo le v določenem tkivu oz. le v določenih fazah razvoja. Pri rastlinah so prve miRNA opisali pri navadnem repnjakovcu. Do danes je odkritih preko 2200 rastlinskih miRNA iz več kot 30 vrst. Večina miRNA je vpletenih v številne procese, pomembne za pravilno rast in razvoj rastline, odzive na abiotične in biotične stresne dejavnike (Ruiz-Ferrer in Voinnet, 2009).

Prvi dokazi o vplivu miRNA na razvojne procese v rastlini izhajajo iz preučevanja mutant rastlin navadnega repnjakovca, z okrnjeno sintezno potjo miRNA. Številni geni, ki so vključeni v sintezo in delovanje vseh rastlinskih miRNA, kot so DCL1, AGO1, HEN1 in HYL1, so bili najprej določeni v rastlini na temelju njihovih posledic, ki so se odražale v rastlinah zaradi mutacije enega ali več omenjenih genov, še preden so dejansko ugotovili, da so ti proteini pomembni pri nastanku miRNA. Mutante *dcl1*, *ago1*, *hen1*, *hyl1* in *hst* kažejo motnje že v zgodnjem embrionalnem razvoju, nepravilnosti pri razvoju cvetnih delov in v morfologiji listov ter razvoju aksilarnega meristema (Ruiz-Ferrer in Voinnet, 2009).

Dokazan je tudi vpliv nekaterih miRNA na hitrejšo vzpostavitev simbiotskih in parazitskih interakcij med rastlinami in bakterijami s pospeševanjem diferenciacije fiksirajočih celic za dušik in nodulov pri stročnicah, okuženih z bakterijami rodu *Rhizobium* (Ruiz-Ferrer in Voinnet, 2009).

Molekule miRNA kot sta miR162 in miR168 so zmožne poleg regulacije izražanja genov za transkripcijske faktorje tudi preko regulacije izražanja DCL1 in AGO1 regulirati svojo lastno biosintezo (Mallory in Vaucheret, 2006).

Molekule miRNA lahko regulirajo tudi stabilnost določenih proteinov preko vpliva na povečano izražanje genov za proteine F-box in encime E2, ki katalizirajo ubikvinacijo ter usmerjajo označene proteine v razgradnjo (Ruiz-Ferrer in Voinnet, 2009).

Vplivajo tudi na post-transkripcijsko utišanje genov, posredovano z molekulami siRNA. Vsaj dve družini miR173 in miR390 sodelujeta pri nastanku trans delujočih siRNA (ta-siRNA). Ostale tarče, kot so mRNA za encime ATP sulfurilaze, superoksid dismutaze in lakaze imajo manj določene regulatorne vloge in čeprav so dokazali *in vivo* posredovano cepitev teh mRNA, biološki pomen še ni popolnoma znan (Ruiz-Ferrer in Voinnet, 2009).

Družine miRNA, ki so prisotne le pri določeni rastlinski vrsti, kažejo na to, da imajo lahko miRNA tudi vrstno specifične funkcije. Primer je družina miR397, ki vpliva na utišanje genov za 26 domnevnih lakaz pri topolu, medtem ko so pri navadnem repnjakovcu prisotne le tri. Lakaze so vključene v lignifikacijo, zato domnevajo, da je številčnost encimov povezana z dejstvom, da mora biti proces bolj natančno reguliran pri lesnatih kot pri zelnatih rastlinah (Ruiz-Ferrer in Voinnet, 2009).

Čeprav odkritje miRNA sega v leto 1993, je bilo šele pred desetletjem dokazano, da so miRNA vpletene tudi v odgovor na biotski stres. Prva odkrita miRNA v obrambnem mehanizmu rastline proti napadom bakterij je miR393 navadnega repnjakovca (Veluchamy Remesh, 2012). Povečano izražanje njenega gena dokazano zmanjšuje bakterijsko rast preko inhibicije signalne poti rastlinskega hormona avksina, saj le-ta spodbuja dovzetnost za bakterijske bolezni (Ruiz-Ferrer in Voinnet, 2009). Prav tako dokazano rastlinske miRNA zavirajo pomnoževanje virusa šarke (PPV), ki okužuje številne koščičarje (Simón-Mateo in García, 2006).

Z uporabo dveh virusov, RSV (»Rice stripe virus«) in RDV (»Rice dwarf virus«), ki okužujeta rastline riža so pokazali, da virusa različno vplivata na nastajanje enakih miRNA v istem gostitelju (Du in sod., 2011). Prav tako je nastajanje miRNA odvisno od agresivnosti virusa. Na primeru okuženih rastlin tobaka bodisi z virusom mozaika ločnate krotalarije (SHMV), ki povzroča blaga bolezenska znamenja, ali virusom TMV, ki povzroča huda bolezenska znamenja, so pokazali, da v obeh primerih pride do povečane

sinteze enakih miRNA, vendar se je razlika med njima odražala v zakasnjem povečanju količine miRNA pri SHMV, kar se sklada z intenzivnostjo pojava bolezenskih znamenj (Bazzini in sod., 2011).

Količina miRNA se razlikuje tudi v odvisnosti od okužbe bodisi z enim ali večimi različnimi virusi. Na primeru rastlin tobaka *Nicotiana benthamiana*, ki so jih sočasno okužili bodisi z virusoma PVY in PVX ali PVX in PPV so pokazali, da se količina miR156, miR168 in miR368 poveča tako pri okužbah s posameznim virusom, kot tudi pri sočasni okužbi z dvema virusoma, vendar je precejšnja razlika v njihovi koncentraciji, ki so lahko v primeru dvojne okužbe tudi do 14-krat večje. Druga razlika je v količini miR171, ki se v primeru posamezne okužbe poveča, medtem ko se pri dvojnih okužbah njena količina zmanjša (Pacheco in sod., 2012).

Medtem ko je za siRNA dobro znano, da neposredno vplivajo na viruse, je o tej vlogi miRNA manj znanega. Glede na bioinformatične analize nekateri avtorji sklepajo, da ima vsaka endogena miRNA zaradi naključne podobnosti z zaporedji virusnih genomov protivirusni potencial, ki je neodvisen od njene celične funkcije. Z uporabo gensko spremenjenih virusov in rastlin so dokazali, da je komplementarnost med miRNA in virusnim genomom dovolj, da pride do utišanja RNA virusa (Pérez-Quintero in sod., 2010).

Po drugi strani je malo verjetno, da bi miRNA, tako kot siRNA, imele neposredno vlogo pri utišanju virusne RNA, saj je v celici prisotnih veliko molekul siRNA, ki imajo popolna komplementarna zaporedja z virusno RNA, medtem ko miRNA pogosto niso sposobne utišanja virusne RNA, saj virus s kopičenjem mutacij in rekombinacij prepreči parjenje z miRNA (Wang in sod., 2012). Virusi lahko preprečijo utišanje lastne RNA s pomočjo virusnih supresorjev kot so P19 pri tombusvirusih, HC-Pro pri potivirusih, 2b pri virusu mozaika kumar (CMV), p38 pri virusu kodravosti repe (TCV) itd., ki preprečujejo nastanek RISC in s tem preprečujejo biosintezo miRNA. Ker so miRNA vključene tudi v regulacijo razvojnih procesov, njihova zmanjšana količina vodi v povečano količino njenih tarč, ki so v normalnih pogojih pod strogim nadzorom miRNA, kar se odraža tudi na makroskopskem nivoju rastline v pojavu bolezenskih znamenj (Veluchamy Ramesh in sod., 2014). Ob upoštevanju delovanja virusnih supresorjev na utišanje RNA tudi na nivoju siRNA, bi lahko razumeli vpliv na regulacijo miRNA kot stohastično posledico, vendar je bolj verjetno, da virusi namerno ovirajo regulacijo miRNA in s tem hkrati vplivajo na izražanje tistih genov, ki jim omogočajo hitrejše pomnoževanje in širjenje po rastlini (Bazzini in sod., 2011).

Dokazano so določene miRNA neposredno vpletene tudi v regulacijo genov R, ki so ključni za odpornost proti določenim povzročiteljem bolezni. Molekule miR482 in miR2118, katerih tarče so prepisi genov NBS-LRR pri rastlinah paradižnika, krompirja,

soje in lucerne, v normalnih pogojih vplivajo na zmanjšano sintezo proteinov NBS-LRR, ki služijo kot receptorji za prepoznavanje povzročitelja bolezni in prožilci obrambnih mehanizmov za odpornost rastline. V primeru okužbe bodisi z virusi, bakterijami ali glivami pride do zmanjšane količine omenjenih miR482 in miR2118, kar posledično povzroči povečanje izražanja njunih tarčnih genov in vodi v odpornost (Zhu in sod., 2013).

Ob okužbi s povzročiteljem bolezni se količina določenih miRNA poveča, določenih pa zmanjša, kar je povezano z njihovimi regulatornimi zankami. Ob okužbi se pogosto poveča količina tistih miRNA, ki utišajo gene za negativne regulatorje obrambnega odziva (npr. za sintezo avksina) in s tem posredno vplivajo na izražanje z obrambo povezanih genov, medtem ko se količina miRNA, katerih tarča so pozitivni regulatorji obrambnega odgovora (npr. za sintezo genov R) zmanjša (Ruiz-Ferrer in Voinnet, 2009).

2.5 KVANTITATIVNA ANALIZA miRNA

Čeprav miRNA predstavljajo relativno veliko skupino prepisov, se njihova količina razlikuje med različnimi tkivi in vrstami organizmov (Chen in sod., 2005). Zaznavanje manj zastopanih miRNA z uporabo tehnologij, kot so kloniranje in prenos northern je zaradi slabe občutljivosti in specifičnosti teh metod precej težavno. Poleg tega je analiza miRNA bistveno bolj zapletena v primerjavi z analizo ostalih nukleinskih kislin. Molekule miRNA imajo nekaj edinstvenih/svojstvenih lastnosti, ki otežujejo njihovo zaznavanje in kvantifikacijo.

- Zrele miRNA so kratke molekule, v povprečju dolge le 22 baznih parov, kar onemogoča uporabo običajnih začetnih oligonukleotidov.
- Nimajo značilnega skupnega zaporedja kot je rep poli-A pri mRNA, ki bi omogočalo njihovo selektivno obogatitev in bi hkrati predstavljalo mesto vezave začetnih oligonukleotidov med obratnim prepisovanjem.
- Molekule imajo heterogeno vsebnost GC, kar se odraža v velikem intervalu talilnih temperatur (T_m) za vezavo začetnih oligonukleotidov.
- Molekule miRNA znotraj iste družine se lahko med sabo razlikujejo zgolj v enem nukleotidu.
- Identično zaporedje kot zrela miRNA vsebujeta tudi obe njeni prekurzorski molekuli pri-miRNA in pre-miRNA (Pritchard in sod., 2012).

Za pravilno analizo miRNA ni pomembna le izbira ustrezne metode za zaznavanje in kvantifikacijo, temveč je za njeno natančnost in zanesljivost ključna tudi izbira primerne načina izolacije, za učinkovito ekstrakcijo RNA iz tkiv in preprečevanje razgradnje tako kratkih kot tudi dolgih molekul RNA (Accerbi in sod., 2010). Izolacija kvalitetne celokupne RNA je v veliki meri odvisna od ravnanja s tkivom pred samo ekstrakcijo RNA,

saj celične ribonukleaze hitro in učinkovito razgrajujejo RNA po lizi celice. Zato je pomembno, da za ohranitev integritete tkivo hitro zamrznemo v tekočem dušiku in shranimo pri vsaj -70 °C. Postopek izolacije vključuje lizo celic, denaturacijo, ekstrakcijo in nato precipitacijo RNA z alkoholom. Denaturacija ribonukleaz poteka z uporabo enega od kaotropnih reagentov kot sta gvanidijev izotiocianat ali 2-merkaptotetanol, ki zavreta delovanje ribonukleaz s prekinitvijo disulfidnih vezi in s tem ohranita integriteto RNA (Accerbi in sod., 2010).

Za izolacijo celokupne RNA obstaja več različnih protokolov in komercialno pripravljenih kompletov s katerimi pridobimo tudi frakcijo miRNA (reagent TRIzol, »RNeasy Plant Mini Kit«, »MagMax Plant Isolation Kit« itd.). Pri izbiri ustrezne metode moramo upoštevati, da vsaka izmed njih različno vpliva na donos in kvaliteto izolirane RNA. Izolacija z reagentom TRIzol je sicer zamudna in neugodna, saj vključuje delo s toksičnimi snovmi kot so TRIzol, kloroform in izopropanol, vendar velja za robustno in ponovljivo metodo tako za izolacijo RNA kot tudi za miRNA. Prav tako je dokazano, da omogoča ohranitev integritete RNA vsaj 10 mesecev, če so vzorci ustrezno shranjeni pri -80 °C. Kljub številnim dostopnim metodam za izolacijo in obogatitev miRNA, ostaja uporaba reagenta TRIzol še vedno zlati standard, saj omogoča visok izplen frakcije miRNA (Mraz in sod., 2009).

Obstajajo tudi metode, razvite posebej za izolacijo malih RNA, kot je »miRVana™ microRNA Isolation Kit«. Ta temelji na uporabi kolon s silikatno membrano, ki omogoča izolacijo molekul krajših od 200 nukleotidov (nt). S to metodo pridobimo bolj koncentrirano miRNA v primerjavi z uporabo standardnih neselektivnih metod. Metoda deluje na principu kolon, kjer se v prvem koraku znebimo daljših molekul, ki se vežejo na silikatno membrano. Pri tem pa prihaja do problemov, zaradi naključne vezave miRNA na večje molekule RNA in direktno na silikatno membrano. Zaradi tega določen del miRNA izgubimo in s tem uvajamo pristranskost v nadaljnje postopke analize (Redshaw in sod., 2013).

Kljub omenjenim problematičnim lastnostim miRNA so razviti različni načini za njihovo zaznavanje in kvantifikacijo, pri čemer so najbolj uveljavljeni RT-qPCR, mikromreže in določanje nukleotidnega zaporedja nove generacije (NGS) (Knutsen in sod., 2013).

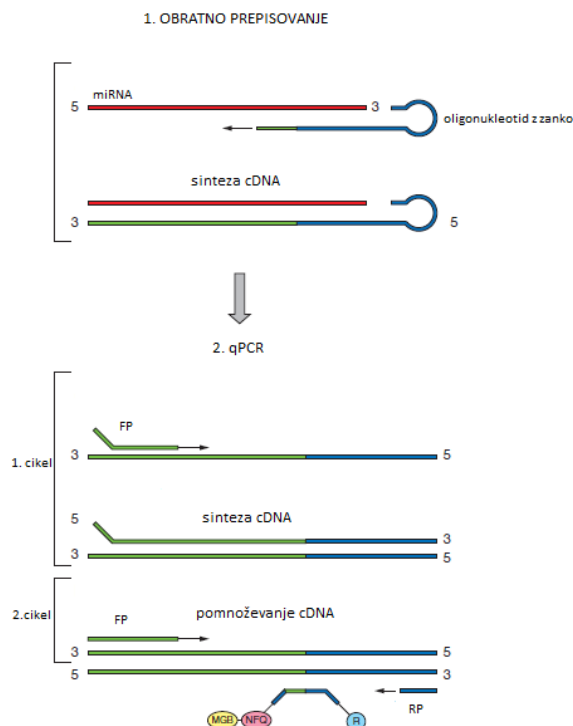
Vsaka od omenjenih metod ima svoje prednosti in slabosti in uvaja pristranskost v postopke analize. Izbira načina za analizo je odvisna od časa, natančnosti, točnosti, stroškov in vrste analiziranega vzorca. Uporaba mikromrež je sicer od vseh omenjenih cenovno najbolj ugodna, a najmanj občutljiva metoda, z najmanjšim dinamičnim območjem kvantifikacije. Zahteva uporabo relativno velike količine cDNA, na sode pa se poleg zrelih miRNA lahko vežejo tudi pri- in pre-miRNA (Podolska in sod., 2011), zaradi česar je metoda najmanj primerna za kvantifikacijo miRNA. V primerjavi z mikromrežami

je določanje nukleotidnega zaporedja bolj vsestransko, saj ni odvisno od vnaprej pripravljenih začetnih oligonukleotidov in sond. Poleg tega je edina metoda, ki omogoča pridobivanje zaporedij še neodkritih miRNA ter loči med miRNA, ki se razlikujejo le v enem nukleotidu. Občutljivosti nekaterih platform naj bi bile celo večje kot pri RT-PCR (Knutsen in sod., 2013). Omejitve so predvsem v visokih stroških, ki so se v zadnjih letih sicer bistveno znižali, potrebi po zmogljivih orodjih za analizo podatkov in pristranskostih, ki so vnesene med pripravo knjižnic (ligacija adaptorjev, pomnoževanje s PCR, obratno prepisovanje, izolacija iz gela) (Pritchard in sod., 2012).

RT-qPCR je izmed vseh treh najpogosteje uporabljena metoda, saj jo odlikuje visoka občutljivost, specifičnost, ponovljivost in široko dinamično območje kvantifikacije. Za kvantifikacijo miRNA se najpogosteje uporablja RT-PCR v dveh korakih, prilagojena izključno za analizo miRNA (Slika 5). Obratno prepisovanje lahko poteka z uporabo specifičnih oligonukleotidov z zanko, z linearnimi začetnimi oligonukleotidi ali oligo-dT. Pri slednjih moramo pred prepisom na molekule miRNA ligirati še poliadenilirano zaporedje, kar pomeni dodaten korak in možnost pristranskosti encima pri ligaciji zaporedja. Kljub temu, da je začetne oligonukleotide z zanko precej težko oblikovati, je njihova uporaba najboljša izbira, ker omogočajo boljšo učinkovitost in specifičnost obratnega prepisovanja v primerjavi z ostalimi, saj so zasnovani tako, da se vežejo zgolj na zrele miRNA in ločijo med podobnimi miRNA, ki se razlikujejo le v enem nukleotidu. Poleg tega na njihovo učinkovitost ne vpliva potencialna prisotnost genomske DNA (Hurley in sod., 2012).

Naslednji pozitivni vidik uporabe oligonukleotidov z zanko je povezan s PCR, ki zahteva vsaj dvakrat daljšo matrico od posameznega začetnega oligonukleotida, ki je običajno dolg okrog 20 nt. Tako bi bila minimalna dolžina miRNA 40 nt, kar pomeni, da kvantifikacija z običajnimi začetnimi oligonukleotidi ne bi bila mogoča (Kramer, 2011). Začetni oligonukleotidi z zanko se vežejo na 3'-konec tarčne miRNA in se po denaturaciji pred qPCR razvijejo in zagotovijo daljšo matrico za pomnoževanje (Hurley in sod., 2012).

Čeprav lahko pri qPCR uporabimo tudi interkalirajoča barvila kot je SYBR Green, je najpogostejši način zaznavanja pomnožkov z uporabo hidroliznih sond TaqMan. Poleg specifičnosti sonde povečuje specifičnost tudi smiselno usmerjeni začetni oligonukleotid, ki je zasnovan tako, da na 5'-konec doda še par nt, s čimer podaljša matriko in s tem še dodatno optimizira talilno temperaturo sonde (Kramer, 2011) (Slika 5).



Slika 5: Shematski prikaz metode RT-qPCR z oligonukleotidi z zanko in hidrolizno sondo TaqMan za analizo miRNA. FP-smiselni začetni oligonukleotid, RP-protismiselni začetni oligonukleotid (Life Technologies Corporation, 2011:27)

Za pravilno analizo miRNA in interpretacijo rezultatov med različnimi vzorci je potrebna ustrezna normalizacija, pri čemer je priporočena uporaba kratkih nekodirajočih molekul RNA kot so snRNA, snoRNA ali miRNA, da popravimo morebitno variabilnost, ki nastane zaradi izolacije, obratnega prepisovanja in PCR. A za rastlinske miRNA do sedaj ni splošne znane metode za normalizacijo, saj je izbira male RNA, ki se v celici nahaja v konstantnih količinah, odvisna od preučevanega tkiva, organizma in eksperimentalnih pogojev (Becker in sod., 2010).

V zadnjih letih so se pojavile študije, ki za normalizacijo uporabljajo malo jedrno RNA snoU6, ribosomalno RNA 5S in različne druge miRNA (Lim in sod., 2011). Prav tako se nekateri poslužujejo uporabe umetnih miRNA, ki jih rastline same ne sintetizirajo in služijo podobno, kot eksogeno dodan gen za luciferazo (Pritchard in sod., 2012). Alternativni pristop je tudi normalizacija glede na povprečno vrednost količine vseh analiziranih miRNA v poskusu, a je uporaben le v primeru analize velikega števila miRNA (Benes in Castoldi, 2010).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 RASTLINSKI MATERIAL

Pri poskusu smo uporabili zdrave rastline krompirja (*Solanum tuberosum* L.) sorte Désirée iz zbirke tkivnih kultur na Nacionalnem inštitutu za biologijo (NIB) in transgene rastline krompirja sorte Désirée t.i. NahG-Désirée, ki imajo v genom vnesen bakterijski gen za encim salicilat hidroksilazo, ki razgrajuje SA v katehol, zaradi česar rastline ne akumulirajo SA. Te rastline NahG-Désirée so transformirali na Leibniz inštitutu za rastlinsko biokemijo v Nemčiji (Halim in sod., 2007).

3.1.1 Vzorci - pripravljen rastlinski material za analizo miRNA

Za optimizacijo metode za analizo miRNA smo uporabili že pripravljen homogeniziran rastlinski material listov po ene zdrave rastline sort krompirja PW363 in Désirée, shranjen na -80 °C.

Za analizo malih RNA smo uporabili že pripravljen rastlinski material slepo inokuliranih in s PVY okuženih rastlin krompirja Désirée in transgenih rastlin krompirja NahG-Désirée (Preglednica 1), shranjen na -80 °C.

Preglednica 1: Vzorci rastlinskega materiala, iz katerih smo izolirali RNA s pomočjo reagenta TRIzol

Ime vzorca	Vrsta izolacije	Genotipska različica krompirja	dpi	Tretma	Št. rastline
Désirée 1_PVY	TRIzol	Désirée	3	PVY	1
Désirée 2_PVY	TRIzol	Désirée	3	PVY	2
Désirée 3_PVY	TRIzol	Désirée	3	PVY	3
Désirée 1_mock	TRIzol	Désirée	3	mock	1
Désirée 2_mock	TRIzol	Désirée	3	mock	2
Désirée 3_mock	TRIzol	Désirée	3	mock	3
NahG-Désirée 1_PVY	TRIzol	NahG Désirée	3	PVY	1
NahG-Désirée 2_PVY	TRIzol	NahG Désirée	3	PVY	2
NahG-Désirée 3_PVY	TRIzol	NahG Désirée	3	PVY	3
NahG-Désirée 1_mock	TRIzol	NahG Désirée	3	mock	1
NahG-Désirée 2_mock	TRIzol	NahG Désirée	3	mock	2
NahG-Désirée 3_mock	TRIzol	NahG Désirée	3	mock	3

Iz teh vzorcev rastlinskega materiala smo izolirali RNA s pomočjo reagenta TRIzol. Od vsake genotipske različice rastlin krompirja – Désirée in NahG-Désirée smo za analizo (okužene-PVY, slepo inokulirane-mock) iz treh rastlin uporabili ½ lamine 2. spodnjih inokuliranih listov, pobranih 3 dpi (dni po inokulaciji).

Poleg tega smo za primerjavo vpliva izolacije RNA uporabili RNA, izolirano s kompletom »RNeasy Plant Mini Kit« (Qiagen, Nemčija) iz druge polovice lamine, istih listov rastlin NahG-Désirée (Preglednica 2).

Preglednica 2: Vzorci rastlinskega materiala NahG-Désirée, iz katerih je bila RNA izolirana s pomočjo kompleta »RNeasy Plant Mini Kit«

Genotipska različica krompirja	dpi	Tretma	Št. rastline	Koncentracija (ng/μl)	260/280	260/230
NahG-Désirée	3	PVY	1	555,12	2,17	1,81
NahG-Désirée	3	PVY	2	279,75	2,12	1,54
NahG-Désirée	3	PVY	3	845,75	2,19	1,86
NahG-Désirée	3	mock	1	161,97	2,07	1,41
NahG-Désirée	3	mock	2	327,01	2,11	1,57
NahG-Désirée	3	mock	3	286,48	2,11	1,67

Prikazane so koncentracije izolirane RNA (v ng/μl) in razmerje absorbance 260/280 in 260/230, izmerjena s pomočjo spektrofotometra »NanoDrop«. Za analizo smo za iz treh rastlin NahG-Désirée (okužene-PVY, slepo inokulirane-mock) uporabili ½ lamine 2. spodnjih inokuliranih listov, pobranih 3 dpi.

3.1.2 Priprava rastlinskega materiala za preučevanje pomnoževanja in širjenja PVY-N605

Za preučevanje pomnoževanja in širjenja virusa PVY iz skupine N (izolat PVY-N605) ter s proteinom GFP označenega virusa PVY-N605-GFP, smo rastlinski material pripravili sami (Preglednica 3). Rastline smo najprej razmnožili z nodijsko kulturo in gojili na modificiranem gojišču MS (Murashige & Skoog) (po 10 ml gojišča v epruveh) v rastni komori za tkivne kulture (Kambič, Slovenija). Ko so rastline zrasle do primerne velikosti, približno po 2 tednih, smo stebelne nodije precepili na gojišče za koreninjenje, ki je vsebovalo 40 ml enakega gojišča v plastičnih petrijevkah in jih gojili v rastni komori (Kambič, Slovenija) dokler se niso zakoreninili.

Pogoji v rastni komori so bili:

- temperatura: 19 ± 2 °C
- fotoperioda: 16 ur svetlobe in 8 ur teme
- osvetljenost (gostota pretoka fotonov): 70–90 μmol m⁻²s⁻¹ (žarnica Osram L36/W77)

Po 14 dneh smo rastline presadili v lončke s zemljo in jih štiri tedne vzgajali v rastni komori z vlago ter jih zalivali z vodo iz vodovoda.

Pogoji v rastni komori z vlago so bili:

- temperatura: 19 ± 2 °C
- relativna vlažnost: 60-70- odstotna
- fotoperioda: 16 ur svetlobe in 8 ur teme
- osvetljenost (gostota pretoka fotonov): 120–150 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (žarnica Osram L36/W77)

V rastni komori smo okužene rastline fizično ločili od slepo inokuliranih rastlin.

Preglednica 3: Rastlinski material dveh genotipskih različic krompirja Désirée in NahG-Désirée za preučevanje širjenja in pomnoževanja virusa PVY N605 oz. PVY N605-GFP

Genotipska različica krompirja	Število rastlin
Désirée	25
NahG-Désirée	25

3.1.2.1 Gojišča in raztopine za pripravo rastlinskega materiala

Modificirano gojišče MS (Murashige in Skoog, 1962)

- 136 μM NaFeEDTA (Sigma, Nemčija)
- pH= 5,7-5,8
- Avtoklaviranje: 15 minut pri 120 °C in 1,1 bar

Fosfatni pufer za mehansko inokulacijo

- 20 mM fosfatni pufer z dodatkom 10 mM DIECA (dietilditiokarbamat) (Sigma, Nemčija)
- pH 7,4

3.1.2.2 Mehanska inokulacija rastlin

Po štirih tednih rasti v rastni komori z vlago smo rastline obeh genotipskih različic krompirja Désirée in NahG-Désirée (Preglednica 3) razdelili v tri skupine:

- slepo inokulirane rastline (inokulirane s sokom zdravih rastlin tobaka, od vsake genotipske različice krompirja 5 rastlin)
- rastline okužene z virusom PVY- N605 (od vsake genotipske različice krompirja 5 rastlin)
- rastline okužene z virusom PVY- N605-GFP (od vsake genotipske različice krompirja 15 rastlin)

Sok za inokulacijo rastlin smo pripravili iz poganjkov zdravih in s PVY N605 oz. PVY N605-GFP okuženih rastlin tobaka, ki smo jih homogenizirali v fosfatnem pufru za mehansko inokulacijo v razmerju 3 ml pufra na 1 g sveže mase rastlinskega materiala. Macerat smo inkubirali 5 minut, da se je virus izločil. Pred inokulacijo smo na vsaki

rastlini označili listne peclje treh najbolj spodnjih popolnoma razvitih listov brez znakov staranja (Slika 6). Označene liste smo posuli s karborundom (Sigma, Nemčija) in jih premazali z rastlinskim sokom za inokulacijo (2 do 3 kapljice) bodisi od zdravih (za slepo inokulacijo) bodisi od okuženih (za okužene rastline) rastlin. Po 10 minutah smo z vodo iz vodovoda sprali rastlinski sok in karborund z inokuliranih listov, pri čemer smo pazili, da se nismo dotikali ali poškropili ostalih listov.



Slika 6: Shematični prikaz spodnjih inokuliranih in zgornjih neinokuliranih listov

3.1.2.3 Pobiranje rastlinskega materiala

Pobiranje rastlinskega materiala je potekalo 6, 11, 18 dpi. Pobirali smo le zgornje liste okuženih rastlin. Slepо inokulirane rastline smo potrebovali samo za opazovanje simptomov (negativna kontrola inokulacije). Ob vsaki časovni točki smo posamezni rastlini s sterilnim skalpelom odrezali zgornje tri neinokulirane liste. V primeru, da je rastlini kakšen od omenjenih listov odpadel, smo vzorčili le preostala dva. Posamezen list smo najprej vzdolžno prerezali na obeh straneh ob glavni žili tako, da smo dobili 2 lamini brez žile. Polovico lamine smo še prečno prerezali in distalno polovico shranili za qPCR. Pobran rastlinski material smo shranili v sterilne 2-ml mikrocentrifugirke (Eppendorf, ZDA), v katere smo predhodno vstavili sterilne kovinske kroglice (Qiagen, Nemčija). Do analize smo material shranili pri -20 °C.

3.2 SPREMLJANJE POJAVLJANJA BOLEZENSKIH ZNAMENJ

Vzporedno s pobiranjem smo pri rastlinah vsak dan spremljali pojav bolezenskih znamenj tako na inokuliranih, kot tudi na neinokuliranih listih in vršičku rastline. Za vsak list smo popisali morebitna bolezenska znamenja. Rastline in njihove liste z izraženimi

bolezenskimi znamenji smo tudi fotografirali s pomočjo fotoaparata PENTAX K-7 (Ricoh, ZDA).

Podatke smo obdelali v programu »Microsoft Excel« (ZDA). Iz njih smo izračunali delež listov s posameznim bolezenskim znamenjem glede na število vseh opazovanih listov rastlin Désirée in NahG-Désirée, okužene z določenim genotipskim različkom virusa.

3.3 FLUORESCENČNA MIKROSKOPIJA

Liste slepo inokuliranih rastlin ter inokulirane in neinokulirane liste rastlin okuženih s PVY N605-GFP smo prenesli na objektno stekelce, dodali nekaj kapljic vode, pokrili s krovnim stekelcem in uporabili za fluorescenčno mikroskopijo.

Fluorescenco smo zaznavali vsak dan, in sicer s pomočjo avtomatiziranega fluorescentnega mikroskopa Eclipse Ti (Nikon, Japonska) pri 40-kratni povečavi. Mikroskop je zajemal več sto slik visoke ločljivosti in jih sestavil v detajlno sliko. Zajemanje je potekalo v zelenem in rdečem kanalu. V prvem primeru smo uporabili vzbujevalni filter, ki je prepuščal modro svetlobo z valovno dolžino 465-495 nm in emisijski filter, ki je prepuščal zeleno svetlobo z valovno dolžino 515-550 nm. V drugem primeru smo uporabili vzbujevalni filter, ki je prepuščal rumeno svetlobo z valovno dolžino 540/525 nm in emisijski filter, ki je prepuščal rdečo svetlobo z valovno dolžino 605/655 nm.

3.4 HOMOGENIZACIJA RASTLINSKEGA MATERIALA

Ves uporabljen rastlinski material smo homogenizirali s pomočjo homogenizatorja »Tissue Lyser« (Qiagen, Nemčija) 3 minute pri 30 tresljajih/s, z izjemo rastlinskega materiala Désirée in PW363 za optimizacijo metode za analizo miRNA, ki smo ga homogenizirali v terilnicah s pomočjo tekočega dušika.

3.5 IZOLACIJA RNA

3.5.1 Izolacija celokupne RNA s kompletom »MagMaxTM-96 Total RNA Isolation Kit« in z aparaturo »KingFisher«

Iz rastlinskega materiala zgornjih neinokuliranih listov rastlin Désirée in NahG-Désirée za preučevanje pomnoževanja in širjenja virusa PVY N605 in rastlinskega materiala Désirée in PW363 za optimizacijo metode za analizo miRNA, smo celokupno RNA izolirali s pomočjo kompleta »MagMaxTM-96 Total RNA Isolation Kit« (Ambion, ZDA) in aparature »KingFisher« (Thermo Scientific, ZDA).

»MagMaxTM-96 Total RNA Isolation Kit« temelji na klasični metodi razkroja rastlinskega materiala v gvanidijevem tiocianatu, ki raztaplja celične membrane in inaktivira nukleaze (Life Technologies Corporation, 2007). Za izolacijo nukleinskih kislin se uporabljajo magnetne kroglice »RNA Binding Beads«, z veliko površino, ki omogočajo vezavo RNA. Postopek vključuje zaporedja čiščenja RNA z namenom, da se odstranijo ostanki celičnih komponent, proteini in ostale kontaminante ter tretiranje z encimom DNaza (deoksiribonukleaza). Izolacija je lahko ročna ali avtomatizirana. V slednjem primeru se uporablja aparatura »KingFisher«.

Najprej smo pripravili vse potrebne mešanice za izolacijo (Preglednica 4).

Preglednica 4: Priprava mešanic »Lysis/Binding Solution«, »Bead Mix« in »Diluted TURBOTM Dnase«

Mešanica	Reagenti	Volumen/reakcija
»Lysis/Binding Solution«	»Lysis Binding Solution Concentrate«	270 µl
	»Plant RNA Isolation Aid«	30 µl
»Bead Mix«	»RNA Binding Beads«	10 µl
	»Lysis/Binding Enhancer«	10 µl
»Diluted TURBO TM Dnase«	»MagMax TM TURBO TM Dnase Buffer«	49 µl
	»TURBO TM Dnase«	1 µl

Pripravili smo tudi 96-mestne 200-µl ploščice »KingFisher-96« (Applied Biosystems, ZDA) za delo z aparatur »KingFisher« in vanje odpipetirali predvidene raztopine. Pipetirali smo po naslednjem vrstem redu: vrstica B, C, E, F, D, G in A (izopropanol in raztopina »Bead Mix«) (Preglednica 5). Ploščice smo do nadaljnjega shranili pri 4° C.

Preglednica 5: Shema nanosa raztopin na ploščico »KingFisher-96«

Vrstica na ploščici	Raztopine	Volumen/luknjico
A	Supernatant homogeniziranega tkiva v raztopini »Lysis/ Binding Solution Concentrate«	50 µl
	+ izopropanol	35 µl
	+ raztopina »Bead Mix«	20 µl
B	Raztopina »Wash Solution 1«	150 µl
C	Raztopina »Wash Solution 2«	150 µl
D	Raztopina »Diluted TURBO TM Dnase«	50 µl
E	Raztopina »Wash Solution 2«	150 µl
F	Raztopina »Wash Solution 2«	150 µl
G	Raztopina »Elution Buffer«	50 µl

V posamezno mikrocentrifugirko z rastlinskim materialom, smo dodali 300 µl mešanice »Lysis/Binding Solution« in homogenizirali v ohlajenih blokih (-20 °C).

Po homogenizaciji smo vzorec centrifugirali 5 minut pri 20 °C in 14000 g (centrifuga Eppendorf 5417R, ZDA). 50 µl dobljenega zgornjega bistrega sloja (supernatanta) smo nanesti v za posamezen vzorec predvideno luknjico vrstice A. Poleg tega smo pripravili negativno kontrolo izolacije, pri čemer smo namesto rastlinskega materiala uporabili vodo brez nukleaz. Ploščico z odpipetiranimi reagenti smo nato postavili v aparaturo »KingFisher«, namestili plastične nastavke za magnetne delce »MagMaxTM Express Comb« (Applied Biosystems, ZDA) in izbrali program »MagMax96_Total RNA«. Proces je trajal približno 30 minut po naslednjih korakih:

- V luknjicah vrstice A se je iz rastlinskih celic sproščena celokupna RNA vezala na magnetne delce (»RNA binding beads«).
- Magnetni delci z vezano RNA so se s pomočjo plastičnih nastavkov za magnetne prenesli v luknjice vrstice B, kjer so se sprali v raztopini »Wash Solution 1«.
- Iz vrstice B so se prenesli v luknjice vrstice C, kjer so se sprali v raztopini »Wash Solution 2«.
- Iz vrstice C so se prenesli v luknjice vrstice D, kjer je potekla razgradnja genomske DNA s pomočjo encima DNaza.
- Nato se je aparatura ustavila. V luknjice vrstice D je bilo potrebno dodati 100 µl raztopine »RNA Re-binding Solution«, da je prišlo do ponovne vezave RNA na magnetne kroglice.
- Magnetne kroglice z vezano RNA so se prenesle v luknjice vrstice E in F, kjer so se ponovno sprale v raztopini »Wash Solution 2«.
- Na koncu se je očiščena celokupna RNA posušila in prenesla v luknjice vrstice G, kjer se je raztopila v elucijskem pufru (raztopina »Elution Buffer«).
- Magnetne kroglice so se vrnile v luknjice vrstice B, izolirana čista RNA pa je bila v luknjicah vrstice G.

Izolirano RNA, raztopljeno v elucijskem pufru smo iz luknjic vrstice G prenesli v 1,5-ml sterilne mikrocentrifugirke in jih shranili v zamrzovalniku pri -80 °C.

3.5.2 Izolacija celokupne RNA z reagentom TRIzol

Za izolacijo celokupne RNA iz izbranega rastlinskega materiala (Preglednica 1) smo uporabili reagent TRIzol, monofazno raztopino fenola in gvanidijevega izotiocianata, ki med izolacijo ohranja integriteto RNA z inaktivacijo RNaz, sočasno pa ruši strukturo celic in razdira komplekse proteinov z nukleinskimi kislinami (Chomczynski in Sacchi, 1987).

Za izolacijo RNA smo uporabili 250 mg zamrznjenega rastlinskega materiala, ki smo mu dodali 1,5 ml reagenta TRIzol (Ambion, ZDA) in sterilno kovinsko kroglico ter homogenizirali. Nato smo vzorce inukubirali 5 minut pri sobni temperaturi in med inkubacijo vzorec dvakrat premešali s pomočjo vrtničnika Vibromix10 (Tehtnica, Slovenija). Inkubaciji je sledilo petminutno centrifugiranje pri sobni temperaturi in 12000 rpm (obratih na minuto) (centrifuga Eppendorf 5417R, ZDA). Potem smo prenesli zgornjo bistro fazo (supernatant) v nove sterilne 2-ml mikrocentrifugirke, dodali 0,5 volumna kloroforma (Merck, Nemčija) in dobro premešali ter inkubirali 3 minute pri sobni temperaturi. Vzorce smo nato 10 minut centrifugirali pri 4 °C in 12000 rpm, prenesli zgornjo, vodno brezbarvno fazo v nove 1,5-ml mikrocentrifugirke in precipitirali z izopropanolom (Merck, Nemčija) v razmerju 1:1, z obračanjem premešali ter inkubirali 10 minut pri sobni temperaturi. Sledilo je desetminutno centrifugiranje pri 4 °C in 12000 rpm. Potem smo previdno odstranili vodno fazo, sprali usedlino z 1 ml 75-% etanola in ponovno 10 minut centrifugirali pri 4 °C in 12000 rpm. Po centrifugiranju smo odstranili etanol, ponovno sprali usedlino z 1 ml 75-% etanola in ponovili centrifugiranje pri enakih pogojih. Nato smo odstranili etanol in na zraku posušili usedlino, ki je vsebovala RNA. Posušeno usedlino smo raztopili v 30 µl vode brez RNaz (Qiagen, Nemčija) in izolirano RNA do nadaljnje uporabe shranili pri -80 °C.

3.5.3 Izolacija celokupne RNA s kompletom »RNeasy Plant Mini Kit«

Za izolacijo rastlinskega materiala Désirée in PW363 smo celokupno RNA izolirali s pomočjo kompleta »Rneasy Plant Mini Kit« (Qiagen, Nemčija), ki vsebuje lizni pufer »RLT« z gvanidijevim izotiocianatom za inaktivacijo RNaz, kolone »QIAshredder« za odstranjevanje netopnih delcev in kolone »RNeasy Mini« s silikatno membrano za vezavo RNA in spiranje nečistoč. Izolacijo smo izvajali po standardnem protokolu in z modifikacijo, ki naj bi omogočala elucijo večjega deleža malih RNA.

Uporabili smo približno 80 mg rastlinskega materiala, ki smo ga homogenizirali ter mu dodali 450 µl na 65 °C predhodno segretega liznega pufra »RLT« ter premešali na vrtničniku Vibromix10 (Tehtnica, Slovenija). Nato smo lizat inkubirali 5 minut pri 56 °C. Med inkubacijo smo lizat dvakrat premešali in ga nanесли na kolono »QIAshredder« ter centrifugirali 30 sekund pri 18000 g pri sobni temperaturi (centrifuga Eppendorf 5417R, ZDA). Nato smo 400 µl filtrata prenesli v novo 2-ml mikrocentrifugirko, dodali 200 µl oz. 600 µl (za modificirano izolacijo) absolutnega etanola (Merck, Nemčija) in premešali s pipetiranjem. Vsebinsko mikrocentrifugirke smo prenesli na kolono »RNeasy Mini« in centrifugirali 30 sekund pri 18000 g pri sobni temperaturi. Zatem smo kolono trikrat sprali, najprej s 700 µl pufra »RW1« in dvakrat s 500 µl pufra »RPE«. Med posameznimi spiranji smo kolono centrifugirali in sicer po prvih dveh spiranjih 30 sekund pri 18000 g ter po zadnjem spiranju 2 minuti pri istih obratih in isti temperaturi. Kolono smo nato prestavili v 2-ml prazno mikrocentrifugirko in centrifugirali 30 sekund pri najvišjih obratih in sobni

temperaturi. Po centrifugiranju smo kolono prestavili v 1,5-ml zbiralno mikrocentrifugirko in na membrano kolone nanesti 50 µl vode brez RNaz (Qiagen, ZDA), predhodno segrete na 80 °C ter inkubirali 10 minut pri sobni temperaturi. RNA smo eluirali s centrifugiranjem 2 minuti pri 18000 g in sobni temperaturi ter jo do nadaljnje uporabe shranili pri -80 °C.

3.6 TRETIRANJE VZORCEV RNA Z ENCIMOM DNaza

Za odstranjevanje morebitno prisotne genomske DNA v vzorcih RNA, ki ni bila izolirana s kompletom »MagMaxTM-96 Total RNA Isolation Kit« (že vključena reakcija z encimom DNaza), smo uporabili encim DNaza I (Invitrogen, ZDA). Pripravili smo reakcijske mešanice, ki so vsebovale 1 µg RNA, pufer »10x DNase I Reaction Buffer« (1/10 končnega volumna) (Invitrogen, ZDA), encim DNaza I in ustrezno količino vode brez RNaz (Qiagen, Nemčija) (Preglednica 6).

Preglednica 6: Priprava 10-µl reakcijske mešanice za razgradnjo DNA

Osnovna reakcijska mešanica vsakega vzorca	
Reagent	Volumen /reakcijo
10-kratni pufer	1 µl
DNaza	0,1 µl
Mešanica za posamezen vzorec	
1 µg RNA	x µl (določili glede na izmerjene koncentracije)
voda brez RNaz	do 10 µl

Pripravljene mešanice smo inkubirali 15 minut pri sobni temperaturi. Sledila je inaktivacija z 1 µl 25 mM EDTA (etilendiamintetraocentnokislino) (Sigma, Nemčija) in segrevanje, 10 minut pri 65 °C. Nato smo vzorce ohladili na ledu in jim dodali 19 µl vode brez RNaz ter jih do nadaljnje uporabe shranili pri -80 °C.

3.7 MERJENJE KONCENTRACIJE, ČISTOSTI IN INTEGRITETE RNA

Za oceno uspešnosti izolacije smo vzorcem spektrofotometrično pomerili koncentracijo RNA s pomočjo aparature »NanoDrop ND-1000« (Technologies, ZDA). Spektrofotometer omogoča natančno merjenje koncentracij nukleinskih kislin, proteinov, bakterijskih kultur in fluorokromov že v 1 µl vzorca. Delovanje temelji na merjenju absorbance s pomočjo dveh optičnih vlaken in preračunavanju koncentracije z uporabo Lambert-Beerovega zakona. Pri določanju koncentracije RNA smo uporabili po 1,5 µl vzorca. Spektrofotometer smo predhodno umerili na vodo, ki ni vsebovala RNaz in merili absorbcijo posameznega vzorca pri valovni dolžini 260 nm, pri kateri nukleinske kisline absorbirajo največ UV svetlobe. Izmerjene koncentracije celokupne RNA so bile izražene

v ng/μl. Poleg tega smo preverili tudi čistost RNA in sicer na podlagi razmerja absorbanc 260/280 in 260/230. Nizko razmerje absorbanc 260/280 pomeni, da je vzorec kontaminiran s proteini, medtem ko nizko razmerje absorbanc 260/230 kaže na vsebnost fenola, TRIZola, EDTA, ogljikovih hidratov ipd. Če sta razmerji manjši od 1,8 pomeni, da vzorec ni primerno čist, zaradi česar lahko prihaja do negativnih učinkov pri nadaljnjih analizah kot je npr. inhibicija PCR (Thermo Fisher Scientific, 2008).

Za določitev kvalitete izolirane RNA smo poleg spektrofotometra »NanoDrop« uporabili tudi agarozno gelsko elektroforezo. Z metodo smo preverili ali je med izolacijo morda prišlo do razgradnje RNA in/ali so vzorci kontaminirani še z genomsko DNA. Pripravili smo 1-% agarozni gel, za katerega smo potrebovali 1,4 g agaroze (Invitrogen, ZDA) in 40 ml pufra TAE. Mešanico smo segrevali do vretja, da se je agarosa povsem raztopila, nato smo mešanico nekoliko ohladili, ji dodali še 7 μl etidijevega bromida (Sigma, Nemčija) in razlili na nosilec za gel ter pustili, da se strdi. V gel smo vnašali po 15 μl mešanice celokupne RNA, v katero smo predhodno dodali 1-kratni nanašalni pufer in sterilno bidestilirano vodo. Pripravljene mešanice smo vnesli v vdolbinice gela. Za kontrolo smo v gel vnesli 5 μl označevalca velikosti fragmentov DNA »MassRuler™ DNA Ladder Mix« (Fermentas, ZDA). Elektroforeza je tekla 30 minut pri 100 V in 500 mA, s pomočjo napajalnika »POWER/PAC 1000« (BIO-RAD, ZDA). Po končani elektroforezi smo RNA zaznavali pod UV svetlobo s pomočjo transiluminatorja »M-26 UV Transilluminator« (MIDSCI, ZDA) in gel slikali s pomočjo programa »UVI Photo MW« (Biosystematica, ZDA).

3.7.1 Pufri in reagenti za elektroforezo v agaroznem gelu

1-kratni nanašalni pufer

- 100 μl 6-kratnega nanašalnega barvila (Fermentas, ZDA)
- 500 μl 100-% glicerola (Roche, Nemčija)
- 500 μl sterilne bidistilirane vode

pufer TAE:

- 40 mM Tris-acetat (Sigma, Nemčija)
- 1mM EDTA (Sigma, Nemčija)

3.8 PCR V REALNEM ČASU

3.8.1 Analizirani pomnožki

Za zaznavanje in relativno kvantifikacijo virusov PVY N605 in PVY N605-GFP v okuženih vzorcih rastlin krompirja, smo uporabili RT-qPCR v enem koraku. Tarčno

molekulo pri pomnoževanju je predstavljal odsek gena za plaščni protein virusa PVY. Uporabili smo začetne oligonukleotide PVYuni_F in PVYuni_R in sondo PVYuni_P (Preglednica 7; Kogovšek in sod., 2008). Hkrati smo kot referenčni gen pomnoževali gen za citokrom oksidazo krompirja (COX; Weller in sod., 2000).

Preglednica 7: Nukleotidna zaporedja začetnih oligonukleotidov (F, R) in sond (P), specifična za pomnožek PVYuni-cDNA, ki so jih oblikovali Kogovšek in sod. (2008) in za pomnožek COX-cDNA, ki so jih oblikovali Weller in sod. (2000)

PVYuni-cDNA	
PVYuni_P	5'-TGATGAATGGGCQTATGGTTTGGTGCA-3'
PVYuni_F	5'-CAT AGGAGA AACQGAGATGCCAACQ-3'
PVYuni_R	5'-TGGCGAGGTTCCATTTTCA-3'
COX-cDNA	
COX_P	5'-TGCQTACGCQGGATGGAATGCCCQ-3'
COX_F	5'-CGTCGCATTCCAGATTATCCA-3'
COX_R	5'-CAACQACGGATATATAAGAGCCAAAACQG-3'

Za analizo miRNA smo uporabili teste ath-miR168a (št. testa 000351), ath-miR172a (št. testa 000359), gma-miR390b (št. testa 007109_mat), ghr-miR482a (št. testa 241653_mat) in sly-miR5300 (št. testa 462732_mat) (Life Technologies, ZDA) (Preglednica 8).

Preglednica 8: Nukleotidna zaporedja analiziranih miRNA

miRNA	Nukleotidno zaporedje
ath- miR168a	5'-UCGCUUGGUGCAGGUCGGGAA-3'
ath-miR172a	5'-AGAAUCUUGAUGAUGCUGCAU-3'
gma- miR390b	5'-AAGCUCAGGAGGGAUAGCACC-3'
ghr-miR482a	5'-UCUUUCCUACUCCUCCCAUACC-3'
sly-miR5300	5'-UCCCCAGUCCAGGCAUCCAAC-3'

Začetne oligonukleotide in sondo za analizo St-snoU6 RNA so oblikovali kot »Custom Gene Expression Assay« (Life Technologies, ZDA) na podlagi nukleotidnega zaporedja zrele molekule snoU6 RNA krompirja (*Solanum tuberosum* L.):

5'-GUCCCUUCGGGGACAUCCGAUAAAAUUGGAACGAUACAGAGAAGAUUAGC
AUGGCCCCUGCGCAAGGAUGACACGCACAAAUCGAGAAAUGGUCCAAAUUU-
3'.

3.8.2 RT- qPCR v dveh korakih

Pri RT-qPCR v dveh korakih smo najprej RNA prepisali v cDNA z uporabo kompleta »High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit« (Life Technologies, ZDA) oz. kompleta »TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit« (Life Technologies, ZDA). Po sintezi

cDNA smo izvedli qPCR, pri čemer smo uporabili bodisi reakcijsko mešanico »TaqMan® Universal Master Mix II« (Life Technologies, ZDA) bodisi reakcijsko mešanico »TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase®« (Life Technologies, ZDA).

3.8.2.1 Obratno prepisovanje malih RNA

Za prepis miRNA v cDNA smo uporabili komplet »TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit«. Za posamezno reakcijo (ločene reakcije za vsako miRNA) smo potrebovali 2,5 µl RNA, predhodno tretirane z encimom DNaza, 3,5 µl reakcijske mešanice, ki je vsebovala pufer »RT buffer«, encim reverzna transkriptaza »MultiScribe Reverse Transcriptase«, inhibitor RNaz, vodo brez nukleaz, mešanico dNTP-jev (deoksiribonukleotid trifosfatov) in po 1,5 µl raztopine začetnih oligonukleotidov z zanko, specifičnih za posamezno miRNA (ath-miR168a, ath-miR172a, gma-miR390b, ghr-miR482a in sly-miR5300) (Preglednica 9).

Preglednica 9: Reakcijska mešanica za obratno prepisovanje z uporabo kompleta »TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit«

Reagenti	Volumen/ reakcijo
Mešanica dNTP-jev	0,075µl
Reverzna transkriptaza	0,5 µl
10-kratnpufer	0,75 µl
voda brez RNaz	2,08 µl
Inhibitor RNaz	0,095 µl

Najprej smo pripravili reakcijsko mešanico, v katero smo dodali 2,5 µl neredčene oziroma 2,5 µl 10- ali 100-krat redčene RNA in 1,5 µl začetnih oligonukleotidov ter nežno premešali in kratko centrifugirali. Uporabili smo termopomnoževalnik »GeneAmp PCR System 9700 HT« (Life Technologies, ZDA). Obratno prepisovanje je teklo po naslednjem programu:

- 30 minut pri 16 °C
- 30 minut pri 42 °C
- 5 minut pri 85 °C

Vzorci smo po končanem obratnem prepisovanju do nadaljnje uporabe shranili pri -20 °C.

3.8.2.2 Obratno prepisovanje celotne populacije mRNA

Za prepis RNA v cDNA smo uporabili komplet »High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit« (Life Technologies, ZDA). Za posamezno reakcijo smo uporabili 12,5 µl RNA, ki smo jo predhodno tretirali z encimom DNaza in 12,5 µl reakcijske mešanice, ki je vsebovala pufer, encim reverzna transkriptaza »MultiScribe Reverse Transcriptase«,

inhibitor RNaz, vodo brez nukleaz, dNTP-je in naključne začetne oligonukleotide, ki se prilegajo enakomerno po celi mRNA (Preglednica 10). RNA smo pred dodatkom reakcijske mešanice najprej denaturirali tako, da smo jo inkubirali 5 minut pri 80 °C. S tem smo razklenili morebitno prisotne sekundarne strukture. Nato smo vzorce hitro ohladili na ledu in dodali reakcijsko mešanico, nežno premešali in kratko centrifugirali.

Preglednica 10: Reakcijska mešanica za obratno prepisovanje z uporabo kompleta »High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit«

Reagenti	Volumen/ reakcijo
Pufer RT	2,5 µl
Naključni začetni oligonukleotidi	2,5 µl
Mešanica dNTP-jev	1 µl
Voda brez RNaz	4,25 µl
Inhibitor RNaz	1 µl
Reverzna transkriptaza (50 U/ µl)	1,25 µl

Uporabili smo termopomnoževalnik »GeneAmp PCR System 9700 HT« (Life Technologies, ZDA). Obratno prepisovanje je teklo po naslednjem programu:

- 10 minut pri 25 °C
- 120 minut pri 37 °C

Vzorce smo po končanem obratnem prepisovanju do nadaljnje uporabe shranili pri -20 °C.

3.8.2.3 qPCR

Po sintezi cDNA smo izvedli qPCR, pri čemer smo uporabili bodisi reakcijsko mešanico »TaqMan® Universal Master Mix II« bodisi reakcijsko mešanico »TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG«, ki vsebujeta mešanico dNTP-jev, pasivno referenčno barvilo ROX in optimizirane komponente pufru. Prvi vsebuje še encim uracil-DNA N-glikozilazo (UNG), ki preprečuje kontaminacije s produkti PCR. V reakcijsko mešanico smo dodali še začetne oligonukleotide in sonde specifične za posamezno miRNA (»TaqMan® Small RNA Assay«), za COX-mRNA in St-snoU6 RNA. Za pomnoževanje cDNA/miRNA smo pripravili 5,5 µl-reakcijske mešanice (Preglednica 11) in za pomnoževanje cDNA/COX-mRNA (Preglednica 12) ter DNA/St-snoU6 RNA (Preglednica 13), 8 µl- reakcijske mešanice.

Preglednica 11: Priprava reakcijske mešanice za pomnoževanje cDNA/ miRNA

Reagenti	Volumen/ reakcijo
»TaqMan® Universal PCR Master Mix II, no UNG«	5 µl
»TaqMan® Small RNA Assay«	0,5 µl

Preglednica 12: Priprava reakcijske mešanice za pomnoževanje cDNA/ COX-mRNA

Reagenti	Volumen/ reakcijo
»TaqMan® Universal PCR Master Mix II, no UNG«	5 µl
10 µM sonda_COX	0,15 µl
30 µM smiselni začeni oligonukleotid_COX	0,1 µl
30 µM protismiselni začeni oligonukleotid_COX	0,1 µl
voda brez nukleaz	2,65 µl

Preglednica 13: Priprava reakcijske mešanice za pomnoževanje cDNA/ St-snoU6 RNA

Reagenti	Volumen/ reakcijo
»TaqMan® Universal PCR Master Mix II, no UNG«	5 µl
»Assay mix St-snoU6«	0,5 µl
Voda brez nukleaz	2,5 µl

V luknjice ploščice za PCR smo najprej vnesli pripravljene reakcijske mešanice in 4,5 µl oziroma 2 µl ustrezno redčene cDNA (Preglednica 14), da smo za vse pomnožke pridobili končne reakcijske mešanice volumna 10 µl.

Preglednica 14: Uporabljene redčine cDNA za qPCR

Pomnožek	Redčine cDNA
miRNA-cDNA	1:8, 1:80, 1:800
COX-cDNA, St-snoU6-cDNA	1:10, 1:100

Redčeno cDNA smo vnašali v dveh paralelkah in dodatno še negativno kontrolo za vsako reakcijsko mešanico, kjer smo namesto vzorca vnesli sterilno destilirano vodo. Prav tako smo za vsak pomnožek na ploščico vnesli serijo redčitev zbirka frakcij (»pool«) za umeritveno krivuljo. Zbirek frakcij smo pripravili tako, da smo vzeli po 1 µl cDNA vsakega vzorca in ga potem redčili. Ploščico smo prekrili z optično folijo in centrifugirali 2 minuti pri 1000 g (centrifuga »Sigma 3-18 KS«, ZDA).

Reakcijo smo izvedli z aparaturo »Roche Light Cycler« (Roche, Nemčija) po naslednjem programu:

- 2 minuti pri 50 °C za aktivnost uracil-DNA N-glikozilaze (korak je vključen v primeru uporabe reakcijske mešanice »TaqMan® Universal PCR Master Mix II«)
- 10 minut pri 95 °C za aktivacijo polimeraze DNA
- 45 ciklov: 15 sekund pri 95 °C, 1 minuta pri 60 °C (pomnoževanje cDNA)

3.8.3 RT-qPCR v enem koraku

Za izvedbo RT-qPCR v enem koraku smo uporabili komplet »AgPath- ID™ One step RT-PCR kit« (Ambion, ZDA), ki je vključeval pufer »2x RT-PCR Buffer« in encim »25x RT-PCR Enzyme Mix«. Poleg tega smo v reakcijo morali dodati še vodo brez nukleaz in začetne oligonukleotide (smiselne-F in protismiselne-R) ter sonde, specifične za pomnožka PVYuni-cDNA in COX-cDNA. Za vsak vzorec smo si pripravili dve različni reakcijski mešanici (Preglednica 15).

Preglednica 15: Reakcijski mešanici za pomnožek COX-cDNA in PVYuni-cDNA za RT-qPCR v enem koraku

Reagent	Volumen/ reakcijo (μl)
» 2x RT-PCR Buffer«	5
voda brez nukleaz	1,95
F:smiselni začetni oligonukleotidi 10μM	0,25
R:protismiselni začetni oligonukleotidi 10μM	0,25
P:sonda 10 μM	0,15
»25x RT-PCR Enzyme Mix«	0,4

S pomočjo robota »Robotic Liquid Handling System MultiPROBE II PLUS EX« (Perkin Elmer, ZDA) smo pripravili 10-μl reakcijske mešanice, ki so vsebovale 8 μl pripravljene reakcijske mešanice (Preglednica 15) in 2 μl vzorca RNA. V jamice ploščice za PCR smo vnesli neredčeno in 10-krat redčeno RNA posameznega vzorca in sicer v dveh paralelkah za oba pomnožka. Robot je v luknjice najprej vnesel RNA in nato reakcijsko mešanico. Za vsak pomnožek smo uporabili svojo ploščico in za vsako ploščico pripravili tudi umeritveni krivulji pomnoževanja obeh pomnožkov. Pri tem smo vzeli vzorec RNA, ki je vseboval obe tarčni molekuli in pripravili serijo redčitev (do 10^{-6}). Za vsak pomnožek smo vnesli tudi negativni kontroli izolacije in negativni kontroli PCR, pri katerih smo namesto vzorca RNA dodali sterilno destilirano vodo. Ploščice smo prekrili z optično folijo in centrifugirali 2 minuti pri sobni temperaturi in 1000 rpm (centrifuga »Sigma 3-18 KS«, ZDA).

RT- qPCR v enem koraku smo izvedli pri naslednjih pogojih:

- 10 minut pri 48 °C za reakcijo obratnega prepisovanja
- 10 minut pri 95 °C za inaktivacijo reverzne transkriptaze in aktivacijo polimeraze DNA
- 45 ciklov: 15 sekund pri 95 °C, 1 min pri 60 °C (pomnoževanje cDNA)

Za RT-qPCR v enem koraku smo uporabili aparaturo »ABI PRISM 7900 Sequence Detection System« (Applied Biosystems, ZDA).

3.9 OBDELAVA PODATKOV IN STATISTIČNO VREDNOTENJE REZULTATOV

Ker smo za RT-qPCR uporabljali različne aparature, je tudi osnovna analiza podatkov tekla z različnimi programi. Podatke RT-qPCR v dveh korakih smo analizirali s programom »LightCycler 480 SW 1.5.« (Roche Diagnostics, Nemčija), podatke RT-qPCR v enem koraku pa s programom »SDS 2.3« (Applied Biosystems, ZDA). Slednji računalniški program izračuna spremembo v signalu fluorescence posameznega vzorca (ΔR_n), kot razliko med emisijo fluorescence produkta v določeni časovni točki in emisijo fluorescence ozadja v isti časovni točki in izriše krivuljo pomnoževanja produkta PCR, ki prikazuje odvisnost ΔR_n od števila ciklov kvantifikacije (C_q). Krivulja pomnoževanja produkta ima tri faze: lag fazo, kjer je fluorescenčni signal zaradi nizke začetne količine produkta še prešibak in ga ne moremo razlikovati od fluorescence ozadja, eksponentno fazo, kjer se z vsakim ciklom število kopij tarčnega zaporedja podvoji in plato fazo, kjer pride do zasičenosti fluorescentnega signala, zaradi porabe reagentov. Prag določljivosti je določen tako, da seka krivuljo pomnoževanja v točki, kjer je fluorescenca nastalega produkta statistično značilno višja od fluorescence ozadja, kar je v začetnem delu eksponentne faze. Število ciklov, ki so potrebni za dvig signala fluorescence nad prag predstavlja vrednost C_q . Večje kot je število kopij naše tarčne molekule v reakciji, prej bo fluorescentni signal presegel prag, kar pomeni, da bo vrednost C_q nižja. Se pravi, da so vrednosti C_q obratno sorazmerne s koncentracijo tarčne molekule in ta lastnost omogoča kvantifikacijo nukleinskih kislin.

Za oba pomnožka, PVYuni-cDNA in COX-cDNA smo nastavili avtomatsko osnovno linijo, ki predstavlja število ciklov pred dvigom fluorescence nad vrednost ozadja in prag v eksponentnem območju pomnoževanja, za COX=0,25 in za PVYuni=0,15. Program »LightCycler 480 SW 1.5.« je sam avtomatsko določil vrednosti C_q glede na točko, kjer pride do prevoja posamezne krivulje pomnoževanja. Ta točka hkrati predstavlja maksimum drugega odvoda te iste krivulje, zato se metoda imenuje »2nd Derivative Maximum Method« (Roche Diagnostics, 2008).

Dobljene vrednosti C_q smo prenesli v program »Microsoft Excel« (Microsoft, ZDA) in preverili razliko v vrednostih C_q med ponovitvama (paralelkama), če je bila razlike > 0,5 smo takšne rezultate izključili. Poleg tega smo izračunali učinkovitosti pomnoževanja med dvema zaporednima redčitvama za vsak vzorec po enačbi (1). Učinkovitost reakcije pomnoževanja smo smatrali za zadovoljivo, če je bil naklon premice (k) med vrednostma -4 in -3 in če je bila izračunana učinkovitost med 78 in 115 %. Vrednosti izven območja pomenijo, da pomnoževanje ni več učinkovito ter da se število novonastalih kopij tarčne DNA ne povečuje več eksponentno z vsakim ciklom, kar pomeni, da kvantifikacija ni pravilna. Za namen primerjave metod pri optimizaciji analize miRNA, smo v primeru vzorcev z učinkovitostjo pomnoževanja nad 110 % upoštevali rezultate bolj redčenega vzorca, pri vzorcih z učinkovitostjo pod 90 % pa rezultate manj redčenega.

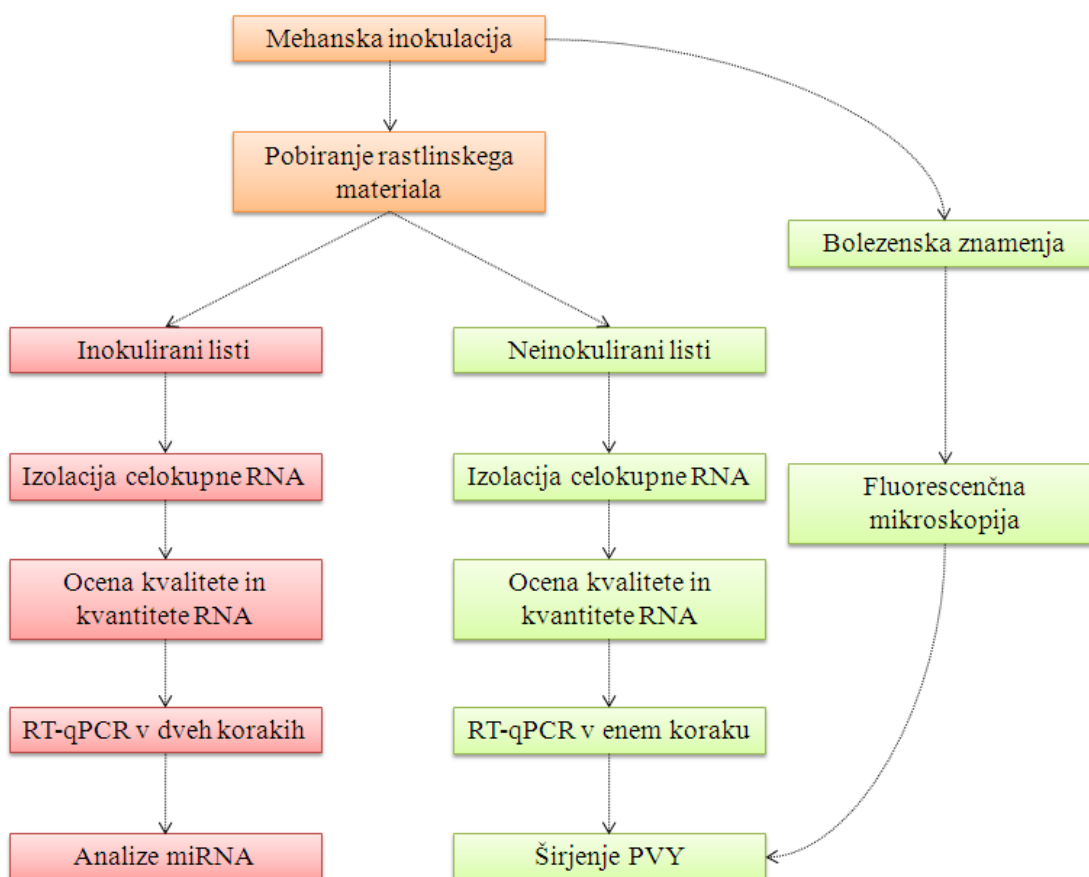
$$E = (10^{(1/k)}) - 1, \quad \dots(1)$$

k.... naklon linearne regresijske premice med logaritmiranimi vrednostmi količine tarče in vrednostmi Cq

Za relativno kvantifikacijo smo uporabili princip, ki temelji na uporabi relativne standardne krivulje, pri čemer ne potrebujemo absolutne količine tarčne DNA, ampak izberemo vzorec, v katerem sta prisotna tako tarčni kot tudi referenčni gen. Iz izbranega vzorca smo pripravili serijo 10-kratnih redčitev, ki smo jih uporabili za pomnoževanje in zaznavanje tarčnega in referenčnega pomnožka. Z izrisom pridobljenih vrednosti Cq redčitvene vrste v odvisnosti od $\log_{10}$ začetne količine tarčne DNA, smo za vsak pomnožek pridobili t.i. relativno standardno krivuljo, s katero smo izračunali teoretično število kopij tarčnega in referenčnega gena v posameznem vzorcu. Tako imenovana normalizacija podatkov je tekla po enačbi:

4 REZULTATI

Potek eksperimentalnega dela je prikazan na Sliki 7.



Slika 7: Shema poteka eksperimentalnega dela. Delo je bilo razdeljeno na dva ločena poskusa: preučevanje pomnoževanja in širjenja PVY N605 ter analizo miRNA. Pri obeh poskusih smo uporabili rastlinski material rastlin Désirée in NahG-Désirée. Za preučevanje pomnoževanja in širjenja PVY N605 smo rastlinski material pripravili sami. Rastline smo inokulirali bodisi s sokom okuženih (s PVY N605) ali zdravih rastlin, na katerih smo opazovali pojav bolezenskih znamenj in zaznavali s proteinom GFP označen virus s fluorescenčno mikroskopijo. Hkrati smo v določenih časovnih točkah pobrali material zgornjih neinokuliranih listov, iz katerih smo izolirali celokupno RNA, ocenili njeno kvaliteto in kvantiteto in jo uporabili v RT-qPCR v enem koraku. Za analizo miRNA smo uporabili že pripravljen rastlinski material. Rastline Désirée in NahG-Désirée so bile inokulirane bodisi s sokom okuženih (s PVY^{NTN}) ali zdravih rastlin. Uporabili smo ½ lamine 2. spodnjih inokuliranih listov, pobranih 3 dpi. Iz pobranih listov smo izolirali celokupno RNA, ocenili njeno kvaliteto in kvantiteto ter izolirano celokupno RNA inokuliranih listov uporabili za analizo miRNA v RT-qPCR v dveh korakih.

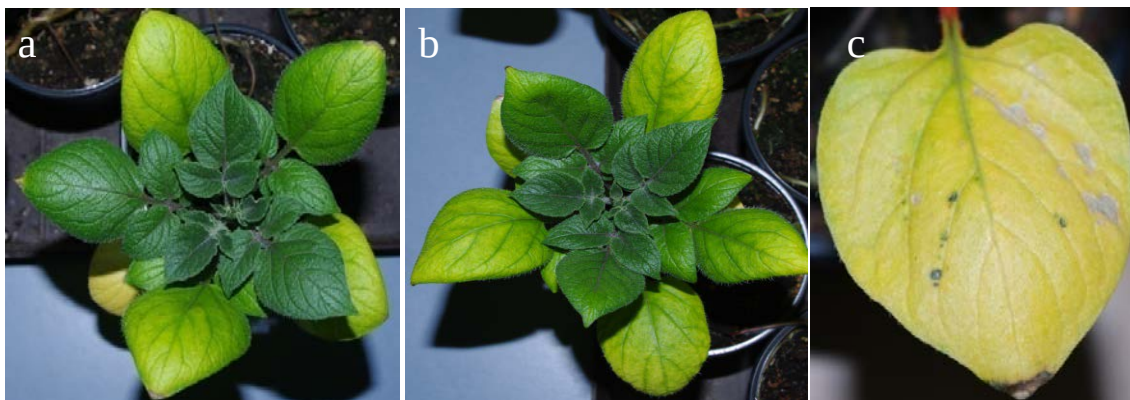
4.1 POMNOŽEVANJE IN ŠIRJENJE VIRUSA PVY N605 PO RASTLINI

Pomnoževanje in širjenje virusa PVY N605 v rastlinah sorte Désirée in transgenih rastlinah NahG-Désirée smo raziskovali s spremljanjem pojavljanja bolezenskih znamenj, fluorescenčno mikroskopijo in RT-qPCR v enem koraku (Slika 7). Zanimalo nas je, ali bomo zaznali kakšne razlike v pojavljanju, intenziteti bolezenskih znamenj ter širjenju virusa v odvisnosti od analizirane genotipske različice krompirja in ali se bo z GFP označen virus enako dobro pomnoževal in širil po rastlini brez oz. z genom *nahG*. Za inokulacijo z virusom PVY N605 smo uporabili po 5 rastlin posamezne genotipske različice krompirja ter za inokulacijo z virusom PVY N605-GFP 15 rastlin, ker nismo vedeli, kako učinkovito bo okuževanje.

4.1.1 Bolezenska znamenja

Pri rastlinah Désirée in NahG-Désirée smo v različnih časovnih točkah spremljali pojavljanje bolezenskih znamenj tako na inokuliranih kot tudi na zgornjih neinokuliranih listih in vršičku rastline ter jih primerjali s slepo inokuliranimi rastlinami, na podlagi česar smo lahko sklepali, katera znamenja so bila resnično posledica virusne okužbe in katera zgolj mehanske inokulacije. Na določenih inokuliranih listih smo opazili manjša, svetlo rjava področja odmrlega tkiva, ki so nastala zaradi poškodb pri inokulaciji s karborundom. Teh morfoloških sprememb nismo upoštevali kot bolezenska znamenja.

Pri rastlinah sorte Désirée smo prve morfološke spremembe na inokuliranih listih zaznali 18 dpi, tako pri rastlinah inokuliranih s PVY N605, kot tudi pri rastlinah inokuliranih s PVY N605-GFP (Slika 8). Kazala so se na vseh prisotnih inokuliranih listih, predvsem v obliki bolj ali manj izrazitega rumenenja. Na inokuliranih listih pri določenih rastlinah smo zaznali tudi majhne točkaste nekroze (Slika 8c). Rumenenje in pojav majhnih točkastih nekroz smo zaznali tudi pri slepo inokuliranih rastlinah (Slika 8a).



Slika 8: Bolezenska znamenja rastlin Désirée po okužbi z virusom PVY N605. Slepo inokulirana rastlina (a), okužena rastlina (b) in prvi spodnji inokulirani list 18 dpi (c).

Na zgornjih, predvsem drugem in tretjem neinokuliranem listu, poleg obleditve listov iz temno v svetlo zeleno barvo in blagega rumenenja, ni bilo vidnih drugih bolezenskih znamenj (Slika 8b). Podobno smo opazili tudi pri slepo inokuliranih rastlinah (Slika 8a). Vršički so bili pri vseh rastlinah brez bolezenskih znamenj.

Večjih razlik na rastlinah, ki smo jih inokulirali z označenim virusom tako nismo zaznali. Rastline niso razvile niti lokalnih niti sistemskih bolezenskih znamenj. Spremembe barve listov v svetlo zeleno se je pokazala pri vseh rastlinah 18 dpi. Delež odpadlih inokuliranih listov je bil podoben, v primeru inokulacije s PVY N605 (67 %) in pri PVY N605-GFP (76 %) (Preglednica 16).

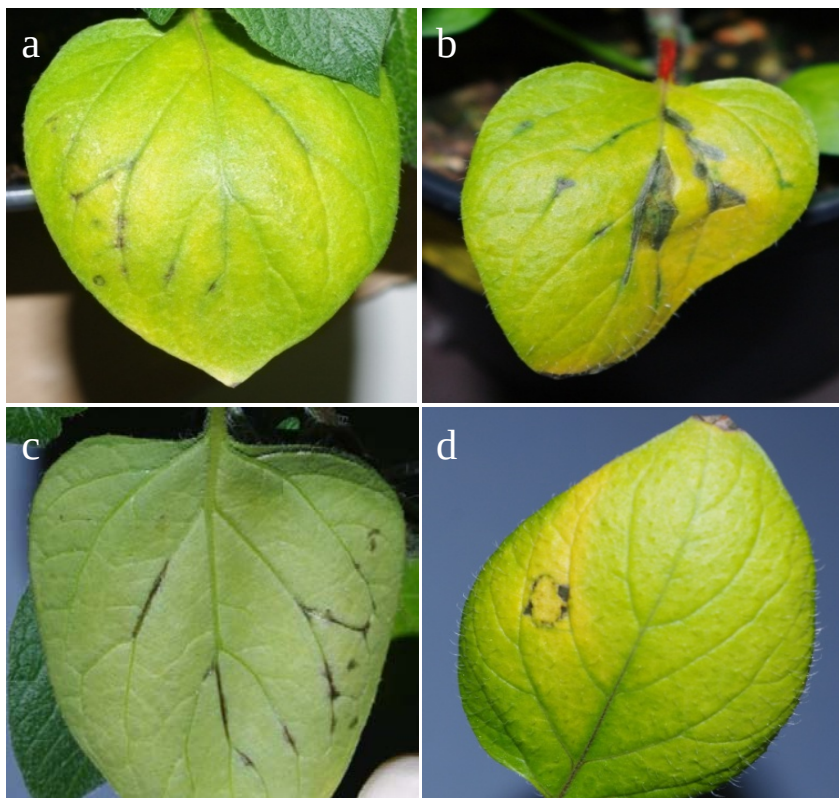
Preglednica 16: Bolezenska znamenja pri rastlinah Désirée in NahG-Désirée po inokulaciji z neoznačenim in s proteinom GFP označenim virusom PVY N605 v treh časovnih točkah.

Genotipska različica krompirja	Vrsta inokuluma	dpi	Lokalna bolezenska znamenja			Sistemska bolezenska znamenja
			nekroze	rumenenje	odpadli listi	
Désirée	PVY N605	6	0	0	0	0
		10	0	0	0	0
		18	0	100	67	0
Désirée	PVY N605-GFP	6	0	0	0	0
		10	0	0	0	0
		18	0	100	76	0
NahG-Désirée	PVY N605	6	0	0	0	0
		10	42	42	0	8
		18	0	0	100	50
NahG-Désirée	PVY N605-GFP	6	0	0	0	0
		10	62	56	0	0
		18	100	100	95	30

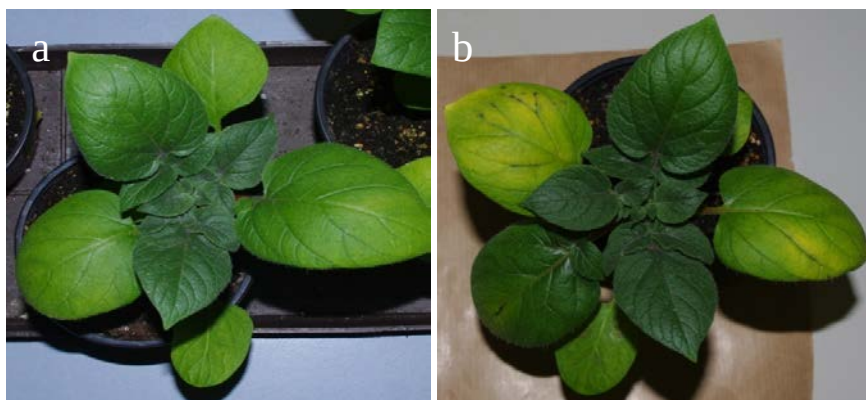
Prikazani so deleži inokuliranih listov, ki kažejo lokalna bolezenska znamenja (nekroze) ter rumenenje oz. so odpadli in delež zgornjih treh neinokuliranih listov, ki kažejo sistemska bolezenska znamenja (nekroze in rumenenje). Vse slepo inokulirane rastline so bile brez bolezenskih znamenj.

Pri rastlinah NahG-Désirée so se prve morfološke spremembe na inokuliranih listih pojavile 8 dpi, tako pri rastlinah, inokuliranih s PVY N605, kot tudi tistih, inokuliranih s PVY N605-GFP, in sicer v obliki točkastih (Slika 9a) in črtastih nekroz na listnih žilah (žilne nekroze) (Slika 9c). Te so iz dneva v dan postajale številčnejše in vse bolj izrazite (Slika 9b). Zaznali smo tudi obročkasto nekrozo, ki se je pojavila 10 dpi na prvem spodnjem inokuliranem listu rastline, ki smo jo inokulirali s PVY N605-GFP (Slika 9d). Na rastlinah inokuliranih s PVY N605 obročkastih nekroz nismo zaznali. Zaradi nekroz so odmirali inokulirani listi vseh rastlin in so do 18 dpi že skoraj vsi odpadli. Slepo inokulirane rastline NahG-Désirée, poleg bledenja iz temno v svetlo zeleno barvo

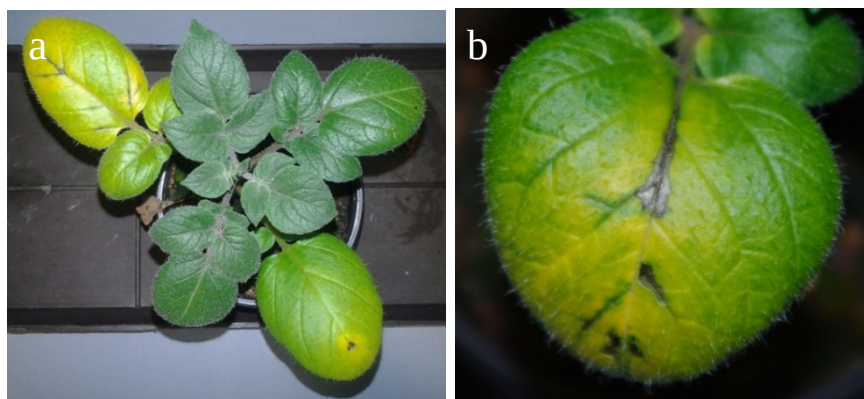
inokuliranih listov niso kazale drugih sprememb, prav tako v času poskusa inokulirani listi niso odpadli (Slika 10). Prva bolezenska znamenja smo na zgornjih neinokuliranih listih zaznali že 10 dpi. Večina rastlin je znamenja razvila do 18 dpi. Podobno kot na inokuliranih listih, so se na teh listih prav tako in nič manj intenzivno pojavljale točkaste nekroze, žilne nekroze in rumenenje listov (Slika 11).



Slika 9: Bolezenska znamenja rastlin NahG-Désirée po okužbi z virusom PVY N605. Komaj opazne točkaste nekroze na spodnjih, s PVY N605 inokuliranih listih krompirja 8 dpi (a), močno razvite nekroze 10 dpi (b), žilne nekroze na spodnjih inokuliranih listih 8 dpi (c) in obročasta nekroza na s PVY N605-GFP inokuliranem spodnjem listu 10 dpi (d).



Slika 10: Slepo inokulirana rastlina krompirja NahG-Désirée (a) brez bolezenskih znamenj in s PVY N605 okužena rastlina s točkastimi, žilnimi nekrozami in rumenenjem 8 dpi (b).



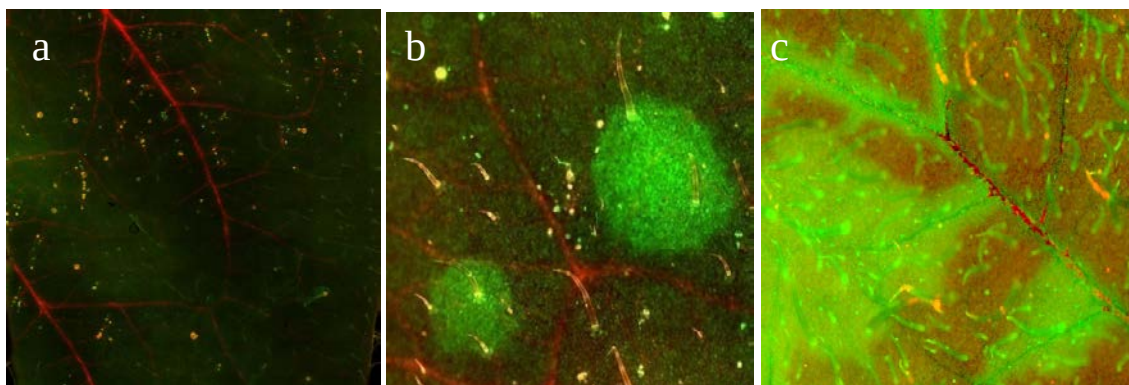
Slika 11: Bolezenska znamenja rastlin NahG-Désirée po okužbi z virusom PVY N605. Zgornji neinokulirani listi 18 dpi (a), vsi spodnji inokulirani listi so že odpadli. Prvi zgornji neinokulirani list z izrazitimi nekrozami in rumenenjem 18 dpi (b).

Ob primerjavi vpliva vrste uporabljene genotipske različice virusa na pojavnost lokalnih bolezenskih znamenj, smo opazovali razlike v deležih inokuliranih listov, ki so razvili bolezenska znamenja. Deset dpi je 42 % inokuliranih listov rastlin, ki smo jih inokulirali s PVY N605, kazalo lokalna bolezenska znamenja, bodisi v obliki točkastih, žilnih nekroz ali obročkastih nekroz, pri uporabi označenega virusa PVY N605-GFP je bil delež 62 %. V isti časovni točki je bila razlika tudi v deležu porumenelih inokuliranih listov. Pri listih inokuliranih s PVY N605 je bil ta delež 42 %, pri listih inokuliranih s PVY N605-GFP pa 56 %. Osemnajst dpi so vsi listi, inokulirani s PVY N605 odpadli, medtem ko je pri rastlinah, inokuliranih s PVY N605-GFP, odpadlo 95 % inokuliranih listov, vsi neodpadli pa so kazali nekroze in intenzivno rumenenje. Razlika je bila tudi v deležu rastlin, kjer smo zaznali sistemska bolezenska znamenja. Pri rastlinah, ki so bile okužene z PVY N605 smo 10 dpi na neinokuliranem listu ene rastline zaznali prisotnost točkastih nekroz, medtem ko pri rastlinah, okuženih z PVY N605-GFP, v tem času ni bilo zaznani nobenih sistemskih bolezenskih znamenj. Osem dni kasneje je 50 % zgornjih neinokuliranih listov rastlin, ki smo jih inokulirali s PVY N605 kazalo bolezenska znamenja v obliki nekroz in rumenenja. Pri rastlinah, inokuliranih s PVY N605-GFP, je bil delež takšnih listov 30 % (Preglednica 16).

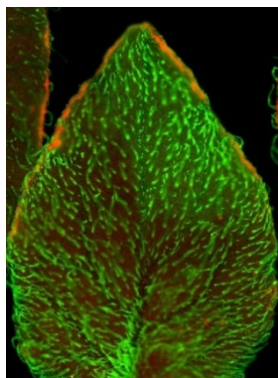
4.1.2 Zaznavanje virusa PVY N605-GFP s fluorescenčno mikroskopijo

Za opazovanje fluorescence smo uporabili avtomatizirani fluorescentni mikroskop. Slike smo zajemali z zelenim in rdečim kanalom. Z zelenim je bila zajeta fluorescenca proteina GFP, z rdečim kanalom pa signal klorofila in autofluorescenca lista. Točke, ki so svetile hkrati v zelenem in rdečem kanalu, so bile na sestavljeni sliki iz obeh kanalov rumeno obarvane in so najverjetneje posledica poškodb tkiva ali bolezenskih znamenj, ki jih povzroča virus.

Fluorescenco proteina GFP smo v inokuliranih listih sorte Désirée in rastlinah NahG-Désirée zaznali 6 dpi. Premikanje virusa PVY N605-GFP se je kazalo v obliki okroglih fluorescentno zelenih žarišč, ki so se pojavljala po celotni listni površini (Slika 12b). V zgornjih neinokuliranih listih NahG-Désirée smo fluorescenco proteina GFP zaznali 18 dpi, predvsem v listnih žilah in njihovi okolici (Slika 12c), medtem ko pri rastlinah Désirée fluorescence nismo zaznali. Prav tako po pričakovanjih fluorescence nismo zaznali pri slepo inokuliranih rastlinah (Slika 12a). Opazili smo, da enako kot protein GFP, fluorescirajo tudi rastlinski laski in določeni predeli v rastlini, sploh pri mlajših listih, kar otežuje zaznavanje signala proteina GFP (Slika 13).



Slika 12: Zaznavanje fluorescence proteina GFP. Slepo inokuliran list brez fluorescence (a), s PVY N605-GFP inokuliran list rastline NahG-Désirée 6 dpi z okroglimi fluorescentnimi žarišči (b) in prvi zgornji neinokuliran list rastline NahG-Désirée, inokulirane s PVY N605-GFP, 18 dpi s fluorescenco ob listnih žilah in njihovi okolici (c).



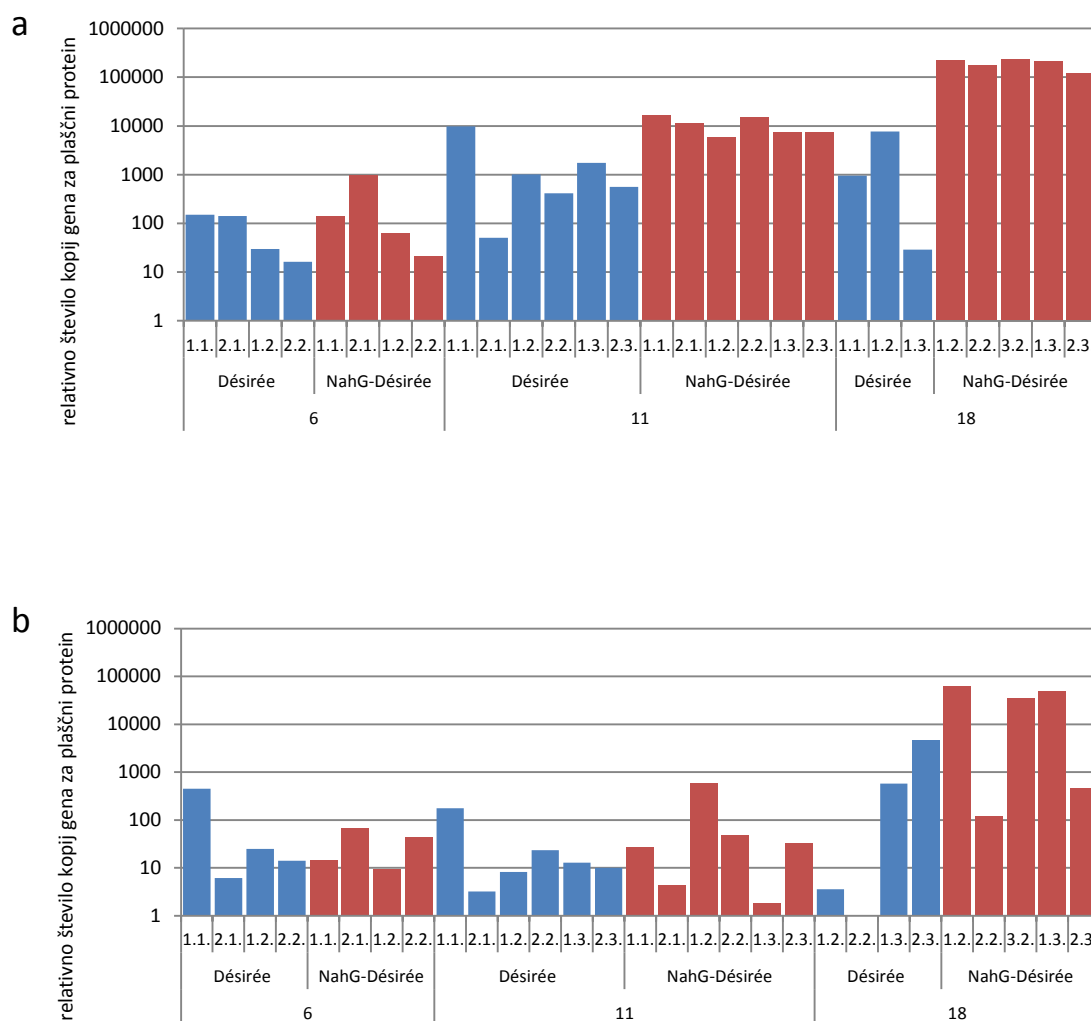
Slika 13: Fluorescenca zgornjega neinokuliranega lista rastline NahG-Désirée. Majhni, komaj razviti listi z gostimi rastlinskimi laski, ki intenzivno fluorescirajo, otežujejo zaznavanje signala proteina GFP.

4.1.3 Določanje količine virusne RNA

Pomnoževanje virusa PVY N605 smo spremljali z RT-qPCR v enem koraku. Zanimalo nas je, če oz. kdaj bomo virus zaznali v zgornjih neinokuliranih listih (zaznavanje gena za plaščni protein) in kako se bo koncentracija razlikovala v odvisnosti od uporabljene

genotipske različice krompirja in/ ali bo kakšna razlika v primerjavi s PVY N605-GFP. Analizirali smo zgornje neinokulirane liste iz treh časovnih točk 6, 11 in 18 dpi (Slika 14).

Rezultati RT-qPCR v enem koraku so pokazali, da se je virus PVY N605 uspešno pomnožil in prešel v zgornje neinokulirane liste. Virus smo v prvem in drugem neinokuliranem listu zaznali že 6 dpi tako pri rastlinah sorte Désirée kot tudi pri NahG-Désirée (Slika 14a). Do enakih ugotovitev smo prišli tudi v primeru rastlin, ki smo jih inokulirali s PVY N605-GFP. Označen virus se je namreč prav tako do 6 dpi sistemsko razširil v prva dva neinokulirana lista rastlin Désirée in NahG-Désirée (Slika 14b).



Slika 14: Grafični prikaz relativnega števila kopij gena za plaščni protein PVY v odvisnosti od analizirane genotipske različice krompirja in časa po inokulaciji pri rastlinah: a) okuženih z virusom PVY N605 in b) okuženih z virusom PVY N605-GFP. Vrednosti so relativne, normalizirane na izražanje gena COX in preračunane na najmanjšo zaznano koncentracijo gena za plaščni protein v vseh vzorcih. Številčne oznake pod stolpci označujejo številko rastline in številko neinokuliranega zgornjega lista (1.1 – prva rastlina, 1. neinokuliran list).

Rezultati so prav tako pokazali na veliko varabilnost med analiziranimi listi. Z uporabo statistične analize na podlagi Studentovega t-testa smo želeli ugotoviti, ali so prisotne statistično značilne razlike v relativnem številu kopij gena za plaščni protein PVY oz. v relativni količini virusa v odvisnosti od genotipske različice krompirja in virusa ($p < 0,05$).

Analiza je pokazala, da med zgornjimi neinokuliranimi listi rastlin Désirée in NahG-Désirée, ki so bili pobrani 6 dpi, ni bilo statistično značilnih razlik v relativni količini virusne RNA. Prav tako ni bilo statistično značilne razlike med genotipsko različnimi rastlinami krompirja, ki so bile inokulirane s PVY N605-GFP. Virus se je, ne glede na to ali je bil označen ali ne, pri obeh genotipskih različicah krompirja do 6 dpi razširil in pomnožil do primerljivih koncentracij (Preglednica 17).

Statistično značilne razlike v vsebnosti virusa PVY N605 med Désirée in NahG-Désirée smo zaznali pri zgornjih neinokuliranih listih pobranih 18 dpi. Listi NahG-Désirée so vsebovali statistično značilno večje koncentracije virusa, za razliko od listov rastlin Désirée, kar pomeni, da se je virus do 18 dpi hitreje pomnožil pri rastlinah NahG-Désirée. Enako razliko smo opazili tudi pri listih, pobranih 11 dpi ($p < 0,1$) (Preglednica 17).

V primerjavi zgornjih neinokuliranih listov rastlin Désirée in NahG-Désirée, inokuliranih z virusom PVY N605-GFP, nismo v nobeni časovni točki opazili statistično značilnih razlik. Kljub temu smo zaznali trend ($p < 0,1$) pri listih pobranih 18 dpi, ki je nakazoval, da so koncentracije virusa v listih NahG-Désirée večje kot v listih sorte Désirée in da se tudi ta genotipska različica virusa hitreje pomnožuje v rastlinah NahG-Désirée (Preglednica 17). Primerjava koncentracij neoznačenega in označenega virusa PVY N605 v zgornjih neinokuliranih listih rastlin NahG-Désirée je razkrila, da listi NahG-Désirée, pobrani 11 in 18 dpi vsebujejo statistično značilno večje koncentracije neoznačenega virusa ($p < 0,05$) kot listi rastlin, inokulirani z označenim PVY N605, kar pomeni, da obstaja razlika v hitrosti pomnoževanja med virusoma. Nasprotno smo pri primerjanju koncentracij obeh genotipskih različic virusa, v zgornjih neinokuliranih listih sorte Désirée ugotovili, da v nobeni analizirani časovni točki ni statistično značilnih razlik, kar pomeni, da sta tako neoznačen kot tudi označen PVY N605 dosegala primerljive koncentracije in da med njima ni bilo razlik v hitrosti pomnoževanja (Preglednica 17).

Preglednica 17: Statistična analiza razlik v relativni koncentraciji virusa v treh časovnih točkah v odvisnosti od genotipske različice virusa ali krompirja

	6 dpi	11 dpi	18 dpi
NahG-Désirée PVY N605 vs. Désirée PVY N605	NS	•	*
NahG-Désirée PVY N605-GFP vs. Désirée PVY N605-GFP	NS	NS	•
Désirée PVY N60-GFP vs. Désirée PVY N605	NS	NS	NS
NahG-Désirée PVY N605-GFP vs. NahG-Désirée PVY N605	NS	*	*

NS-statistično neznačilno, •- $p < 0,1$, *- $p < 0,05$.

4.2 VPELJAVA METODE KVANTITATIVNE ANALIZE miRNA

4.2.1 Primerjava načinov izolacije RNA

Za analizo miRNA je pomembna pravilna izbira načina izolacije celokupne RNA, saj so lahko nekatere metode pristranske. Odločili smo se, da bomo primerjali štiri najbolj splošno uporabne načine izolacije in izbrali tisto, pri kateri bosta kvaliteta in izplen miRNA najboljša.

Za primerjavo smo uporabili rastlinski material krompirja sort Désirée in PW363. Izhodiščni rastlinski material vsake sorte smo razdelili na štiri dele in vsakega uporabili za ločene postopke izolacije. Uspešnost posameznega postopka izolacije smo preverili spektrofotometrično z aparaturo »NanoDrop«, z agarozno gelsko elektroforezo in z metodo RT-qPCR v dveh korakih. Parametre uspešnosti izolacije smo spremljali tudi pri vzorcih Désirée in NahG-Désirée, ki smo jih kasneje uporabili za ugotavljanje količine miRNA.

Vsem izoliranim vzorcem celokupne RNA, smo s pomočjo spektrofotometra »NanoDrop« izmerili koncentracije RNA ter na podlagi razmerja absorbanc 260/280 in 260/230 preverili čistost RNA.

Med najbolj učinkovitimi glede izplena celokupne RNA sta bila postopka izolacije z uporabo reagenta TRIzol in kompleta »RNeasy Plant Mini Kit«. S postopkom izolacije z reagentom TRIzol smo pri večini vzorcev uspeli izolirati celo nad 1000 ng/μl RNA. Pri enem vzorcu (PW363) smo izolirali celo skoraj 4000 ng/μl, medtem ko so bile koncentracije RNA pri uporabi kompleta »RNeasy Plant Mini Kit« nekoliko manjše, med 400 in 900 ng/μl. Modificiran protokol »RNeasy«, ki je vključeval spiranje z večjo količino etanola, ni bil učinkovit, saj smo glede na običajni protokol s kompletom »RNeasy« pri obeh vzorcih izolirali približno polovico manj RNA. Kljub temu, smo izolirali več kot s kompletom »»MagMaxTM-96 Total RNA Isolation Kit« (Preglednica 18).

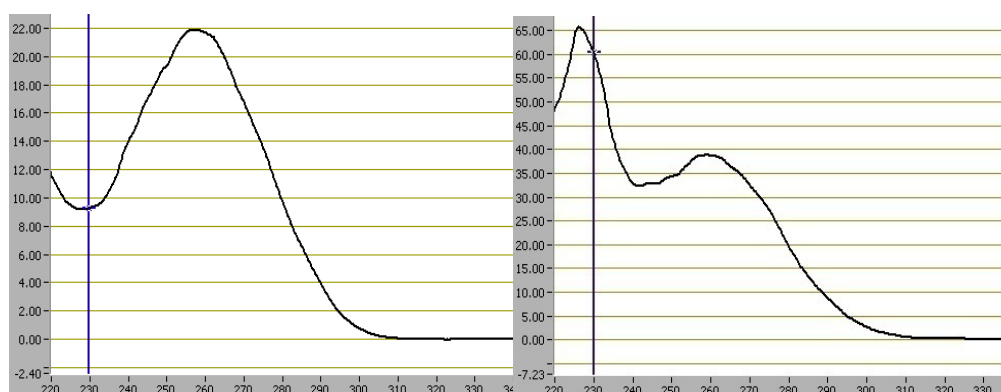
Čistost pridobljenih vzorcev RNA je bila najboljša pri izolaciji s kompletom »RNeasy Plant Mini Kit«. Razmerji 260/280 ter 260/230 sta bili večji od 2, kar opredeljuje zelo čisto RNA (Slika 15). Razmerje 260/280 je bilo pri vseh vzorcih RNA visoko, kar pomeni, da vsi štirje načini izolacije učinkovito odstranjujejo proteine, medtem ko je bila razlika predvsem v razmerju 260/230, kar je najverjetneje povezano z ostanki reagentov (fenol in gvadinijev tiocianat), ki smo jih uporabili pri izolaciji in celičnih polisaharidov, ki absorbirajo pri 230 nm.

RNA vzorcev Désirée in PW363, ki je bila izolirana z reagentom TRIzol, je imela razmerje 260/230 blizu 2, kar pomeni, da je bila primerno čista. Se je pa pomanjkljivost metode bolj izrazila pri vzorcih Désirée in NahG-Désirée, kjer smo v 75-% vzorcev RNA dobili

razmerje 260/230 pod 2 ter v štirih primerih celo pod 1. Kaže, da je TRIzol, kljub številnim korakom čiščenja med izolacijo precej težko učinkovito odstraniti (Slika 15). Podobno slabo razmerje 260/230 je imela RNA izolirana s kompletom »MagMaxTM-96 Total RNA Isolation Kit«, z uporabo modificiranega protokola »RNeasy« je bil rezultat nekoliko boljši, vendar slabši kot pri nemodificiranem protokolu »RNeasy«, kar pomeni, da spiranje z večjo količino etanola vpliva na pridobivanje nečistoč (Preglednica 18).

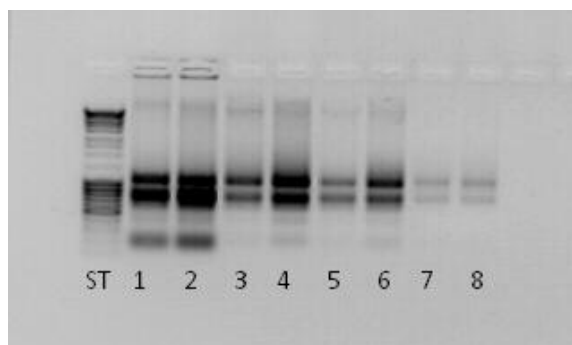
Preglednica 18: Koncentracija in čistost RNA v vzorcih po izolaciji z reagentom TRIzol in s kompletoma »RNeasy Plant Mini Kit« in »MagMaxTM-96 Total RNA Isolation Kit«

Vzorec	Vrsta izolacije	Koncentracija (ng/μl)	260/280	260/230
Désirée	TRIzol	645,88	2,04	1,86
PW363	TRIzol	3927,33	1,86	1,82
Désirée	RNeasy	432,73	2,13	2,00
PW363	RNeasy	876,51	2,17	2,33
Désirée	»RNeasy_modif«	191,14	2,16	1,53
PW363	»RNeasy_modif«	341,58	2,14	1,60
Désirée	»MagMAX TM «	60,56	2,05	1,32
PW363	»MagMAX TM «	67,93	2,17	0,7
Désirée 1_PVY	TRIzol	1568	1,92	1,34
Désirée 2_PVY	TRIzol	1874,7	1,88	0,77
Désirée 3_PVY	TRIzol	1325,6	2,01	1,57
Désirée 1_mock	TRIzol	1472,7	1,95	1,06
Désirée 2_mock	TRIzol	1035,3	2,02	0,94
Désirée 3_mock	TRIzol	971,9	1,99	0,73
NahG-Désirée 1_PVY	TRIzol	333,94	1,84	2,2
NahG-Désirée 2_PVY	TRIzol	81,21	1,73	2,19
NahG-Désirée 3_PVY	TRIzol	278,6	1,91	1,15
NahG-Désirée 1_mock	TRIzol	369,58	1,84	2,28
NahG-Désirée 2_mock	TRIzol	225,28	1,94	0,46
NahG-Désirée 3_mock	TRIzol	756,37	1,95	1,66



Slika 15: Preverjanje čistosti RNA z aparaturom »NanoDrop«. Absorpcijski spekter vzorca, izoliranega s kompletom »RNeasy Plant Mini Kit« (levo), ki prikazuje čisto RNA in absorpcijski spekter vzorca, izoliranega z reagentom TRIzol, ki prikazuje povečano absorpcijo pri 230 nm, kar kaže na precejšnjo vsebnost nečistoč (desno). Na x-osi je prikazana valovna dolžina (nm), na y-osi pa absorbanca (A).

Uspešnost postopkov izolacije RNA smo preverili še z agarozno gelsko elektroforezo. V gel smo prenesli enake volumne vzorcev izolirane RNA, kar nam je omogočilo primerjavo kvantitativne učinkovitosti izolacije RNA s posameznim postopkom.

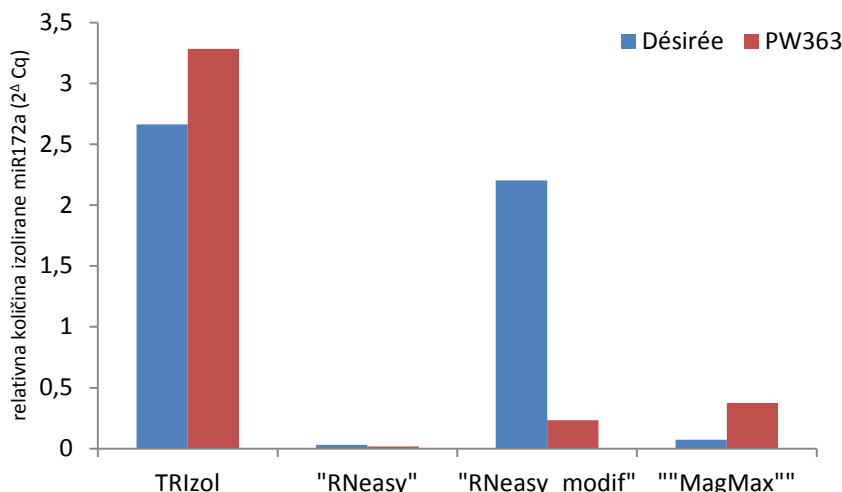


Slika 16: Preverjanje kvalitete izolirane RNA z agarozno gelsko elektroforezo. Levo je standardna kilobazna lestvica DNA (ST), ki ji proti desni sledijo vzorci celokupne izolirane RNA. 1-Désirée (TRIzol), 2-PW363 (TRIzol), 3-Désirée (»RNeasy«), 4-PW363 (»RNeasy«), 5-Désirée (»RNeasy _modif«), 6-PW363 (»RNeasy _modif«), 7 - Désirée (»MagMAX™«), 8 - PW363 (»MagMAX™«)

Pokazali smo, da v naših vzorcih ni prisotne genomske DNA (gDNA), prav tako ni vidne razgrajene RNA. Z agarozno gelsko elektroforezo smo potrdili spektrofotometrične meritve koncentracij RNA (Slika 16). Na podlagi intenzitete lis, ki označujeta molekule 28S rRNA (ribosomske ribonukleinske kisline) in 18S rRNA, je razvidno, da je največja koncentracija RNA v jamici št. 2, kamor smo vnesli vzorec PW363, izoliran z reagentom TRIzol, za katerega so tudi meritve s spektrofotometrom pokazale, da precej izstopa od ostalih. Sledil je vzorec PW363, izoliran z »RNeasy« v jamici št. 4, ki je tudi na podlagi spektrofotometričnih meritev kazal večjo koncentracijo v primerjavi z vzorcem Désirée, izoliranim z reagentom TRIzol. Intenziteta lis vzorcev, izoliranih z modificiranim protokolom »RNeasy« je bila po pričakovanjih približno za polovico manjša. Najslabšo intenziteto smo zaznali pri vzorcih Désirée in PW363, izoliranih s kompletom »MagMAX™« (jamica št. 7 in 8). Na sliki malih RNA sicer ne opazimo, ker jih je malo. Lahko pa opazimo še tretji pas, ki je najbolj intenziven pri vzorcih RNA, ki so bili izolirani z reagentom TRIzol in označuje molekule 5,8 S rRNA in tRNA, ki so dolge okrog 100 bp, kar kaže na to, da metoda omogoča tudi učinkovito izolacijo krajših molekul.

Ker nam spektrofotometrično merjenje koncentracije RNA in agarozna gelska elektroforeza podajata zgolj informacije glede koncentracije RNA ter kvalitete (integritete in čistosti), smo za ugotavljanje prisotnosti in količine miRNA v posameznem vzorcu uporabili metodo RT-qPCR v dveh korakih, pri čemer smo se odločili, da bomo analizirali eno od malih RNA, miR172a in kot predstavnika daljših mRNA, referenčno COX-mRNA. Za vsakega od osmih vzorcev smo dobljene vrednosti C_q pomnožka miR172a odšteli od

vrednosti Cq pomnožka COX-cDNA in razliko antilogaritmirali, da smo dobili relativno količino izolirane miR172a (Slika 17).



Slika 17: Količina miR172a v primerjavi s COX-mRNA v odvisnosti od uporabljene metode izolacije RNA pri dveh analiziranih vzorcih RNA sort krompirja Désirée in PW363. Na grafu je prikazana antilogaritmirana razlika vrednosti Cq (ΔCq) med obema pomnožkoma.

Iz slike 17 je razvidno, da smo največ miRNA pridobili z izolacijo z reagentom TRIzol, najmanj pa z uporabo kompleta »Rneasy«. Prav tako je tudi metoda s kompletom »MagMAX™« manj učinkovita za izolacijo miRNA. Z uporabo modificirane izolacije s kompletom »RNeasy« smo sicer dobili več miRNA, vendar le pri enem vzorcu (vzorec Désirée).

4.2.2 Testiranje učinkovitosti izolacije snoU6 RNA kot potencialne kandidatke za referenčno RNA

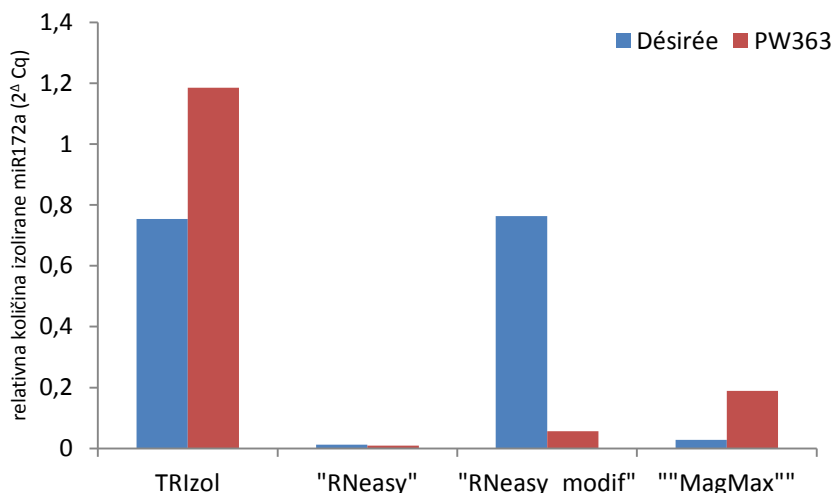
Kot del vpeljave metode za analizo miRNA smo želeli tudi oceniti primernost male RNA snoU6 za normalizacijo pri analizi miRNA. Za analizo smo uporabili 8 vzorcev (Preglednica 18), ki smo jih uporabili za primerjavo izolacije RNA. Naredili smo RT-qPCR v dveh korakih, pri čemer smo spremljali pomnoževanje pomnožkov snoU6 RNA, miR172a in COX-mRNA.

Od dobljenih vrednostih Cq pomnožka snoU6 RNA smo nato odšteli vrednosti Cq pomnožka miR172a in razliko antilogaritmirali, da smo dobili relativno količino miR172a (Slika 18). Rezultati na sliki 18 so podobni tistim pri preverjanju učinkovitosti izolacij glede izplena miRNA. Pri izolaciji s kompletom »RNeasy«, »RNeasy_modif« in »MagMAX™« smo dobili nizke vrednosti, kar pomeni, da smo z njimi izolirali več snoU6 RNA kot miR172a, medtem ko smo pri izolaciji z reagentom TRIzol dobili največjo

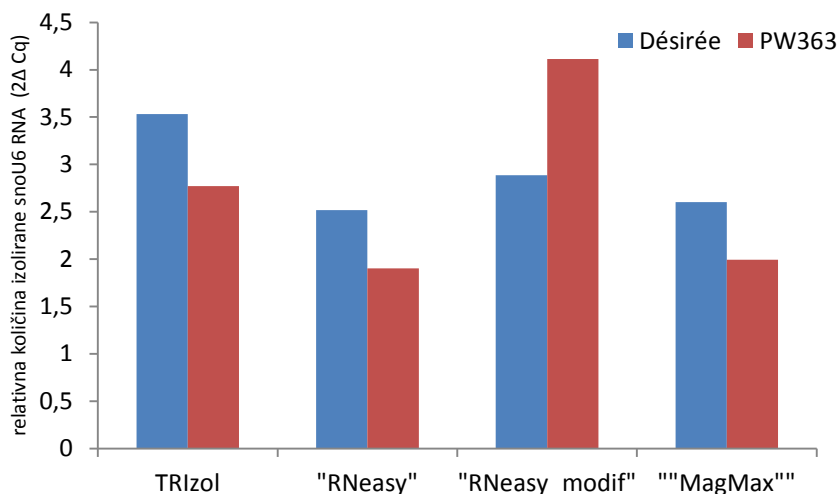
razliko, kar pomeni, da smo tu uspeli izolirati največ miR172a. Znova smo potrdili, da z uporabo kolon ne uspemo učinkovito izolirati malih RNA. Prav tako smo ponovno opazili, da spiranje z dodatno količino etanola, prispeva k povečani količini miR172a, a je le-ta še vedno precej manjša kot v primeru izolacije z reagentom TRIzol. Podobne rezultate smo dobili tudi pri uporabi kompleta »MagMAX™«.

Količino snoU6-cDNA smo nato primerjali še s količino pomnožka COX-cDNA (Slika 19). Rezultati kažejo, da je pri vseh štirih načinih izolacije v celokupni RNA prisotnih več molekul snoU6 RNA kot molekul COX-mRNA. Razlika med postopki izolacije ΔCq je bila pri vseh pod 1 cikel, kar pomeni, da pri vseh postopkih izolacije enakovredno izoliramo tako COX-mRNA kot tudi snoU6 RNA. Iz tega lahko zaključimo, da so razlike med postopki izolacije predvsem pri izolaciji miRNA.

Izolacija z reagentom TRIzol je omogočila enakovredno izolacijo tako kratkih kot tudi dolgih molekul RNA, zato smo za boljše vrednotenje rezultatov v nadaljnjem delu podatke malih RNA normalizirali tako na COX-mRNA kot tudi na snoU6 RNA.



Slika 18: Količina miR172a v primerjavi z snoU6 RNA v odvisnosti od uporabljene metode izolacije RNA pri dveh analiziranih vzorcih RNA sort krompirja Désirée in PW363. Na grafu je prikazana antilogaritmirana razlika vrednosti Cq (ΔCq) med obema pomnožkoma.



Slika 19: Količina snoU6 RNA v primerjavi s COX-mRNA v odvisnosti od uporabljene metode izolacije RNA pri dveh analiziranih vzorcih RNA sort krompirja Désirée in PW363. Na grafu je prikazana antilogaritmirana razlika vrednosti Cq (ΔCq) med obema pomnoškoma.

4.2.3 Vpliv količine RNA v vzorcu na obratno prepisovanje

Za ugotavljanje vpliva koncentracije RNA v vzorcu na učinkovitost obratnega prepisovanja smo pripravili reakcijske mešanice z neredčeno, 10-krat redčeno in 100-krat redčeno RNA. Dobljeno cDNA iz neredčene RNA smo pred qPCR redčili še 8- in 80-krat, dobljeno cDNA iz 10-krat in 100-krat redčene RNA pa 8-krat. Na podlagi dobljenih vrednosti Cq za neredčeno, 10-krat redčeno in 100-krat redčeno RNA posameznega vzorca smo izrisali standardne krivulje za vsako miRNA ter ugotavljali ali je učinkovitost obratnega prepisovanja skladna pri vseh treh redčitvah.

V primeru, da bi bila učinkovitost pri vseh treh redčitvah optimalna (100 %), smo pričakovali naklone umeritvenih krivulj -3,32. Ugotovili smo, da temu ni tako. Pri miR172a, miR390b in miR5300 miRNA so dobili večje naklone z učinkovitostjo pod 100 %, kar pomeni, da prihaja pri redčeni RNA do zaviranja obratnega prepisovanja, ter da se neredčena RNA bolj učinkovito prepisuje (Preglednica 19). Domneve smo potrdili z izračunom teoretičnega števila kopij, ki jih daje določena količina RNA. Iz preglednice 20 je razvidno, da je preračunano število kopij miR172a, miR390 in miR5300 pri večini vzorcev večje pri uporabi neredčene RNA. Kar pomeni, da je v teh primerih učinkovitost prepisovanja boljša kot uporaba 10-krat redčene ali 100-krat redčene RNA. Pri miR390 je bila uporaba 10- in 100-kratnih redčitev pretirana, saj so bile vrednosti Cq nad 30 in nekatere celo že izven območja kvantifikacije.

V primeru umeritvene krivulje miR482a je bila učinkovitost prepisovanja blizu 100 %, iz česar bi lahko sklepali, da je vseeno ali uporabimo neredčeno ali bolj redčeno RNA. Po

pregledu učinkovitosti pomnoževanje med neredčeno in 10-krat redčeno se je izkazalo, da je učinkovitost čez 130 % (podatki niso prikazani), kar kaže na zaviranje prepisovanja pri neredčeni RNA, zato smo pri tem testu posledično zaznali večje teoretično število kopij pri 10-krat redčeni in 100-krat redčeni RNA.

Preglednica 19: Reakcijski parametri obratnega prepisovanja

miRNA test	Enačba krivulje linearne regresije	Naklon krivulje	R ²	E (%)
miR172a	-4,01x + 39,35	-4,01	0,994	77,6
miR390b	-3,9182x + 41,216	-3,9	0,9979	80,0
miR482a	-3,2055x + 33,626	-3,2	0,993	105,1
miR5300	-4,165x + 38,027	-4,2	0,9819	73,8

Na podlagi izrisa relativne standardne krivulje v odvisnosti vrednosti C_q neredčene, 10-krat redčene in 100-krat redčene RNA od koncentracije tarčne cDNA smo določili enačbo krivulje linearne regresije, njen naklon, R² (koeficient determinacije) in učinkovitost testa (E) s pomočjo enačbe (1).

Preglednica 20: Prikaz relativnega števila kopij posamezne miRNA v odvisnosti od uporabljene koncentracije RNA za obratno prepisovanje

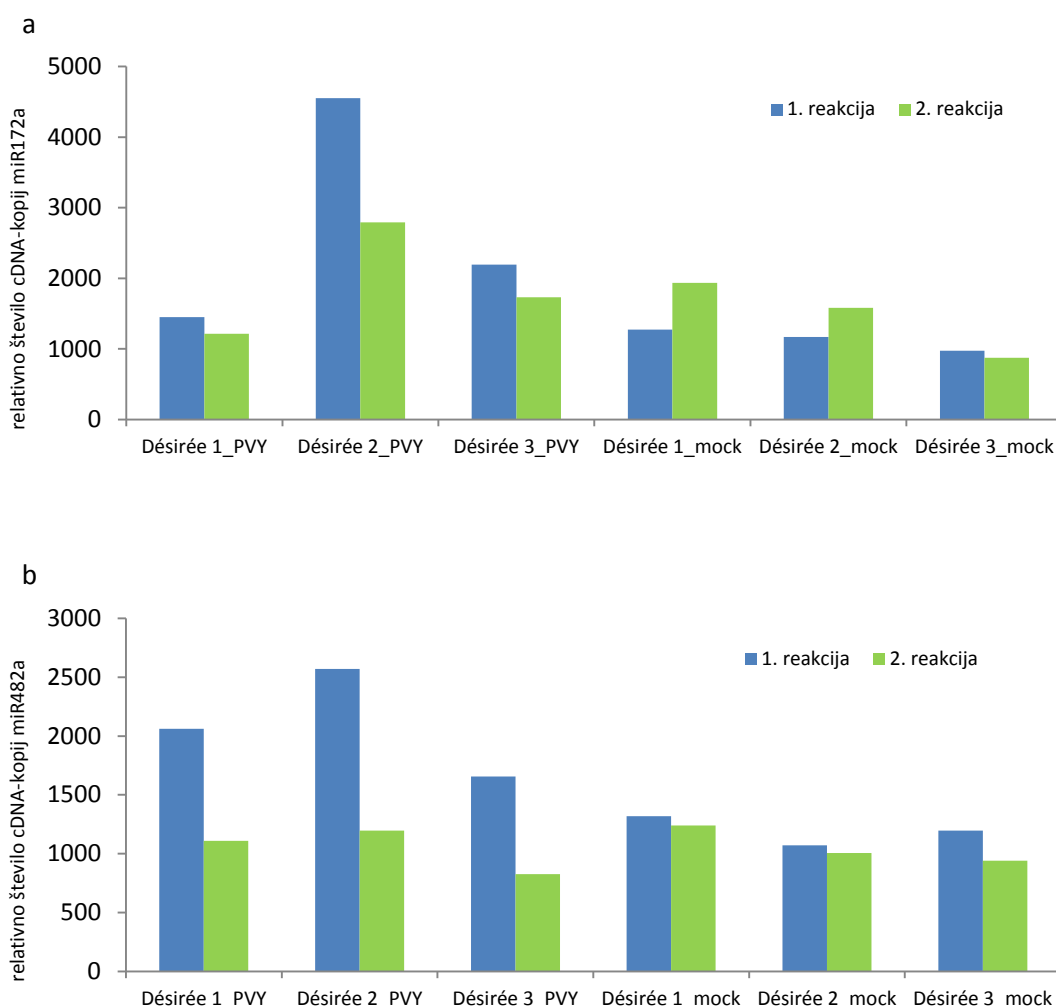
	Koncentracija RNA	miR172a	miR390b	miR482	miR5300
vzorec 1	1:1	6513	10368	4415	17735
	1:10	656	720	760	283
	1:100	62	79	67	38
vzorec 2	1:1	18315	4459	3710	6483
	1:10	1435	399	557	253
	1:100	35	50	56	40
vzorec 3	1:1	9808	13724	6500	12666
	1:10	458	1202	1020	350
	1:100	43	96	99	44
vzorec 4	1:1	8152	11265	8622	15472
	1:10	213	259	649	330
	1:100	24	43	82	26
vzorec 5	1:1	9045	13319	4231	8724
	1:10	849	904	632	284
	1:100	28	91	45	29
vzorec 6	1:1	3913	11977	8728	14700
	1:10	549	511	638	294
	1:100	37	103	80	55

Za obratno prepisovanje smo uporabili neredčeno RNA s koncentracijo 10 ng/μl (1:1), 10-krat redčeno RNA s koncentracijo 1 ng/μl (1:10) in 100-krat redčeno RNA s koncentracijo 0,1 ng/μl (1:100).

4.2.4 Ponovljivost obratnega prepisovanja v analizi miRNA

Za ugotavljanje ponovljivosti oz. variabilnosti reakcije obratnega prepisovanja smo izvedli dve ponovitvi reakcije šestih vzorcev celokupne RNA sorte Désirée, izoliranih z reagentom TRIzol (Preglednica 17). RNA pred obratnim prepisovanjem nismo dodatno redčili. Ponovljivost obratnega prepisovanja miRNA smo preverili z ugotavljanjem relativnega števila cDNA-kopij miR172a, miR482a, COX-mRNA in snoU6 RNA.

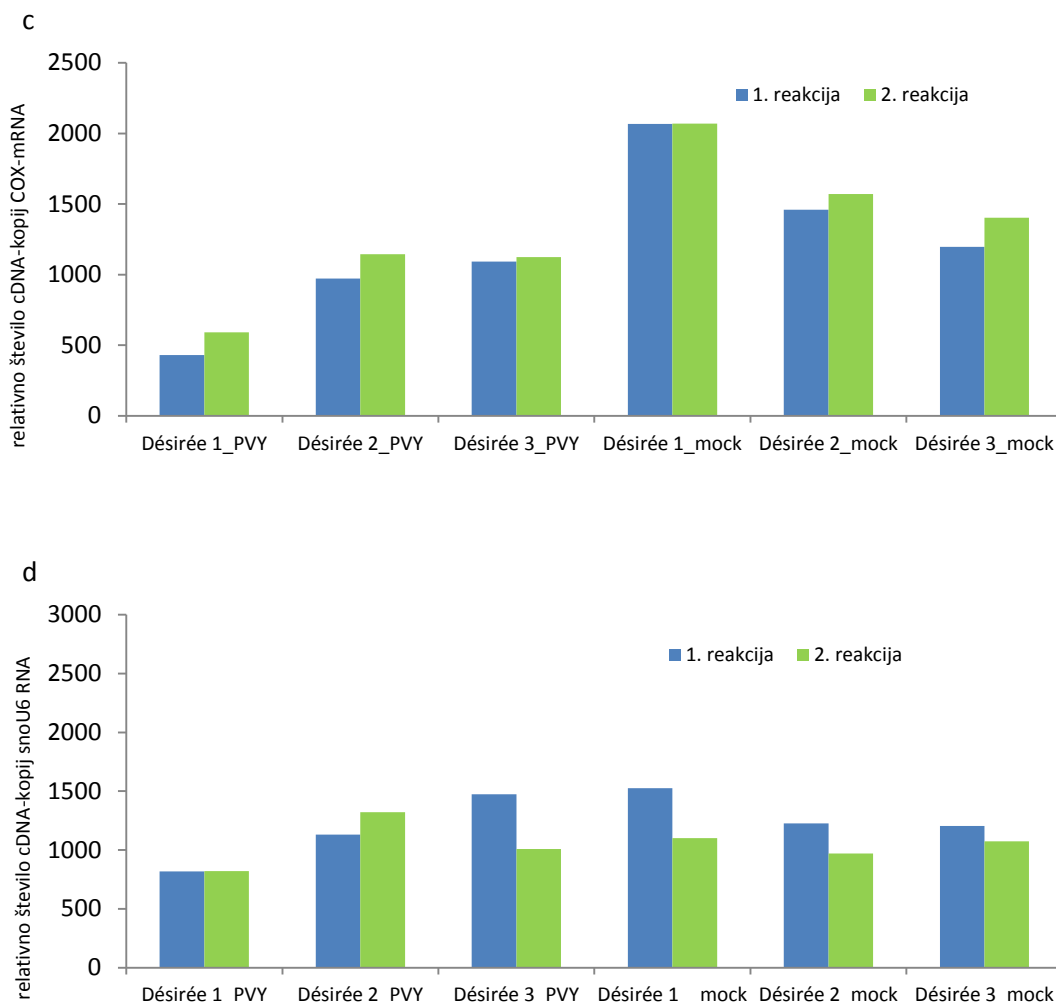
Rezultati kažejo, da reakciji obratnega prepisovanja miR172a (Slika 20a) in miR482a (Slika 20b) nista najbolj ponovljivi. Razlika v številu kopij med prvo in drugo reakcijo je lahko tudi več kot dvakratna.



Slika 20: Grafični prikaz razlik v ponavljanju obratnega prepisovanja različnih miRNA. Prikazane so relativne količine cDNA-kopij. Prikazane so relativne količine cDNA-kopij: a) miR172a, b) miR482a c) COX-mRNA in d) snoU6 RNA med prvo in drugo reakcijo obratnega prepisovanja vzorcev Désirée (Preglednica 17).

»se nadaljuje«

»nadaljevanje Slike 20



Slika 20: Grafični prikaz razlik v ponavljanju obratnega prepisovanja različnih miRNA. Prikazane so relativne količine cDNA-kopij: a) miR172a, b) miR482a c) COX-mRNA in d) snoU6 RNA med prvo in drugo reakcijo obratnega prepisovanja vzorcev Désirée (Preglednica 17).

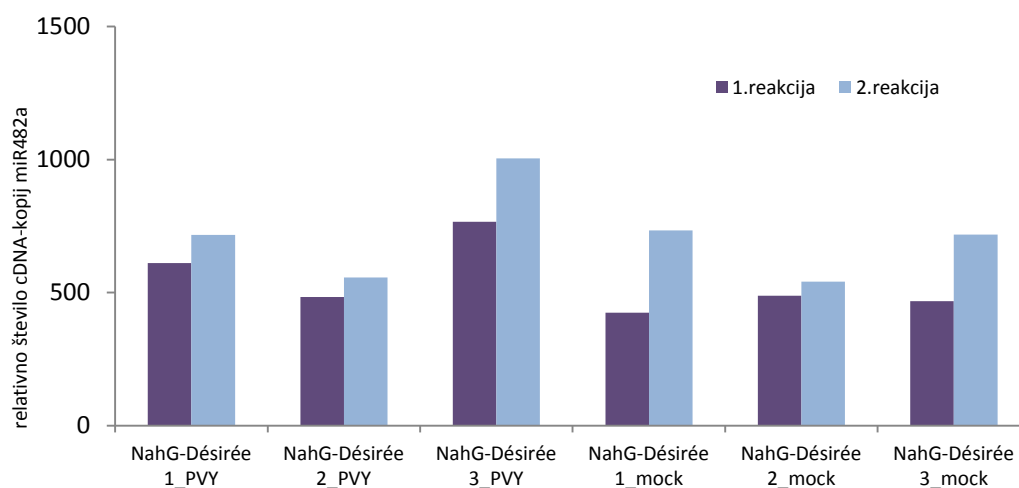
V nasprotju z obratnim prepisovanjem miRNA je bila ponovljivost obratnega prepisovanja COX-mRNA (Slika 20c) od vseh najboljša. Pri vseh analiziranih vzorcih smo namreč dobili podobno relativno količinocDNA-kopij COX-mRNA med prvo in drugo izvedbo reakcije.

Malo manj ponovljiva reakcija obratnega prepisovanja kot pri COX-mRNA, a vseeno bolj kot v primeru miRNA, je obratno prepisovanje snoU6 RNA (Slika 20d), pri čemer sta rahlo izstopala dva vzorca Désirée 3_PVY in Désirée1_mock.

4.2.5 Ponovljivost qPCR v analizi miRNA

Za ugotavljanje ponovljivosti qPCR smo izvedli dve ponovitvi z uporabo šestih vzorcev obratno prepisane miRNA iz rastlin NahG-Désirée, izoliranih z reagentom TRIzol. Ponovljivost qPCR smo preverili z ugotavljanjem relativnega števila cDNA-kopij miR482a med prvo in drugo reakcijo.

Dobljeni rezultati (Slika 21) kažejo na dobro ujemanje med obema ponovitvama reakcije qPCR. Nekoliko izstopa vzorec NahG-Désirée 1_mock, vendar je razlika v relativnem številu kopij manj kot 2-kratna, tako da to ne vpliva na končen rezultat v izražanju, kjer zaznavamo razlike, ki so vsaj 2-krat večje.



Slika 21: Grafični prikaz razlik v relativni količini cDNA-kopij miR482a med prvo in drugo qPCR vzorcev NahG-Désirée (Preglednica 17).

4.2.6 Določanje dinamičnega območja qPCR v analizi miRNA

Pripravili smo 10-kratne razredčitve osnovnega neredčenega vzorca RNA in rezultate qPCR ovrednotili z izrisom standardne krivulje v odvisnosti vrednosti Cq od koncentracije tarčne cDNA. S pomočjo standardne krivulje smo poleg dinamičnega območja, ki nam pove, kako široko je območje kvantifikacije, določili tudi natančnost testa (R^2), njegovo učinkovitost (E) ter vrednost Cq pri meji kvantifikacije, ki predstavlja najvišjo vrednost, kjer smo zaznali vpliv stohastičnosti (CV (koeficient variacije) $>0,3$) (Preglednica 21).

Ugotovili smo, da sta učinkovitost in natančnost pri vseh testih dobri. Prav tako imajo vsi testi veliko dinamično območje. Potrdili smo, da je kvantifikacija pri vseh v območju 10^4 . Pri testih miR168a, miR482a, miR5300 in St-snoU6 je celo večje od 10^4 .

Preglednica 21: Reakcijski parametri qPCR v analizi miRNA

Test	Območje kvantifikacije	Cq pri meji kvantifikacije	Naklon krivulje	R ²	E (%)
miR168a	Nad 10 ⁴	32,03 *	-3,45	0,998	94,8
miR172a	10 ⁴	33,91	-3,55	0,998	91,4
miR390b	10 ⁴	32,79	-3,31	0,997	100,5
miR482a	Nad 10 ⁴	31,68 *	-3,45	0,999	94,9
miR5300	Nad 10 ⁴	31,67 *	-3,37	0,999	98,0
St-snoU6	Nad 10 ⁴	32,78 *	-3,49	0,999	93,4
COX	10 ⁴	33,35	-3,46	0,999	94,8

Na osnovi izrisa relativne standardne krivulje v odvisnosti vrednosti Cq od koncentracije tarčne cDNA smo določili enačbo krivulje linearne regresije, njen naklon, R² in učinkovitost testa (E) s pomočjo enačbe (1).*-najvišja dobljena vrednost Cq, ki še ni bila na meji kvantifikacije.

4.3 SPREMEMBE V KOLIČINI MOLEKUL miRNA PO OKUŽBI S PVY

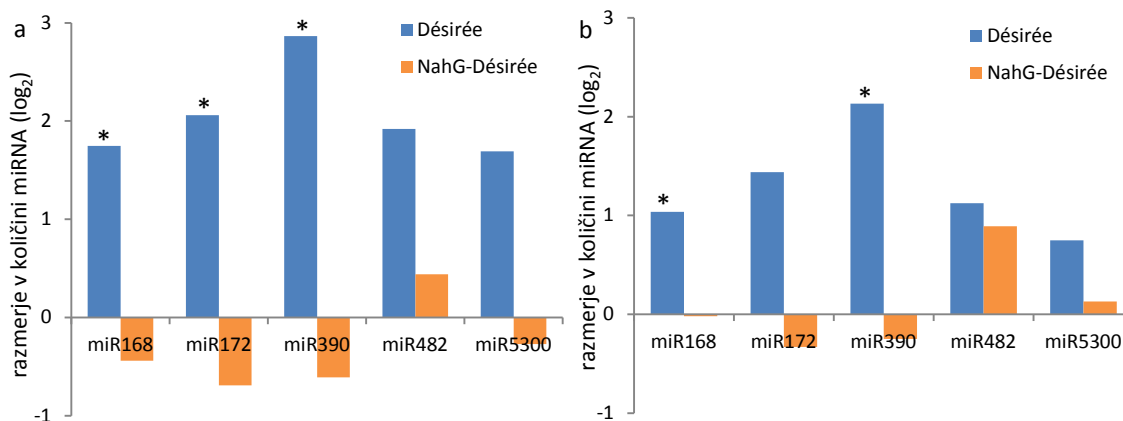
Količino posamezne miRNA smo analizirali z RT-qPCR v dveh korakih. Za analizo smo uporabili celokupno RNA vzorcev Désirée in NahG-Désirée izoliranih z reagentom TRIzol in celokupno RNA vzorcev NahG-Désirée, izoliranih s kompletom »RNeasy Plant Mini Kit«, za primerjavo vpliva izolacije na končno razmerje v količini miRNA (Preglednica 18). Količino vsake miRNA smo izrazili kot log₂ razmerja med v z virusom okuženih in slepo inokuliranih rastlinah. Če je bilo log₂ razmerja <± 0,7 je pomenilo, da med okuženimi in slepo inokuliranimi rastlinami ni razlike. Za ugotavljanje statistično značilne razlike smo uporabili še Studentov t-test, pri čemer smo uporabili mejo statistične značilnosti p=0,05.

4.3.1 miR168a

Pri vzorcih okuženih rastlin Désirée smo zaznali približno 4-krat večjo količino miR168a (log₂ razmerja=1,75) v primerjavi z vzorci slepo inokuliranih rastlin pri normalizaciji na COX-mRNA (Slika 22a). Prav tako smo povečano količino zaznali v primeru normalizacije podatkov na snoU6 RNA, pri čemer je bila razlika približno 2-krat manjša (log₂ razmerja=1,04) (Slika 22b). S statistično analizo smo potrdili, da je ta povečana količina miR168a v obeh primerih tudi statistično značilno različna (p< 0,05).

Pri analizi vzorcev NahG-Désirée nismo opazili spremembe v količini miR168a. Razmerje med okuženimi in slepo inokuliranimi vzorci je bilo okrog 1, neodvisno od uporabljenega načina normalizacije. Rezultati so bili podobni tako pri izolaciji z reagentom TRIzol kot tudi pri izolaciji s kompletom »RNeasy Plant Mini Kit« (Slika 23). Čeprav smo pri enem od treh vzorcev okužene rastline NahG-Désirée, izoliranih z reagentom TRIzol zaznali

zmanjšano količino, je bila količina miR168a pri vseh ostalih primerljiva, zato med njimi nismo zaznali statistično značilne razlike.



Slika 22: Količina petih miRNA: a) normalizirano na COX-mRNA, b) normalizirano na snoU6 RNA pri rastlinah krompirja Désirée in NahG-Désirée po okužbi s PVY^{NTN}. Prikazan je log₂ razmerja količine med slepo inokuliranimi in s PVY^{NTN} okuženimi rastlinami (n=3) in statistična značilnost (*- p<0,05).

4.3.2 miR172a

Pri analizi miR172a smo pri vzorcih okuženih rastlin Désirée zaznali skoraj 5-krat večjo količino miR172a (log₂ razmerja=2,06) kot pri slepo inokuliranih rastlinah v primeru normalizacije na COX-mRNA (Slika 22a). S statistično analizo smo potrdili, da je ta razlika v količini miR172a tudi statistično značilna (p<0,05). Prav tako smo povečano količino zaznali v primeru normalizacije na snoU6 RNA, pri čemer je bila razlika približno 3-kratna (log₂ razmerja=1,44), vendar je statistična analiza pokazala, da v tem primeru razlika ni statistično značilna (Slika 22b).

Pri vzorcih NahG-Désirée nismo opazili značilne razlike v količini miR172a med okuženimi in slepo inokuliranimi rastlinami. Prav tako na razliko ni vplival niti način izolacije RNA niti način normalizacije (Slika 23).

Pri vseh vzorcih Désirée in NahG-Désirée, izoliranih z reagentom TRIzol smo opazili, da je bila pri 8-kratnih redčitvah cDNA učinkovitost pomnoževanja slaba (E) (120-180 %) (podatki niso prikazani). Sklepali smo, da je vzrok v preveliki vsebnosti nečistoč, najverjetneje ostankov reagenta TRIzol, saj slabe učinkovitosti pri vzorcih NahG-Désirée, katerih RNA je bila izolirana s kompletom »RNeasy Plant Mini Kit« nismo zaznali.

4.3.3 miR390b

Pri določanju količine miR390b smo pri vzorcih okuženih rastlin Désirée zaznali več kot 7-krat ($\log_2$ razmerja=2,86; normalizacija na COX-mRNA) (Slika 22a) oziroma 4-krat ($\log_2$ razmerja=2,13; normalizacija na snoU6 RNA) (Slika 22b) večjo količino miR390b v primerjavi z vzorci slepo inokuliranih rastlin. Razlika je bila v obeh primerih statistično značilna. Kljub temu, da je bila učinkovitost pomnoževanja pri dveh vzorcih slepo inokuliranih rastlin 148 in 150-% (podatki niso prikazani), ti rezultati niso bistveno vplivali na končno razmerje.

Težave pri pomnoževanju so bile še bolj opazne pri vzorcih NahG-Désirée, katerih RNA je bila prav tako izolirana z reagentom TRIzol. Na podlagi upoštevanja bolj redčene cDNA (80-kratna redčitev) smo želeli pridobiti bolj relevantne rezultate, ker smo predvidevali, da je pomnoževanje zavirajo nečistoče. Kljub temu razlik v količini miR390b pri NahG-Désirée nismo zaznali niti pri normalizaciji podatkov na COX-mRNA, niti na snoU6 RNA. Rezultati, pridobljeni z analizo enakih vzorcev NahG-Désirée, izoliranih s kompletom »RNeasy Plant Mini Kit«, kljub dobri učinkovitosti pomnoževanja prav tako niso kazali niti na povečanje niti zmanjšanje količine miR390b (Slika 23).

4.3.4 miR482a

Pri analizi miR482a pri vzorcih Désirée in NahG-Désirée nismo opazili statistično značilne razlike v količini med okuženimi in slepo inokuliranimi vzorci. Čeprav je bilo pri vzorcih okuženih rastlin Désirée opaženo skoraj 4-kratno povečanje količine ($\log_2$ razmerja=1,92; normalizacija na COX-mRNA), je bila količina miR482 pri enem od teh vzorcev bolj podobna slepo inokuliranim, zato nismo dobili statistično značilne razlike.

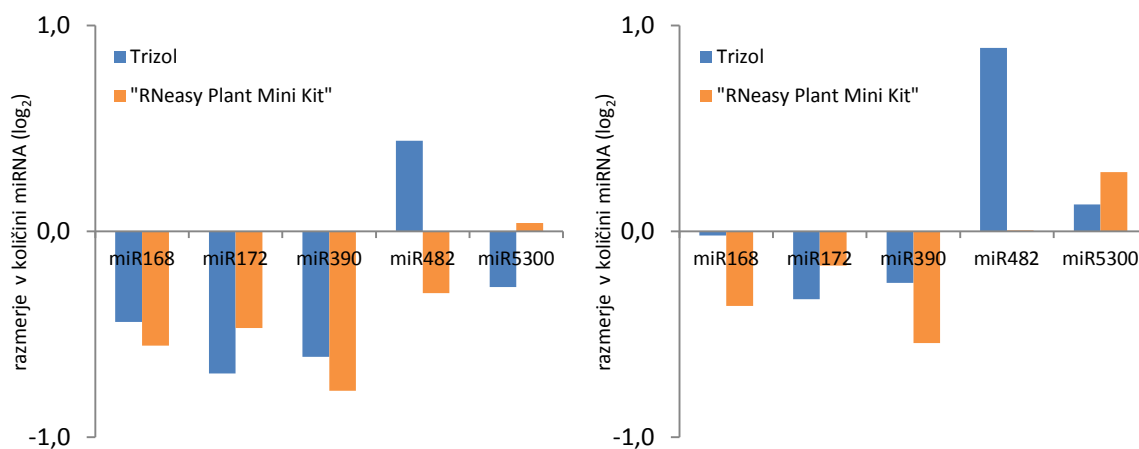
Čeprav smo pokazali, da je obratno prepisovanje miR482a v primerjavi s prepisovanjem ostalih miRNA bolj občutljivo za povečane koncentracije RNA, smo za prepisovanje poleg redčene RNA uporabili tudi neredčeno RNA (10 ng/ μ l). Medtem ko težav z učinkovitostjo pomnoževanja pri vzorcih Désirée nismo zaznali, smo pri vzorcih NahG-Désirée, katerih RNA je bila izolirana z reagentom TRIzol pri 8-kratnih redčitvah cDNA (neredčena RNA) zaznali precej slabo učinkovitost pomnoževanja, ki je bila med 127-240 % (podatki niso prikazani). Četudi smo za PCR uporabili 80- in 800-kratne redčitve, se problemu nismo izognili. Če smo uporabili cDNA, ki se je prepisala iz bolj redčene RNA (0,1 oz. 1 ng/ μ l) in le- to pred qPCR 8-krat redčili, smo dosegli dobro učinkovitost pomnoževanja, kar pa na končen rezultat ni vplivalo.

Pri vzorcih NahG-Désirée, katerih RNA je bila izolirana s kompletom »RNeasy Plant Mini Kit« je bila učinkovitost pomnoževanja 8-kratnih redčitev dobra. Čeprav je bilo razmerje precej drugačno v primerjavi z razmerjem pri enakih vzorcih, izoliranih z reagentom

TRIzol, statistično značilne razlike med okuženimi in slepo inokuliranimi vzorci nismo dokazali (Slika 23). Zanimivo je, da pri vzorcih Désirée ni bilo težav s slabo učinkovitostjo, kar kaže na to, da so vzorci NahG-Désirée vsebovali večje količine nečistoč.

4.3.5 miR5300

Pri analizi miR5300 pri vzorcih Désirée nismo opazili statistično značilne razlike v količini med okuženimi in slepo inokuliranimi vzorci, kljub temu, da je bilo izračunano razmerje več kot 3-krat ($\log_2$ razmerja=1,69; normalizacija na COX-mRNA) (Slika 22a) oz. 2-krat ($\log_2$ razmerja=0,75; normalizacija na snoU6 RNA) (Slika 22b) večje pri vzorcih okuženih rastlin. Visoko razmerje je bila posledica izstopajoče povečane količine enega vzorca, medtem ko sta bila ostala dva analizirana vzorca okuženih rastlin po količini miR5300 bolj podobna slepo inokuliranim. Do enakih ugotovitev smo prišli tudi pri vzorcih rastlin NahG-Désirée, kjer prav tako nismo zaznali statistično značilne razlike v količini, ne glede na uporabljen način normalizacije oz. izolacije (Slika 23).



Slika 23: Količina petih miRNA: a) normalizirano na COX-mRNA, b) normalizirano na snoU6 RNA pri vzorcih rastlin NahG-Désirée v odvisnosti od vrste izolacije. Prikazan je $\log_2$ razmerja količine med slepo inokuliranimi in s PVY^{NTN} okuženimi rastlinami (n=3) in statistična značilnost (*- p<0,05).

5 RAZPRAVA

5.1 POMNOŽEVANJE IN ŠIRJENJE VIRUSA PVY N605 PO RASTLINI

Preučevanje odnosa med krompirjem in PVY je že dolgo časa predmet številnih raziskav. Prizadevanja po čim boljšem razumevanju odziva različnih sort krompirja na okužbo z virusom PVY so ogromna, saj gre za enega od ekonomsko najpomembnejših virusov. Razumevanje odnosa ima ključni pomen pri iskanju rešitev za varstvo rastlin, s čimer bi preprečili izgube pridelka.

K boljшему razumevanju odgovora krompirja na okužbo s PVY prispeva predvsem poznavanje pomnoževanja in širjenja virusa v rastlini, pri čemer obstaja več pristopov, ki nam omogočajo vpogled. Za preučevanje pomnoževanja in širjenja PVY N605 pri dveh genotipsko različnih rastlinah krompirja Désirée in NahG-Désirée smo se osredotočili na opazovanje pojavljanja bolezenskih znamenj, na primerjavo koncentracije virusne RNA v različnih delih rastline z uporabo RT-qPCR v enem koraku in zaznavanje virusa z dodanim fluorescentnim proteinom (GFP).

Znano je, da imajo pri odgovoru na okužbo z virusi pomembno vlogo hormoni, predvsem SA. Le-ta naj bi prispevala k kopičenju zaviralcev virusnega pomnoževanja in zavirala širjenje virusa po rastlini. Vloga SA pri obrambi rastlin proti virusom je bila omenjena že leta 1978, ko so z injiciranjem SA v liste odporne sorte tobaka povečali odpornost rastline proti TMV, pri čemer je prišlo do skoraj popolnega zmanjšanja nekroz in do povečanega izražanja s patogenezo povezanih obrambnih genov (White, 1979). Prav tako so nekaj let kasneje Chivasa in sod. (1997) z apliciranjem SA na občutljive rastline tobaka inducirali odpornost proti TMV, kar se je odražalo v zmanjšanju pomnoževanja virusa in zakasnjem pojavu bolezenskih znamenj (Chivasa in sod., 1997).

Številne kasnejše raziskave so se pri preučevanju vloge SA osredotočile na uporabo transgenih rastlin tobaka in navadnega repnjakovca, ki so izražale bakterijski gen *nahG*. Omenjene rastline niso zmožne kopičiti večjih koncentracij SA, saj jo encim salicilat hidroksilaza, ki je produkt gena *nahG*, pretvarja v katehol, zato niso uspele preprečiti virusnega pomnoževanja in širjenja. Namesto tega so kazale povečano občutljivost in razvile huda bolezenska znamenja (Vlot in sod., 2009).

Nedavni raziskavi Baebler in sod. (2011, 2014) sta pomembno vlogo SA potrdili tudi pri obrambnem odgovoru krompirja na okužbo s PVY. Z uporabo rastlin tolerantne sorte Désirée in odporne sorte Rywal, ki so jih transformirali z genom *nahG*, so dokazali, da se ob okužbi s PVY^{NTN} in PVY^{N-Wi} bolezenska znamenja pojavijo le pri rastlinah z *nahG* ter da se virus v teh rastlinah hitreje pomnožuje in širi, za razliko od netransgenih rastlin (Baebler in sod., 2011, 2014).

5.1.1 Bolezenska znamenja

V našem poskusu smo želeli z uporabo transgenih rastlin NahG-Désirée preko opazovanja bolezenskih znamenj in hitrosti pomnoževanja in širjenja ugotoviti ali ima morebiti SA pomembno vlogo tudi pri obrambi krompirja proti virusu PVY N605. Glede na rezultate predhodnih študij smo predvidevali, da bodo transgene rastline NahG-Désirée bolj dovzetne in občutljive za okužbo s krompirjevim virusom PVY N605 v primerjavi z rastlinami sorte Désirée, vendar bi naj bila bolezenska znamenja milejša kot po okužbi NahG-Désirée s PVY^{NTN}.

Pri rastlinah sorte Désirée, okuženih z virusom PVY N605, smo prve morfološke spremembe na inokuliranih listih zaznali 18 dpi. Kazale so se v obliki majhnih točkastih nekroz in rumenenja (Slika 8c). Enake spremembe smo zaznali pri slepo inokuliranih rastlinah, iz česar smo sklepali, da morfološke spremembe niso bolezenska znamenja, ki bi nastala zaradi virusne okužbe, temveč so najverjetneje posledica mehanske inokulacije rastlin, kjer smo s karborundom poškodovali rastlinske laske in na listno površino vtirali rastlinski sok. Na zgornjih listih rastlin sorte Désirée smo v isti časovni točki zaznali bledenje listov iz temno v svetlo zeleno barvo in blago rumenenje (Slika 8a). Tudi te spremembe nismo smatrali kot bolezenska znamenja, saj smo podobno opazili tudi pri slepo inokuliranih rastlinah. Opažene spremembe so lahko zgolj posledica staranja listov, kjer prihaja do razgradnje klorofila, kar se odraža v rumenjenju listov.

V nasprotju z rastlinami sorte Désirée, so s PVY N605 inokulirane rastline NahG-Désirée razvila zelo izrazita bolezenska znamenja. Prve morfološke spremembe na inokuliranih listih so se pojavile 8 dpi v obliki točkastih, žilnih in obročkastih nekroz ki so iz dneva v dan postajale številčnejše in vse bolj izrazite (Slika 9 in Slika 10). Inokulirani listi so zaradi širjenja nekroz hitreje odmirali in odpadali. Rastline so razvile enaka bolezenska znamenja tudi na zgornjih neinokuliranih listih 18 dpi (Slika 11). Ker na slepo inokuliranih rastlinah poleg spremembe barve listov iz temno v svetlo zeleno nismo zaznali drugih sprememb, smo sklepali, da so morfološke spremembe na rastlinah NahG-Désirée res bolezenska znamenja, ki so se razvila kot posledica virusne okužbe.

Do podobnih ugotovitev so prišli tudi Baebler in sod. (2011), ki so pokazali, da rastline sorte Désirée, okužene z agresivnejšim različkom PVY^{NTN}, ne kažejo bolezenskih znamenj, medtem ko rastline NahG-Désirée razvijejo izrazita bolezenska znamenja že 5 dpi, kar je 3 dni prej kot v našem poskusu. Prav tako so se pri okužbi z PVY^{NTN} na istih rastlinah sistemska bolezenska znamenja in učinek palmovega drevesa pojavila 8 dni prej (10 dpi). Opažanja potrjujejo dejstvo, da velja PVY^{NTN} za bolj agresiven različek napram različkom iz skupine N, kamor spada tudi PVY N605. Milejša bolezenska znamenja in njihovo počasnejše pojavljanje, kot tudi nižje koncentracije virusa, so Kogovšek in sod. (2010) pokazali pri PVY^N glede na PVY^{NTN} pri sorti krompirja Igor.

V poskusu smo uporabili tudi virus označen s proteinom GFP, katerega je skonstruiral Rupar (2014) ter zanj pokazal, da je biološko primerljiv z neoznačenim virusom PVY N605, saj je v istih časovnih točkah pri okuženih rastlinah tobaka (*Nicotiana tabacum*) sorte Xanthii povzročal enako močna bolezenska znamenja, kot neoznačen PVY N605. Do podobnih ugotovitev smo prišli tudi v našem poskusu. Bolezenska znamenja na rastlinah NahG-Désirée, ki so bila inokulirana s PVY N605-GFP, so se pojavila ob enakem času po inokulaciji kot pri rastlinah inokuliranih z neoznačenim virusom. Prav tako je bil delež prizadetih listov bodisi z nekrozami ali rumenenjem precej podoben. Rastline so ne glede na genotipski različek virusa do 18 dpi izgubile vse spodnje inokulirane liste (Preglednica 16).

Nekoliko večjo razliko smo opazili v deležu bolezenskih znamenj na zgornjih neinokuliranih listih. Pri rastlinah, ki so bile okužene z PVY N605 smo 10 dpi na neinokuliranem listu ene rastline zaznali prisotnost točkastih nekroz, medtem ko pri rastlinah, okuženih s PVY N605-GFP v tem času ni bilo zaznati nobenih sistemskih bolezenskih znamenj. Osem dni kasneje je polovica zgornjih neinokuliranih listov rastlin, ki smo jih inokulirali s PVY N605, kazala bolezenska znamenja v obliki nekroz in rumenenja. Pri rastlinah, inokuliranih s PVY N605-GFP je bil delež takšnih listov 30 %, kar nakazuje, da virusa nista popolnoma biološko primerljiva (Preglednica 16).

5.1.2 Širjenje virusa

Za doseganje relevantnih rezultatov pri sledenju virusa, označenega s fluorescentnim proteinom, je ključna stabilnost vstavljenega fluorescentnega gena. Če se gen zaradi nastalih mutacij in rekombinacij ne prepisuje več, izgubimo fluorescentni signal in virusa ne moremo več zanesljivo zaznati.

V nedavni študiji preučevanja PVY N605-GFP, ki smo ga uporabili tudi v našem poskusu, je Rupar (2014) dokazal njegovo stabilnost v okuženih rastlinah tobaka sorte Xanthii. Virus je stabilen v vsaj treh pasajah iz rastline v rastlino in 2 meseca v okuženi rastlini, zato naj bi predstavljal močno orodje za zaznavanje in preučevanje virusnega širjenja s fluorescenčno mikroskopijo. Prav tako je PVY N605-GFP uporabil za sledenje širjenja v rastlinah tobaka. Zaznavanje fluorescence mu je omogočilo, da je virus v inokuliranih listih zaznal že 2 dpi, in sicer v obliki okroglih fluorescentnih žarišč, tri do štiri dni pred pojavom bolezenskih znamenj. Prav tako je že 5 dpi virus zaznal tudi v zgornjih neinokuliranih listih okuženih rastlin (Rupar, 2014).

V našem poskusu smo fluorescenco proteina GFP v inokuliranih listih rastlin Désirée in NahG-Désirée zaznali 6 dpi, in sicer dva dni pred pojavom bolezenskih znamenj. Podobno, kot v omenjeni študiji smo tudi mi zaznali bolj ali manj okrogla fluorescentna žarišča, ki so

se pojavljala po celotni listni površini (Slika 12b). V zgornjih neinokuliranih listih NahG-Désirée smo fluorescenco proteina GFP zaznali 18 dpi, predvsem v listnih žilah in njihovi okolici (Slika 12c), medtem ko pri rastlinah sorte Désirée fluorescence nismo zaznali. Rupar (2014) je poleg tobaka opazoval širjenje virusa z GFP v določenih sortah krompirja, med njimi tudi v sorti Désirée, kjer je virus PVY N605-GFP uspel zaznati tudi v neinokuliranih listih. Razlika bi lahko nastala, ker je za inokulacijo uporabil neredčen rastlinski sok, ki je vseboval višjo koncentracijo virusa.

V nasprotju z neinokuliranimi listi tobaka iz študije Ruparja (2014), kjer se je fluorescenca enakomerno širila iz vseh žil po celotnem listu, širjenje pri NahG-Désirée po listni površini ni bilo enakomerno. Zaznali smo le nekaj med sabo ločenih območij, ki so fluorescirala. Razlika je bila tudi v hitrosti širjenja virusa. Virus so v zgornjih neinokuliranih listih tobaka zaznali že 5 dpi, medtem ko smo v našem poskusu fluorescenco pri listih Nah-Désirée zaznali šele 18 dpi. Prav tako je Rupar (2014) fluorescenco pri različnih sortah krompirja zaznal med 18-22 dpi in ugotovil, da se PVY N605 v krompirju širi počasneje ter z drugačnim vzorcem kot v tobaku. Do podobnih zaključkov smo prišli tudi mi v primeru rastlin NahG-Désirée, medtem ko bi bilo potrebno za uspešno okužbo rastlin sorte Désirée uporabiti bolj koncentriran rastlinski sok.

Na podlagi rezultatov raziskave Kogovšek in sod. (2008) smo se odločili, da bomo za zaznavanje virusa v rastlinah krompirja uporabili metodo RT-qPCR v enem koraku. Dokazali so namreč, da je RT-qPCR v enem koraku hitrejša in enostavnejša metoda ter, da je učinkovitost pomnoževanja boljša kot pri RT-qPCR v dveh korakih. Prav tako je bila količina virusa, ki so jo zaznali z RT-qPCR v enem koraku večja, kar nakazuje na pomanjkljivosti uporabe dveh ločenih reakcij in dodatnega pipetiranja.

Za analizo smo uporabili zgornje neinokulirane liste iz treh časovnih točk 6, 11 in 18 dpi. Kljub številnim prednostim metode RT-qPCR v enem koraku je namreč analiza inokuliranih listov težavna, saj ne dobimo relevantnih rezultatov glede količine virusa, ker listi ponavadi vsebujejo še ostanke nanešenega inokuluma. Zato je za preučevanje inokuliranih listov, vsaj v prvih dneh po inokulaciji, bolj primerna uporaba z GFP označenega virusa in fluorescentnega mikroskopa, s katerim lahko točno določimo, ali je virus vstopil v celice in kje se nahaja.

Z uporabo RT-qPCR smo RNA obeh genotipskih različkov virusa zaznali v prvih dveh zgornjih neinokuliranih listih rastlin Désirée kot tudi rastlin NahG-Désirée že 6 dpi (Slika 14) oziroma 12 dni pred pojavom bolezenskih znamenj in pojavom fluorescence proteina GFP, saj smo pri zaznavanju s fluorescenčnim mikroskopom omejeni na dejstvo, da se mora protein GFP sintetizirati v zadostni količini, da ga opazimo. Prav tako bi lahko sklepali, da se virusna RNA razširi v zgornje neinokulirane liste še preden se sestavi celoten virus. Ker smo virusno RNA zaznali pri obeh genotipskih različicah krompirja

hkrati, ne moremo določiti v katerih rastlinah se je virus hitreje sistemsko razširil. Za to bi bilo potrebno analizirati liste pred 6 dpi.

Listov iz zgodnejših časovnih točk nismo analizirali, ker nismo pričakovali, da se bo virus tako hitro razširil. Glede na podatke iz literature o širjenju bolj agresivnega različka PVY^{NTN} v rastlinah Désirée in NahG-Désirée smo namreč sklepali, da bomo PVY N605 zaznali kasneje. Baebler in sod. (2011) so virus PVY^{NTN} v zgornjih neinokuliranih listih rastlin Désirée in NahG-Désirée zaznali 7 dpi in to ne pri vseh listih. Kljub temu, da je PVY^{NTN} bolj agresiven različek, kar se je pokazalo pri hitrosti pojavljanja bolezenskih znamenj, naša opažanja kažejo na to, da se tako PVY N605 kot tudi PVY N605-GFP hitreje razširita v prva dva zgornja neinokulirana lista.

Statistična analiza je pokazala, da med zgornjimi neinokuliranimi listi rastlin Désirée in NahG-Désirée, ki so bili pobrani 6 dpi, ni bilo statistično značilnih razlik v količini virusne RNA. Virus se je pri obeh obeh genotipskih različicah krompirja, tudi pri rastlinah sorte Désirée, ki niso razvile bolezenskih znamenj, do 6 dpi razširil in pomnožil do primerljivih koncentracij (Slika 14ab).

Razlike med rastlinami Désirée in NahG-Désirée so se pokazale pri listih, pobranih v kasnejših časovnih točkah 11 in 18 dpi (Slika 14a). Glede na zaznane večje količine virusne RNA v rastlinah NahG-Désirée kot pri Désirée, smo dokazali, da se virus PVY N605 pri rastlinah NahG-Désirée hitreje namnožuje, s čimer smo pokazali na še eno od posledic, ki jo ima pomanjkanje SA na rastline.

V nasprotju s tem rastline Désirée in NahG-Désirée, okužene s PVY N605-GFP, niso kazale razlik v količini virusa. Le pri listih pobranih 18 dpi, smo opazili višje koncentracije v listih NahG-Désirée in hitrejše pomnoževanje virusa v teh rastlinah. Da se virusa PVY N605 in PVY N605-GFP ne pomnožujeta enako hitro, smo potrdili tudi ob primerjanju količine neoznačenega in označenega virusa PVY N605 v zgornjih neinokuliranih listih rastlin NahG-Désirée, medtem ko teh razlik pri rastlinah Désirée nismo opazili (Preglednica 17). Ena od možnih razlag bi lahko bila, da se PVY N605-GFP v krompirju res počasneje pomnožuje ter da pride to do izraza le pri rastlinah NahG-Désirée, kjer se neoznačen virus hitreje pomnožuje kot pri rastlinah Désirée. Lahko, da rastline Désirée enako močno zavirajo pomnoževanje označenega in neoznačenega virusa.

5.2 VPELJAVA METODE KVANTITATIVNE ANALIZE miRNA

Raziskave miRNA so v zadnjem času precej napredovale, saj je vse več zanimanja za odkrivanje njihove vloge pri regulaciji bioloških procesov kot so razvoj in diferenciacija celic, metabolizem, hormonska regulacija, celična smrt kot tudi v odgovoru na biotski

stres. Vsaka miRNA lahko regulira izražanje številnih genov in že majhna sprememba v nastanku in količini miRNA lahko vodi do signifikantnih bioloških posledic. Vse kaže, da lahko njihov pomen primerjamo s pomenom transkripcijskih faktorjev (Bazzini in sod., 2011).

Trenutno je na voljo več tehnologij za njihovo analizo med katerimi so najbolj pogosto uporabljene mikromreže, RT-qPCR in NGS (Pritchard in sod., 2012). Pri tem za vse omenjene tehnologije velja, da je zanesljivo zaznavanje razlike v količini miRNA odvisno od kvalitete (čistosti in integritete) izolirane RNA. Integriteta RNA je pomembna za uspešno kvantifikacijo miRNA, saj lahko kratki fragmenti, ki nastanejo pri razgradnji mRNA, ki jo uporabimo za normalizacijo podatkov, vodijo v precenjeno oz. podcenjeno oceno količine določene miRNA (Podolska in sod., 2011). Medtem ko integriteta samih miRNA ni tako ogrožena, le-te naj bi bile namreč v primerjavi z daljšimi RNA veliko bolj stabilne, ker so majhne in zaradi tega manj dovzetne za razgradnjo z ribonukleazami (Liu in sod., 2008). Večji problem predstavljajo morebitno prisotne nečistoče, ki zaradi podobnih absorpcijskih lastnosti vodijo v precenjene meritve koncentracije RNA, hkrati pa vplivajo na zmanjšano učinkovitost delovanja encimov med obratnim prepisovanjem in pomnoževanjem DNA (Thermo Fisher Scientific, 2012),

Za izolacijo RNA obstaja mnogo različnih protokolov in komercialno pripravljenih kompletov, s katerimi pridobimo tudi frakcijo miRNA. Ker še vedno ni soglasja glede optimalne metode izolacije miRNA, smo se odločili, da bomo testirali štiri različne načine izolacije in preverili ali je izolacija z reagentom TRIzol, glede na določene izsledke iz raziskav, res najbolj primerna za izolacijo miRNA.

Izolacija z reagentom TRIzol je bila v povprečju najbolj učinkovita glede količine celokupne RNA, dokazali smo, da z njo lahko iz 250 g rastlinskega tkiva pridobimo tudi do 4000 ng/ μ l RNA. Prav tako je bila učinkovita pri pridobivanju nerazgrajene RNA in učinkovitem odstranjevanju proteinov. Je pa pomanjkljivost metode v tem, da so vzorci celokupne RNA vsebovali precej nečistoč, kar smo pripisali ostankom fenola in gvanidijevega izotiocianata (Preglednica 18). Ker obe snovi absorbirata svetlobo valovne dolžine blizu 260 nm, kot nukleinske kisline, je možno, da so bile spektrofotometrične meritve nekoliko precenjene. Zato smo tudiz agarozno gelsko elektroforezo preverjali količino celokupne RNA v odvisnosti od uporabljene metode izolacije in pri tem ugotovili, da so spektrofotometrične ocene dobro korelirale z intenzivnostjo lis v gelu (Slika 16).

Na slabše razmerje absorbance valovnih dolžin 260/230 pri RNA, izolirane z reagentom TRIzol, so opozorili že Ach in sodelavci (2008). Pokazali so, da je čistost pogosto slabša v primerjavi s kompletoma »miRNeasy« in »mirVana«, ki temeljita na uporabi kolon. Kaže, da slabo razmerje ni problem zgolj v našem poskusu, ampak da je TRIzol kljub številnim korakom čiščenja med izolacijo precej težko učinkovito odstraniti. Kljub temu smo z to

metodo dosegli največjo količino miRNA, kar so pokazali tudi že Masotti in sod. (2009) pri primerjavi uporabe reagenta TRIzol s kompletoma »miRVanaTM microRNA Isolation Kit« in »RNeasy Plant Mini Kit«.

Uporaba kompleta »RNeasy Plant Mini Kit«, ki temelji na uporabi kolon s silikatnimi membranami, je tehnično nezahtevna in hitra. Prav tako kot reagent TRIzol omogoča dober izplen RNA in od vseh metod tudi najboljšo čistost RNA. Vendar se je izkazalo, da je problematična z vidika izolacije miRNA, kar je znano že iz literature. Metoda namreč omogoča učinkovito izolacijo le molekul, daljših od 200 nt. Kljub temu smo določen delež miRNA vendarle uspeli zaznati. Sklepali smo, da smo izolirali miRNA, ki so se naključno vezale na daljše molekule RNA oz. na silikatno membrano in se tako izolirale hkrati z njimi.

Modificiran protokol »Rneasy«, ki je vključeval spiranje z večjo količino etanola, se glede izplena in čistosti RNA ni izkazal za najbolj učinkovitega, saj smo glede na običajni protokol izolirali manj RNA, poleg tega je etanol prispeval k večji izolaciji nečistoč. Smo pa v primerjavi z navadnim protokolom »Rneasy Plant Mini Kit« dosegli boljši izplen miRNA, v enem primeru, ki je bil celo primerljiv z reagentom TRIzol. Na splošno smo najslabše rezultate izmed vseh analiziranih metod izolacije pridobili pri uporabi kompleta »MagMAXTM«. Kaže, da imajo magnetni delci omejitve za izolacijo večjih količin RNA, poleg tega številni koraki čiščenja in spiranja ne odstranijo učinkovito vseh nečistoč. Delci očitno preferenčno vežejo daljše molekule, medtem ko se miRNA izgubljajo, podobno kot pri kolonah kompleta »RNeasy Plant Mini Kit«.

Da je uporaba metod, ki temeljijo na uporabi kolon problematična, so opozorili tudi v primeru komercialno pripravljenega kompleta ki se široko uporablja in je razvit izključno za izolacijo miRNA. Nedavna raziskava je pokazala, da ne omogoča enakovredne izolacije miRNA. Določen delež miRNA se namreč pri izolaciji veže na večje molekule RNA, ki jih pri izolaciji odstranjujemo in s tem hkrati izgubljammo miRNA. Izguba le-teh vodi v razlike tako v sestavi kot številčnosti določene miRNA in posledično v napačne rezultate analize v primerjavi z metodami, ki temeljijo na izolaciji celokupne RNA kot je TRIzol (Redshaw in sod., 2013).

Na osnovi testiranja različnih metod izolacije smo ugotovili, da vsaka različno vpliva na donos in kvaliteto izolirane RNA. Poleg tega vse niso primerne, kadar so predmet naše raziskave miRNA. Namreč značilno lahko vplivajo na sestavo oz. delež miRNA v vzorcu, kar lahko vodi v napačne rezultate analiz. Navkljub številnim dostopnim metodam za izolacijo RNA so bili naši rezultati v skladu z opažanji drugih raziskovalcev. Zato smo se odločili, da bomo za analizo petih miRNA, celokupno RNA izolirali s pomočjo reagenta TRIzol.

Za pravilno analizo miRNA je poleg izbire najbolj primerne načina izolacije, potrebno upoštevati potek metod, ki sledijo. V našem poskusu smo se odločili, da bomo za kvantifikacijo miRNA uporabili RT-qPCR v dveh korakih z uporabo kompleta »TaqMan miRNA Assay« za obratno prepisovanje, ki je razvit izključno za analizo miRNA ter vključuje specifične začetne oligonukleotide z zanko, ki omogočajo dobro učinkovitost in specifičnost obratnega prepisovanja, saj so zasnovani tako, da prilegajo zgolj na zrele miRNA in ločijo med podobnimi miRNA, ki se razlikujejo le v enem nukleotidu. Prav tako na njihovo učinkovitost ne vpliva morebitna prisotnost genomske DNA (Chen in sod., 2005). Uporaba omenjenih specifičnih začetnih oligonukleotidov v povezavi z uporabo hidroliznih sond TaqMan med pomnoževanjem odlikuje visoka občutljivost, specifičnost, ponovljivost in širok dinamični obseg kvantifikacije.

Pomembno je, da obratno prepisovanje in qPCR potekata karseda optimalno, na kar v precejšnji meri vpliva vhodna količina RNA in njena čistost. Na to, kolikšna je najbolj optimalna količina RNA za učinkovito obratno prepisovanje, vpliva več dejavnikov kot so kakovost vzorca, stopnja izraženosti tarčnega gena in vrsta uporabljenega kompleta, glede na učinkovitost encima reverzne transkriptaze in optimiziranih sestavin pufr. Proizvajalci so včasih priporočali čim večje koncentracije RNA, a takšne smernice niso bile vedno najboljše izbira za kvantitativne poskuse, saj je za določene vrste vzorcev in v primeru analiziranja genov, ki se v celici visoko izražajo, včasih primernejša uporaba manjših količin RNA (Libus in Štorchová, 2006).

Že pretekle raziskave so izpostavile vpliv količine RNA na obratno prepisovanje. Določeni tipi encimov za prepisovanje so namreč bolj občutljivi na povišane koncentracije RNA. Prav tako se pri bolj koncentrirani RNA kaže večji vpliv zaviralnih snovi na zmanjšano delovanje encima, posledica česar je, da se vsa RNA ne prepíše v cDNA. Temu se lahko izognemo bodisi s čiščenjem RNA bodisi z uporabo bolj redčenih vzorcev RNA, s čemer hkrati razredčimo tudi zaviralne snovi in preprečimo ali vsaj omilimo njihov vpliv.

V primeru kompleta »TaqMan miRNA Assay« proizvajalec priporoča uporabo 1-10 ng celokupne RNA v 15- μ l reakcijski mešanici. V našem primeru smo volumen reakcijske mešanice za obratno prepisovanje zmanjšali iz 15 na 7,5 μ l, saj so Chen in sod. (2005) ugotovili, da manjši volumen ne zmanjša uspešnosti reakcije, zmanjša pa stroške analize.

Z uporabo različne količine celokupne RNA smo želeli ugotoviti, ali je in kakšen je vpliv koncentracije RNA na učinkovitost obratnega prepisovanja in na končno razmerje v količini določene miRNA med okuženimi in slepo inokuliranimi rastlinami.

Ugotovili smo, da učinkovitost pomnoževanja ni enako dobra pri vseh uporabljenih izhodnih koncentracijah RNA, kar smo potrdili tudi z izračunom teoretičnega števila kopij, ki jih daje vsaka RNA pri RT-qPCR (Preglednica 20). Pri treh poskusih RT-qPCR - pri

miR172a, miR390b in miR5300 smo ugotovili, da se neredčena RNA s koncentracijo 10 ng/ μ l bolj učinkovito prepisuje kot 10-krat in 100-krat redčena RNA s koncentracijami 1 in 0,1 ng/ μ l. Poleg tega so lahko v določenih primerih prevelike redčitve RNA pred obratnim prepisovanjem neustrezne z vidika miRNA, ki se v celici nahajajo v manjših količinah, kar smo pokazali na primeru miR390b, kjer so bile vrednosti Cq, zaradi premajhnih koncentracij RNA, že izven območja kvantifikacije. Drugače se je izkazalo pri RT-qPCR miR482a, kjer smo ugotovili, da prihaja pri uporabi bolj koncentrirane RNA do neučinkovitega prepisovanja, medtem ko se učinkovitost z uporabo 10-krat in 100-krat redčene RNA izboljša. Po pregledu vrednosti Cq smo ugotovili, da vzorci celokupne RNA vsebujejo veliko število kopij miR482a, kar bi lahko bil eden od glavnih razlogov za neučinkovit prepis vseh miR482a v cDNA.

Ugotovili smo tudi, da je tudi miR5300 prisotna v precejšnjem številu kopij, a pri RT-qPCR ni bilo težav z učinkovitostjo pomnoževanja neredčene RNA. Očitno je bolj verjetna razlaga, da je RT-qPCR z miR482a od vseh najbolj občutljiv za prisotnost zaviralnih snovi v vzorcih RNA, ki se z redčenjem RNA prav tako razredčijo in zmanjšajo negativne učinke na prepisovanje.

Na podlagi rezultatov smo zaključili, da je za RT-qPCR pri miR172a, miR390b in miR5300 za obratno prepisovanje bolj ustrezna uporaba koncentracije RNA, ki se giblje okrog 10 ng/ μ l, kar je približno 2-krat več kot so priporočila proizvajalca kompleta »Taqman miRNA Assay«. Se pa priporočila bolje skladajo za uporabo RT-qPCR z miR482a, kjer so bolj ustrezne manjše koncentracije, v našem primeru med 0,1 in 1 ng/ μ l. Vzrok neskladnosti so lahko različni nivoji posameznih miRNA in različna vrsta vzorcev, saj je proizvajalec testiral delovanje encimov na vzorcih živalskih celičnih linij.

Ker smo za analizo miRNA uporabljali specifične oligonukleotide, smo bili primorani uporabiti ločene reakcije obratnega prepisovanja za vsako posamezno miRNA in ločeno reakcijo obratnega prepisovanja z uporabo naključnih začetnih oligonukleotidov za referenčni RNA, COX-mRNA in snoU6 RNA. Zato nas je zanimalo, v kolikšni meri so reakcije obratnega prepisovanja ponovljive. V ta namen smo testirali ponovljivost obratnega prepisovanja miR172a in miR482a, COX-mRNA in snoU6 RNA. Ugotovili smo, da reakcija obratnega prepisovanja miRNA ni najbolj ponovljiva (Slika 20ab). Pri polovici vzorcev je bilo namreč opaziti precejšnja odstopanja med prvo in drugo ponovitvijo reakcije, pri čemer je bila prva reakcija bolj učinkovita. Razlike so se posledično izražale tudi na končnem razmerju $\log_2$ v količini v z virusom okuženih in slepo inokuliranih rastlinah, ki je bilo v drugi reakciji manjše. Glede na stabilnost miRNA ne moremo reči, da je vzrok takšnih rezultatov v njihovi razgradnji. Bolj verjetno je, da gre za neponovljivost reakcije obratnega prepisovanja, ki je zaradi sekundarne ali terciarne strukture molekul RNA, zaradi učinkovitosti prileganja začetnih oligonukleotidov in učinkovitosti delovanja reverzne transkriptaze (Ståhlberg in sod., 2004; Baebler, 2006)

verjetno pa k variabilnosti pripomore tudi dodaten korak ligacije začetnega oligonukleotida z zanko. V nasprotju z obratnim prepisovanjem miRNA se je izkazalo obratno prepisovanje snoU6 RNA bolj ponovljivo, pri čemer sta rahlo izstopala dva vzorca (Slika 20d). Od vseh najbolj ponovljivo je bilo obratno prepisovanje mRNA gena COX (Slika 20c).

Poleg ponovljivosti reakcije obratnega prepisovanja smo preverili tudi ponovljivost qPCR in sicer s primerjavo vrednosti Cq med dvema ponovitvama (paralelkama) na isti ploščici (podatki niso prikazani) relativnega števila kopij. Dobljeni rezultati so pokazali na dobro ujemanje tako med dvema paralelkama na isti ploščici ($Cq < 0,5$) kot tudi med obema ponovitvama reakcije qPCR (Slika 21), iz česar smo zaključili, da je qPCR zelo ponovljiva metoda in da razlike, ki jih pridobimo s ponavljanjem RT-qPCR izhajajo v največji meri iz reakcije obratnega prepisovanja.

Za pravilno normalizacijo in oblikovanje zanesljivih profilov izražanja je ključna izbira primerne referenčne gena oz. referenčne RNA. Za normalizacijo miRNA je najbolj primerna uporaba bodisi male RNA ali še boljše miRNA, katerih geni se konstitutivno izražajo. S tem poleg zmanjšanja razlik v količini, kvaliteti RNA, učinkovitosti obratnega prepisovanja in qPCR, zmanjšamo tudi pristranskost, ki jo vnaša določena metoda izolacije (Kulcheski in sod., 2010).

snoU6 je mala nekodirajoča jedrna RNA (snoRNA), ki usmerja 2'-O metilacijo U6 snRNA. Glede na konstitutivno izražanje gena za snoU6 RNA in ubikvitarnost molekule, jo določene raziskave opredeljujejo kot primerno za normalizacijo pri analizi miRNA (Lim in sod., 2011). Zato je bil namen dela med drugim tudi oceniti primernost snoU6 RNA kot primerne normalizatorja pri analizi miRNA glede na uporabljen način izolacije. Ugotovili smo, da izmed štirih analiziranih izolacij, le uporaba reagenta TRIzol omogoča enakovredno izolacijo tako kratkih kot tudi dolgih molekul RNA, zato lahko v primeru uporabe tega načina izolacije podatke normaliziramo bodisi na COX-mRNA bodisi na snoU6 RNA.

Kljub pričakovanju, da bomo lahko snoU6 RNA pri uporabi kompleta »RNeasy Plant Mini Kit« in »MagMAX™« izolirali na podoben način kot miRNA, saj gre za molekulo dolgo 102 nt, temu ni bilo tako. Obe metodi izolacije očitno omogočita učinkovito izolacijo tudi molekule dolge okrog 100 nt, zato bi bilo v primeru teh metod izolacije potrebno kot referenčni gen oz. referenčno RNA uporabiti eno izmed miRNA ali poiskati takšno molekulo, ki ima podobno dolžino in strukturo, kot molekule miRNA.

Glede na dobljene rezultate ne moremo sklepati, katera od uporabljenih referenčnih RNA je boljša za normalizacijo naših podatkov. Bi pa lahko rekli, da je glede na ponovljivost obratnega prepisovanja bolj primerna normalizacija na COX-mRNA.

5.3 DOLOČANJE KOLIČINE miRNA

Ugotavljali smo količino petih miRNA, izbranih na osnovi rezultatov NGS (pridobljeni s strani Nacionalnega inštituta za biologijo) (Preglednica 22), ki so kazali bodisi povečano bodisi zmanjšano razmerje v količini miRNA med okuženimi in neokuženimi rastlinami Désirée in NahG-Désirée. Za analizo smo uporabili celokupno RNA vzorcev Désirée in NahG-Désirée, izoliranih z reagentom TRIzol (Preglednica 18). Poleg tega smo za primerjavo vpliva izolacije na končno razmerje v količini miRNA uporabili iste vzorce NahG-Désirée, katerih RNA je bila izolirana s kompletom »RNeasy Plant Mini Kit« (Preglednica 2).

V reakcijske mešanice za RT-qPCR smo dali tolikšno količino RNA, kot se je izkazala za najbolj učinkovito za posamezno miRNA.

Preglednica 22: Primerjalna analiza vsebnosti miRNA z RT-qPCR ali NGS.

log ₂ razmerja	miR168		miR172		miR390		miR482		miR5300	
	RT-qPCR	NGS	RT-qPCR	NGS	RT-qPCR	NGS	RT-qPCR	NGS	RT-qPCR	NGS
Désirée	1,75	-0,21	2,06	1,13	2,86	1,34	1,92	-0,8	1,69	-0,92
NahG-Désirée	-0,44	0,72	-0,69	0,73	-0,61	1,19	0,44	1,37	-0,27	0,85

Prikazane so vrednosti log₂ razmerja količine posamezne RNA.

Preučevali smo količino miR168a predstavnice družine miR168, za katere je znano, da regulirajo izražanje gena za protein AGO1, ki ima ključno vlogo pri biosintezi in delovanju miRNA ter siRNA. Onemogočena vezava miR168 na prepis gena AGO1 vodi v povečano akumulacijo proteina AGO1 in porušeno homeostazo v celici, kar privede do razvojnih napak, ki se kažejo v kodranju listov, zmanjšani plodnosti rastlin in porušeni organizaciji listov na stebelu (Jones-Rhoades in sod., 2006). Do povečane količine miR168 pride ob različnih stresnih pogojih kot so sevanje UV-B, vročina, prevelika vsebnost soli v okolju in suša (Liu in sod., 2008). Prav tako številne raziskave potrjujejo, da sodeluje tudi pri odgovoru na okužbe z virusi. Pacheco in sod. (2012) so opisali njene povečane koncentracije 8 dpi, pri okužbi rastlin tobaka s PVY, prav tako so pri rastlinah navadnega repnjakovca in tobaka (*Nicotiana benthamiana*) okuženimi z različnimi virusi v vseh primerih zaznali njeno povečano količino, z največjimi koncentracijami v tkivih, ki so akumulirali virus (Varallyay in sod., 2010). Povečano količino miR168 so opisali tudi pri rastlinah riža (*Oryza sativa*) okuženih z virusom RSV (Du in sod., 2011) in paradižnika, okuženih s CMV, s ToMV in virusom aspermije paradižnika (TAV) (Feng in sod., 2011). Tudi v našem poskusu smo pri vzorcih okuženih rastlin Désirée zaznali povečano količino, ki je bila tudi do 4-krat večja kot pri slepo inokuliranih (Slika 22), medtem ko se pri vzorcih rastlin NahG-Désirée po okužbi z virusom količina miR168 ni spremenila (Slika 23).

Za analizo smo izbrali tudi miR172a iz družine miR172, ki so pomembne za reguliranje cvetenja z zmanjšanjem izražanja genov za AP2, TOE1, TOE2, ki delujejo kot zaviralci razvoja cveta. Znano je, da do cvetenja lahko pride šele potem, ko se nivo omenjenih proteinov zmanjša pod določeno kritično točko. Prekomerna količina miR172 se odraža v številnih razvojnih nepravilnostih kot so prezgodnje cvetenje, redukcija cvetnega odevala, preobrazba čašnih v plodne liste itd. (Llave, 2004). Povečana količina miR172 ob virusni okužbi, je opisana na primeru rastlin paradižnika okuženih z virusom ToLCV («Tomato leaf curl new delhi virus») (Nagvi in sod., 2010). Povečano količino smo zaznali tudi pri vzorcih okuženih rastlin Désirée, ki je bilo skoraj 5-krat večje kot pri vzorcih slepo inokuliranih rastlin, če smo normalizirali na COX-mRNA (Slika 22a). Pri vzorcih rastlin NahG-Désirée po okužbi ni prišlo do sprememb v količini miR172a (Slika 23).

Preučevali smo tudi miR390b iz družine miR390, ki s katalizo cepitve prepisov genov TAS3, omogočajo sintezo ta-siRNA. Opisana je tudi povečana količina pri okužbi rastlin tobaka s TMV 15 dpi in 22 dpi (Bazzini in sod., 2011) ter pri rastlinah riža okuženih z virusom RSV 21 dpi (Du in sod., 2011). Povečano količino smo zaznali tudi pri okuženih vzorcih rastlin Désirée, ki je bilo več kot 7-kratno v primeru normalizacije na COX-mRNA (Slika 22a) in 4-kratno v primeru normalizacije na snuU6 RNA (Slika 22b), medtem ko se pri vzorcih NahG-Désirée po okužbi količina ni spremenila (Slika 23).

Primerjali smo tudi količino miR482a iz družine miR482, za katere je znano, da so pri stročnicah vpletene v regulacijo nastanka nodulov, kjer povečana količina omogoča povečanje števila nodulov (Li in sod., 2010). V nasprotju z povečano količino predhodno omenjenih miRNA, naj bi se količina miR482 po okužbi z različnimi virusi in bakterijami pri rastlinah paradižnika in bombaža zmanjšala, kar posledično vpliva na povečano količino njenih tarčnih mRNA, ki vključujejo z obrambo povezane gene, za katere je znano, da prispevajo k odpornosti rastline (Zhu in sod., 2013). V nasprotju s tem v našem poskusu niti pri vzorcih rastlin Désirée niti NahG-Désirée po okužbi ni prišlo do sprememb v količini (Slika 22 in Slika 23).

Do enakih ugotovitev smo prišli tudi pri analizi miR5300 iz družine miR5300. Količina se niti pri vzorcih rastlin Désirée niti NahG-Désirée po virusni okužbi ni spremenila. Kljub temu, da so podatki iz literature o miR5300 precej skopi, do sedaj objavljena raziskava omenja njeno vlogo pri razvoju in zorenju plodov paradižnika (Mohorianu in sod., 2011). Glede na naše rezultate, kjer ob okužbi ni prišlo do razlik v njeni količini, bi lahko sklepali, da le-ta nima večje vloge pri odgovoru na okužbo z virusi.

Glede na to, da so že Wang in sod. (2008) v svoji raziskavi opozorili na neskladne rezultate v izražanju genov, pridobljenih z različnimi metodami kot so mikromreže, prenos northern, PCR in NGS, je splošno znano, da vsaka metoda vnaša določeno pristranskost. Zato je pomembno, da rezultate, ki jih pridobimo s pomočjo ene metode, primerjamo tudi z

rezultati, ki jih dajejo ostale. V našem primeru smo se odločili, da bomo za primerjavo uporabili rezultate NGS (Preglednica 22), pri čemer so bili rezultati za vzorce Désirée pridobljeni s pomočjo platforme SOLiD, za NahG-Désirée pa s pomočjo platforme Solexa/Illumina. S primerjavo naših rezultatov $\log_2$ razmerja količin miRNAz rezultati NGS, smo ugotovili, da se dobljene vrednosti ne skladajo povsem.

Naši rezultati so v primeru okuženih vzorcev rastlin Désirée kazali na statistično povečano količino miR168a, miR172a in miR390b, medtem ko so rezultati NGS kazali povečano količino miR172a in miR390b, a z nižjim $\log_2$ razmerja. Količina miR168a pa naj bi bila nespremenjena. Po rezultatih NGS sta bili količini miR482a in miR5300 zmanjšani. V nasprotju s tem, v našem poskusu med okuženimi in slepo inokuliranimi rastlinami nismo zaznali statistično značilne razlike. Pri vzorcih NahG-Désirée, kjer smo zaključili, da se količina nobene od petih analiziranih miRNA po okužbi ne spremeni, so rezultati NGS pokazali na povečano količino vseh petih miRNA.

Tudi Knutsen in sod. (2013) so pri primerjavi različnih metod za analizo miRNA ugotovili, da le-te dajejo različne rezultate glede dejanske spremembe ($\log_2$ razmerja) v količini posamezne miRNA, vendar kljub temu imajo vse enak vzorec bodisi povečanje bodisi zmanjšanje količine, kar pa se ne sklada z našimi opažanji. Prav tako so opazili, da če so spremembe v količini večje potem je večja verjetnost, da bodo vse metode napovedale enak rezultat. V njihovem primeru se je izkazalo, da so šele pri 3-kratni razliki v količini ($\log_2$ razmerja=1,6) z vsemi metodami uspeli pridobiti enake rezultate.

Rezultatom platforme SOLiD od vseh najmanj zaupamo, saj je med določanjem nukleotidnega zaporedja prišlo do tehničnih težav. Glede na težave s ponovljivostjo obratnega prepisovanja miRNA in težav z izbiro primerne RNA za normalizacijo pri uporabi RT-qPCR in pristranskosti pri določanju nukleotidnega zaporedja, ki so vnesene med pripravo knjižnic cDNA, kot so preferenčna ligacija adaptorjev na določena zaporedja, pomnoževanje s PCR, obratno prepisovanje in izolacija iz gela, se težko odločimo, katerim rezultatom bolj zaupamo. V tej smeri bi bilo potrebo za vsako uporabljeno metodo odkriti njene pristranskosti in jih skušati odpraviti.

Naši rezultati kažejo, da po okužbi z virusom pri rastlinah Désirée, vsebnost SA pripomore k povečanemu izražanju genov za miR168a, miR172a in miR390b, kar bi lahko ključno prispevalo k vzpostavitvi tolerance na okužbo proti PVY^{NTN}. Razumevanje regulacije izražanja genov za miRNA ob virusnih okužbah pri odpornih rastlinah bi lahko prispevalo k razvoju bioloških označevalcev, ki bi nam omogočali zaznavati bolezensko stanje rastlin. Poleg tega bi lahko tiste miRNA, za katere bi se izkazalo, da so ključne pri odpornosti rastline, uporabili kot del protivirusne strategije v za virus občutljivih rastlinah.

6 SKLEPI

Namen dela magistrske naloge je bil primerjati pojavljanje in oblike bolezenskih znamenj, širjenje in pomnoževanje PVY N605 pri rastlinah sorte Désirée in NahG-Désirée ter glede na rezultate o pomnoževanju in pojavu bolezenskih znamenj sklepati na pomembnost oz. vlogo salicilne kisline pri obrambi krompirja proti virusu.

- Ugotovili smo, da pomanjkanje SA bistveno vpliva na povečano občutljivost za virusno okužbo, kar se odraža v pojavu tako lokalnih kot tudi sistemskih bolezenskih znamenj pri genotipski različici krompirja NahG-Désirée v nasprotju s sorto Désirée, pri kateri je SA preprečila razvoj bolezenskih znamenj.
- Vsebnost SA prav tako vpliva na upočasnjeno pomnoževanje virusa v zgornjih neinokuliranih listih v kasnejših točkah po inokulaciji (11 in 18 dpi), ne preprečuje pa širjenja virusa po rastlini.
- Na osnovi odsotnih bolezenskih znamenj in dokazanem virusnem pomnoževanju v inokuliranih in neinokuliranih listih rastlin, smo zaključili, da je sorta Désirée na virus PVY N605 tolerantna.
- Za primerjavo širjenja in pomnoževanja virusa PVY N605 pri Désirée in NahG-Désirée smo uporabili tudi virus označen z GFP. Fluorescenco proteina GFP smo v inokuliranih listih pri obeh genotipskih različicah krompirja zaznali isti dan po inokulaciji. Prav tako smo fluorescenco zaznali v zgornjih neinokuliranih listih NahG-Désirée.
- Pri primerjavi PVY N605-GFP z neoznačenim virusom, smo pokazali, da v enakem času po inokulaciji na inokuliranih listih rastlin NahG-Désirée izzove podobno intenzivna bolezenska znamenja kot neoznačen virus PVY N605, vendar smo opazili razlike v deležu bolezenskih znamenj na neinokuliranih listih in v številu kopij virusne RNA 11 in 18 dpi, iz česar smo sklepali, da se virus PVY N605-GFP v rastlinah NahG-Désirée pomnožuje počasneje.

Namen drugega dela magistrske naloge je bil vpeljati metodo RT-qPCR v dveh korakih za analizo miRNA. Vpeljana metoda nam je omogočila analizo miRNA in opazovanje spremembe v količini izbranih miRNA pri dveh genotipsko različnih rastlinah krompirja pri zgodnjem odgovoru na okužbo (3 dpi), saj gre v tem času za dejanski obrambni odgovor rastline in ne za posledico okužbe.

- Na osnovi primerjanja 4 različnih načinov izolacije celokupne RNA, smo ugotovili, da vsaka izmed njih različno vpliva na donos in kvaliteto RNA. Vse metode tudi

niso učinkovite pri izolaciji kratkih molekul, kot so miRNA. Izmed vseh izolacij je edino izolacija z reagentom TRIzol omogočila enakovredno izolacijo tako kratkih kot tudi dolgih molekul RNA. Prav tako je bila najboljša z vidika pridobivanja velikih količin RNA in velikega izplena miRNA. Hkrati je učinkovita pri odstranjevanju proteinov, medtem ko je ostanke reagenta TRIzol, kljub številnim korakom težko odstraniti. Težavam se lahko izognemo z uporabo bolj redčenih vzorcev.

- Pokazali smo, da koncentracija RNA vpliva na učinkovitost reakcije obratnega prepisovanja, kar je poleg nivoja analizirane miRNA v veliki meri odvisno tudi od občutljivosti uporabljenega testa.
- Reakcije obratnega prepisovanja miRNA so manj ponovljive v primerjavi z reakcijami obratnega prepisovanja snoU6 RNA in COX-mRNA.
- qPCR je bolj ponovljiva od obratnega prepisovanja.
- Vpeljana metoda RT-qPCR nam je omogočila analizo petih miRNA. Ugotovili smo, da se po okužbi z virusom PVY^{NTN} pri rastlinah Désirée poveča količina, miR172a in miR390b, medtem ko se pri rastlinah NahG-Désirée količina nobene od analiziranih miRNA po okužbi z virusom ni spremenilo. Rezultate log₂ razmerja količin miRNA smo primerjali z rezultati NGS, pri čemer smo ugotovili, da se rezultati niso povsem skladali, saj vsaka metoda vnaša določeno pristranskost. Verjetno bi k večji zanesljivosti rezultatov doprinesla boljše metoda za izolacijo miRNA.
- Iz dobljenih rezultatov bi lahko sklepali, da okužba s PVY pri rastlinah Désirée vodi v povečano izražanje genov za miR168a, miR172a in miR390b, kar bi lahko poleg SA prispevalo k vzpostavitvi tolerance na okužbo proti PVY^{NTN}. Razumevanje regulacije izražanja genov za miRNA ob virusnih okužbah pri odpornih rastlinah bi lahko prispevalo k razvoju bioloških označevalcev, ki kažejo na bolezensko stanje rastlin ali k uporabi tistih miRNA, ki se izkažejo kot ključne za odpornost rastline, kot del protivirusne strategije v za virus občutljive rastline.

7 POVZETEK

PVY je ekonomsko najpomembnejši in najnevarnejši virus, ki zmanjšuje donos in kakovost krompirja po celem svetu, zato so prizadevanja po čim boljšem razumevanju odziva različnih sort krompirja na okužbo z virusom PVY ogromna. Razumevanje kompleksne interakcije med krompirjem in PVY je že dolgo časa predmet intenzivnih raziskav, saj je ključno pri vzgoji odpornih sort, ki preprečijo napad virusa in širjenje bolezni. Znano je, da imajo pri odgovoru na okužbo z virusi pomembno vlogo hormoni, predvsem SA, ki povzroči kopičenje obrambnih snovi in zavira razširjanje virusa po rastlini.

Namen dela magistrske naloge je bil primerjati pojavljanje in oblike bolezenskih znamenj, širjenje in pomnoževanje PVY N605 pri rastlinah sorte Désirée in NahG-Désirée ter glede na rezultate o pomnoževanju in pojavu bolezenskih znamenj sklepati na pomembnost oz. vlogo SA pri obrambi krompirja proti virusu. Na podlagi rezultatov predhodnih raziskav smo predvidevali, da bodo transgene rastline NahG-Désirée bolj dovzetne in občutljive za okužbo z virusom v primerjavi z rastlinami sorte Désirée. Razlike smo zaznavali z opazovanjem bolezenskih znamenj in z uporabo RT-qPCR.

Ugotovili smo, da pomanjkanje SA bistveno vpliva na povečano občutljivost za virusno okužbo, kar se odraža v pojavu tako lokalnih kot tudi sistemskih bolezenskih znamenj pri transgenih rastlinah NahG-Désirée v nasprotju z rastlinami sorte Désirée, pri kateri je SA preprečila razvoj bolezenskih znamenj. Poleg tega smo z RT-qPCR zaznali razlike v količini virusne RNA 11 in 18 dpi, ki so bile značilno večje pri neinokuliranih listih NahG-Désirée, iz česar smo sklepali, da SA vpliva tudi na upočasnjeno pomnoževanje virusa v zgornjih neinokuliranih listih v kasnejših točkah po inokulaciji, saj razlik pri 6 dpi še nismo zaznali. Ker se je virus tudi pri rastlinah sorte Désirée razširil v zgornje neinokulirane liste smo sklepali, da vsebnost SA ne preprečuje širjenja virusa po rastlini. Glede na dobljene rezultate tudi ne moremo predpostavljati, v kateri genotipski različici krompirja se virus uspe hitreje razširiti po rastlini.

Na osnovi opaženih bolezenskih znamenj pri NahG-Désirée smo potrdili dejstvo predhodnih raziskav, da je PVY N605 iz skupine N manj agresiven različek v primerjavi z PVY^{NTN}, saj so se bolezenska znamenja na inokuliranih listih razvila 3 dni in na neinokuliranih listih kar 10 dni kasneje. Se pa naši rezultati RT-qPCR niso skladali s predhodnimi raziskavami, kjer so poleg milejših bolezenskih znamenj pokazali tudi nižje koncentracije virusa PVY^N kot PVY^{NTN}. V našem primeru smo z dokazom virusne RNA 6 dpi pokazali, da se virus PVY N605 hitreje razširi v zgornje neinokulirane liste v primerjavi PVY^{NTN}.

Za primerjavo širjenja in pomnoževanja virusa PVY N605 pri Désirée in NahG-Désirée smo uporabili tudi virus označen z GFP (PVY N605-GFP) ter zaznavali njegovo fluorescenco s pomočjo fluorescentnega mikroskopa. Fluorescenco proteina GFP smo na inokuliranih listih pri obeh genotipskih različicah krompirja zaznali isti dan po inokulaciji, dva dni pred pojavom bolezenskih znamenj. Prav tako smo fluorescenco zaznali v zgornjih neinokuliranih listih NahG-Désirée 18 dpi, medtem ko pri rastlinah sorte Désirée le-te nismo zaznali. Sklepali smo, da je razlika nastala kot posledica premalo koncentriranega rastlinskega soka za inokulacijo.

Fluorescenco proteina GFP v neinokuliranih listih smo v primerjavi z zaznavo virusne RNA z RT-qPCR določili 12 dni kasneje, saj smo bili pri zaznavanju s fluorescenčnim mikroskopom omejeni na dejstvo, da se mora protein GFP sintetizirati v zadostni količini, da ga opazimo. Prav tako bi lahko sklepali, da se virusna RNA razširi v zgornje neinokulirane liste še preden se sestavi celoten virus.

Pri primerjavi PVY N605-GFP z neoznačenim virusom, smo pokazali, da v enakem času po inokulaciji na inokuliranih listih rastlin NahG-Désirée izzove podobno intenzivna bolezenska znamenja kot neoznačen virus PVY N605. Nekoliko večjo razliko smo opazili v deležu bolezenskih znamenj na neinokuliranih listih, kar je nakazovalo, da virusa nista popolnoma biološko primerljiva. Z uporabo RT-qPCR smo dokazali, da je število kopij virusne RNA 11 in 18 dpi pri neinokuliranih listih rastlin NahG-Désirée značilno večje v primeru inokulacije z neoznačenim virusom. To pomeni, da se označen virus PVY N605-GFP pomnožuje počasneje, medtem ko teh razlik pri rastlinah sorte Désirée nismo opazili. Ena od možnih razlag bi lahko bila, da se PVY N605-GFP v krompirju res počasneje pomnožuje ter da pride to do izraza le pri rastlinah NahG-Désirée, kjer se neoznačen virus hitreje pomnožuje kot pri rastlinah Désirée. Lahko, da rastline sorte Désirée enako močno zavirajo pomnoževanje označenega in neoznačenega virusa.

V zadnjem času so ugotovili, da imajo poleg hormonske regulacije, pomembno vlogo pri odgovoru na okužbe z virusi tudi nekodirajoče molekule miRNA, ki delujejo s post-transkripcijskim utišanjem genov, bodisi s katalizo cepitve tarčnih mRNA, bodisi z zaviranjem njihove translacije. Za kvantitativno analizo miRNA smo želeli vpeljati metodo RT-qPCR v dveh korakih. Znano je namreč, da lahko na rezultat razmerja v količini miRNA vpliva več parametrov kot so metoda izolacije in koncentracija RNA, ponovljivost obratnega prepisovanja in qPCR ter izbira referenčne RNA.

Na osnovi primerjanja 4 različnih načinov izolacije, smo ugotovili, da vsaka izmed njih različno vpliva na donos in kvaliteto RNA. Prav tako vse metode niso učinkovite pri izolaciji kratkih molekul, kot so miRNA. S primerjavo rezultatov razmerja v količini miRNA med izolacijo z reagentom TRIzol in kompletom »RNeasy Plant Mini Kit« smo pokazali, da vrsta izolacija ni bistveno vplivala na drugačno razmerje v količini miRNA

med vzorci okuženih in slepo inokuliranih rastlin. Kljub temu smo na podlagi najmanjše pristranskosti ter visokega izplena miRNA zaključili, da je za izolacijo miRNA najbolj primerna uporaba metode z reagentom TRIzol. Čeprav smo zaznali težave s prisotnostjo ostankov reagenta, ki so vplivali na slabo učinkovitost pomnoževanja, smo se tem učinkom izognili z uporabo bolj redčenih vzorcev.

Z uporabo različne koncentracije celokupne RNA smo pokazali, da le-ta vpliva tako na učinkovitost reakcije obratnega prepisovanja in posledično tudi na končno razmerje v količini miRNA med okuženimi in slepo inokuliranimi rastlinami, kar je poleg nivoja analizirane miRNA v veliki meri odvisno tudi od občutljivosti uporabljenega testa. Prav tako smo ugotovili, da so reakcije obratnega prepisovanja miRNA manj ponovljive v primerjavi z reakcijami obratnega prepisovanja snoU6 RNA in COX-mRNA. V nasprotju z obratnim prepisovanjem, smo za qPCR pokazali, da je precej bolj ponovljiva ter da razlike, ki jih pridobimo s ponavljanjem RT-qPCR izhajajo v največji meri iz reakcije obratnega prepisovanja miRNA.

Z vpeljano metodo smo analizirali količino petih miRNA pri rastlinah sorte Désirée in NahG-Désirée. Ugotovili smo, da se po okužbi z virusom PVY^{NTN} pri rastlinah Désirée poveča količina vsaj dveh analiziranih miRNA, in sicer miR168a in miR390b, saj smo povečanje zaznali pri obeh načinih normalizacije. Če upoštevamo rezultate normalizacije na COX-mRNA, potem lahko rečemo, da se poveča tudi količina miR172a. Pri rastlinah NahG-Désirée se količina nobene od analiziranih miRNA po okužbi z virusom ni spremenila. Rezultate log₂ razmerja količine miRNA smo primerjali z rezultati NGS, pri čemer smo ugotovili, da se rezultati niso skladali. Vsaka metoda namreč vnaša določeno pristranskost. Pri RT-qPCR smo zasledili težave s ponovljivostjo obratnega prepisovanja in z izbiro referenčne RNA, medtem ko je največ pristranskosti pri NGS vnesene med pripravo knjižnic cDNA. Ker je bila RNA vzorcev Désirée za določanje nukleotidnega zaporedja s platformo SOLiD prav tako izolirana z reagentom TRIzol, za katerega smo opazili, da ima zaviralen učinek na delovanje encimov, smo sklepali, da bi lahko le-ta vplival na rezultate NGS preko zmanjšane učinkovitosti delovanja ligaze, reverzne transkriptaze in polimeraze. Poleg tega je že veliko raziskovalcev opozorilo na slabe rezultate omenjene platforme, zato rezultatom RT-qPCR za vzorce rastlin Désirée bolj zaupamo. Naši rezultati kažejo, da vsebnost SA pri rastlinah Désirée vodi v povečano izražanje genov za miR168a, miR172a in miR390b, katere bi lahko poleg SA prispevale k vzpostavitvi tolerance na okužbo proti PVY^{NTN}. Razumevanje regulacije izražanja genov za miRNA ob virusnih okužbah pri odpornih rastlinah bi lahko prispevalo k razvoju bioloških označevalcev, ki kažejo na bolezensko stanje rastlin ali k uporabi tistih miRNA, ki se izkažejo kot ključne za odpornost rastline, kot del protivirusne strategije v za virus občutljive rastline.

8 VIRI

- Accerbi M., Schmidt S.A., De Poli E., Park S., Jeong D.H., Green J. 2010. Methods for isolation of total RNA to recover miRNAs and other small RNAs from diverse species. *Methods in Molecular Biology*, 592: 31-50
- Ach R.A., Wang H., Curry B. 2008. Measuring microRNAs: Comparisons of microarray and quantitative PCR measurements, and of different total RNA prep methods. *BMC Biotechnology*, 8: 69, doi: 10.1186/1472-6750-8-69: 16 str.
- Arends P., Kus M. 1999. Nasveti za pridelovanje krompirja v Sloveniji. Kranj, KŽK Kmetijstvo Kranj d.o.o.: 241 str.
- Baebler Š. 2006. Izražanje genov pri občutljivi in odporni sorti krompirja (*Solanum tuberosum* L.) v zgodnjem odzivu na okužbo s krompirjevim virusom Y^{NTN}. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 109 str.
- Baebler Š., Stare K., Kovač M., Blejec A., Prezelj N., Stare T., Kogovšek P., Pompe-Novak M., Rosahl S., Ravnikar M., Gruden K. 2011. Dynamics of responses incompatible potato-Potato virus Y interaction are modulated by salicylic acid. *PLoS ONE* 6, 12: e29009, doi: 10.1371/journal.pone.0029009: 12 str.
- Baebler Š., Witek K., Petek M., Stare K., Tušek-Žnidarič M., Pompe-Novak M., Renaut J., Szajko K., Strzelczyk-Zyta D., Marczewski W., Morgiewicz K., Gruden K., Hennig J. 2014. Salicylic acid is an indispensable component of the *Ny-1* resistance-gene mediated response against Potato virus Y infection in potato. *Journal of Experimental Botany*, 65, 4: 1095-1109
- Bazzini A.A., Manacorda C.A., Tohge T., Conti G., C. Rodrigues M., Nunes-Nesi A., Villanueva S., Fernie A.R. Carrari F., Asurmendi S. 2011. Metabolic and miRNA profiling of TMV infected plants reveals biphasic temporal changes, *PloS ONE*, 6, 12: e28466, doi: 10.1371/journal.pone.0028466: 14 str.
- Becker C., Hammerle-Fickinger A., Riedmaier I., Pfaffl M.W. 2010. mRNA and microRNA quality control for RT-qPCR analysis. *Methods*, 50: 237-243
- Benes V., Castoldi M. 2010. Expression profiling of microRNA using real-time quantitative PCR, how to use it and what is available. *Methods*, 50: 244-249
- Bustin S.A. 2002. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology*, 29: 23-39

- Bustin S.A., Benes V., Nolan T., Pfaffl M.W. 2005. Quantitative real-time RT-PCR a perspective. *Journal of Molecular Endocrinology*, 34, 3: 597-601
- Carrington J.C., Kasschau K.D., Mahajan S.K., Schaad M.C. 1996. Cell-to-cell and long-distance transport of viruses in plants. *Plant Cell*, 8: 1669-1681
- Chen C., Ridzon D.A., Broomer A.J., Zhou Z., Lee D.H, Nguyen J.T., Barbisin M., Xu N.L., Mahuvakar V.R., Andersen M.R., Lao K.Q., Livak K.J. Guegler K.J. 2005. Real-time quantification of micro RNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 33, 20: e179, doi: 10.1093/nar/gni178: 9 str.
- Chivasa S., Murphy A.M., Naylor M., Carr J.P. 1997. Salicylic acid interferes with tobacco mosaic virus replication via a novel salicylhydroxamic acid-sensitive mechanism. *Plant Cell*, 9, 4: 547-557
- Chomczynski P., Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162, 1: 156-159
- Cronje M.J., Weir I.E., Bornman L. 2004. Salicylic acid-mediated potentiation of Hsp70 induction correlates with reduced apoptosis in tobacco protoplasts. *Journal of the International Society for Advancement of Cytometry*, 61, 1: 76-87
- Dempsey D.A., Vlot A.C., Wildermuth M.C., Klessig D.F. 2011. Salicylic acid biosynthesis and metabolism. *Arabidopsis Book*, 9: e0156, doi: 10.1199/tab.0156: 24 str.
- Du P., Wu J., Zhang J., Zhao S., Zheng H., Gao G., Wei L., Li Y. 2011. Viral infection induces expression of novel phased microRNAs from conserved cellular microRNA precursors. *PloS Pathogens*, 7, 8: e1002176, doi: 10.1371/journal.ppat.1002176: 15 str.
- Feng J., Liu X., Ali L., Chen J. 2011. Spatio-temporal expression of miRNAs in tomato tissues upon *Cucumber mosaic virus* and *Tomato aspermy virus* infection. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 43, 4: 1-9
- Gilbertson, R.L., Lucas, W.J. 1996. How do viruses traffic on the 'vascular highway'?. *Trends in Plant Science*, 1: 260-268
- Gommans W.M., Berezikov E. 2012. Controlling miRNA regulation in disease. *Methods in Molecular Biology*, 822: 1-18

- Halim V.A., Eschen-Lippold L., Altman S., Birschwils M., Scheel D., Rosahl S. 2007. Salicylic acid is important for basal defense of *Solanum tuberosum* against *Phytophthora infestans*. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 20, 11: 1346-1352
- Heid C.A., Stevens J., Livak K.J., Williams P.M. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Methods*, 6: 986-994
- Hu W., Wang T., Xu J., Li H. 2014. MicroRNA mediates DNA methylation of target genes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 444: 676-681
- Hunter L.J.R., Westwood J.H., Heath G., Macaulay K., Smith A.G., MacFarlane A.A., Palukaitis P., Carr J.P. 2013. Regulation of RNA-dependent RNA polymerase 1 and isochorismate synthase gene expression in *Arabidopsis*. *PloS ONE*, 8, 6: e66530, doi: 10.1371/journal.pone.0066530: 10 str.
- Hurley J., Roberts D., Bond A., Keys D., Chen C. 2012. Stem-loop RT-qPCR for microRNA expression profiling. *Methods in Molecular Biology*, 822: 33-51
- Jones-Rhodes M.W., Bartel D.P., Bartel B. 2006. MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 57: 19-53
- Klein D. 2002. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends in Molecular Medicine*, 8, 6: 257-260.
- Knutsen E., Fiskaa T., Ursvik A., Jorgensen T.E., Perander M., Lund E., Morten Seternes O., Johansen S.D., Andreassen M. 2013. Performance comparison of digital microRNA profiling technologies applied on human breast cancer cell lines. *PLoS ONE* 8, 10: e75813, doi: 10.1371/journal.pone.0075813: 9 str.
- Kocjan Ačko D., Goljat A. 2005. Krompir. Ljubljana, Kmečki glas: 175 str.
- 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: 1-11
- Kogovšek P., Pompe-Novak M., Baebler Š., Rotter A., Gow L., Gruden K., Foster G.D., Boonham N., Ravnikar M. 2010. Aggressive and mild Potato virus Y isolates trigger different specific responses in susceptible potato plants. *Plant Pathology*, 59: 1121–1132

- Kogovšek P., Ravnikar M. 2013. Physiology of the potato–Potato virus Y interaction. *Progress in Botany*, 74: 1-31
- Kramer M.F. 2011. Stem-loop RT-qPCR for miRNAs. *Current Protocols in Molecular Biology*, 95: 15, 10: 1-22
- Krečič-Stres H., Vučak C., Ravnikar M., Kovač M. 2005. Systemic Potato virus Y^{NTN} infection and levels of salicylic and gentisic acids in different potato genotypes. *Plant Pathology*, 54, 4: 441-447
- Kulcheski F. R., Marcelino-Guimaraes F. C., Lima Nepomuceno A., Vilela Abdelnoor R., Margis R. 2010. The use of microRNAs as reference genes for quantitative polymerase chain reaction in soybean. *Analytical Biochemistry*, 406: 185-192
- Kumar D. 2014. Salicylic acid signaling in disease resistance. *Plant Science*, doi: 10.1016/j.plantsci.2014.04.014: 8 str. (v tisku)
- Kus M. 1994. Krompir. Ljubljana, ČZP Kmečki glas: 225 str.
- Li H., Deng Y., Wu T., Subramanian S., Yu O. 2010. Misexpression of miR482, miR1512, and miR1515 increases soybean nodulation. *Plant Physiology*, 153: 1759-1770
- Libus J., Štorchová H. 2006. Quantification of cDNA generated by reverse transcription of total RNA provides a simple alternative tool for quantitative RT-PCR normalization. *BioTechniques*, 41, 2: 156-164
- Life Technologies Corporation. 2007. MagMAX™-96 Total RNA isolation kit: Instruction manual. Carlsbad, Life Technologies Corporation: 24 str.
http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/fm_1830.pdf (10.6.2014)
- Life Technologies Corporation. 2011. TaqMan® Small RNA assays: Protocol. Carlsbad, Life Technologies Corporation: 27-27
https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/cms_042167.pdf (15.6.2014)
- Lilly S.T., Drummond R.S. M., Pearson M.N., MacDiarmid R.M. 2011. Identification and validation of reference genes for normalization of transcripts from virus-infected *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 24, 3: 294-304
- Lim Q.E., Zhou L., Ho Y.K., Wan G., Too H.P. 2011. snoU6 and 5S RNAs are not reliable miRNA reference genes in neuronal differentiation. *Neuroscience*, 199: 32-43

- Liu H., Tian X., Li Y., Wu C., Zheng C. 2008. Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. RNA Society, 14: 836-843
- Llave C. 2004. MicroRNAs: more than a role in plant development?. Molecular Plant Pathology, 5, 4: 361-366
- Longo M.C., Berninger M.S., Hartley J.L. 1990. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. Gene, 93, 1: 125-128
- Mallory A.C., Vaucheret H. 2006. Functions of microRNAs and related small RNAs in plants. Nature Genetics, 38: 31-36
- Mandadi K.K., Scholthof K.B.G. 2013. Plant immune responses against viruses: How does a virus cause disease?. Plant Cell, 25: 1489-1505
- Mas P., Pallas V. 1996. Long-distance movement of cherry leaf roll virus in infected tobacco plants. Journal of General Virology, 77, 3: 531-540
- Masotti A., Caputo V., Da Sacco L., Pizzuti A., Dallapiccola B., Botazzo G.F. 2009. Quantification of small non-coding RNAs allows an accurate comparison of miRNA Expression Profiles. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2009: ID 659028, doi: 10.1155/2009/659028: 9 str.
- Maule A., Leh V., Lederer C. 2002. The dialogue between viruses and hosts in compatible interactions. Current Opinion in Plant Biology, 5: 1-4
- Mehle N., Kovač M., Petrovič N., Pompe Novak M., Baebler Š., Krečič-Stres H., Gruden K., Ravnikar M. 2004. Spread of Potato virus Y^{NTN} in potato cultivars (*Solanum tuberosum* L.) with different levels of sensitivity. Physiological and Molecular Plant Pathology, 64: 293-300
- Mohorianu I., Schwach F., Jing R., Lopez-Gomollon S., Moxon S., Szittya G., Sorefan K., Moulton V., Dalmay T. 2011. Profiling of short RNAs during fleshy fruit development reveals stage-specific sRNAome expression patterns. The Plant Journal, 67: 232-246
- Mraz M., Malinova K., Mayer J., Pospisilova S. 2009. MicroRNA isolation and stability in stored RNA samples. Biochemical and Biophysical Research Communications, 390: 1-4
- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15: 473-497

- Nagvi A. R., Haq Q. M.R., Mukherjee S.K. 2010. MicroRNA profiling of tomato leaf curl new delhivirus (tolcndv) infected tomato leaves indicates that deregulation of mir159/319 and mir172 might be linked with leaf curl disease. *Virology Journal*, 7, 281: 1-16
- Navarre D.A., Mayo D. 2004. Differential characteristics of salicylic acid-mediated signaling in potato. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 64: 179-188
- Nie B., Singh M., Murphy A., Sullivan A., Xie C., Nie X. 2012. Response of potato cultivars to five isolates belonging to four strains of Potato virus Y. *Plant Disease*, 96, 10: 1422-1429
- Nolan T., Hugget J., Sanchez E. 2013. Good practice guide for the application of quantitative PCR (qPCR). Teddington, LGC: 44-44
- Pacheco R., García-Marcos A., Barajas D., Martiánez, Tenllado F. 2012. PVX-potyvirus synergistic infections differentially alter microRNA accumulation in *Nicotiana benthamiana*. *Virus Research*, 165: 231-235
- Pérez-Quintero A.L., Neme R., Zapata A., López C. 2010. Plant microRNAs and their role in defense against viruses: a bioinformatic approach. *BMC Plant Biology*, 10: 138, doi: 10.1186/1471-2229-10-138: 12 str.
- Podolska A., Kaczkowski B., Litman T., Fredholm M., Cirera S. 2011. How the RNA isolation method can affect microRNA microarray results. *Acta Biochimica Polonica*, 58, 4: 535-540
- Pritchard C.C., Cheng H.H., Tewari M. 2012. MicroRNA profiling approaches and considerations. *Nature Reviews*, 13: 358-368
- Redshaw N., Wilkes T., Whale A., Cowen S., Huggett J., Foy C.A. 2013. A comparison of miRNA isolation and RT-qPCR technologies and their effects on quantification accuracy and repeatability. *BioTechniques*, 54: 155-164
- Revers F., Le Gall O., Candresse T., Maule A. J. 1999. New advances in understanding the molecular biology of plant/potyvirus interaction. *Molecular Biology of Plant-Pathogen Interactions*, 12, 5: 367-376
- Roche Diagnostics GmbH. 2008. LightCycler® 480 Instrument: Operator's manual. Mannheim, Roche Diagnostics GmbH: 394 str.

http://icob.sinica.edu.tw/pubweb/bio-chem/Core%20Facilities/Data/R401-core/LightCycler480%20II_Manual_V1.5.pdf (10.5.2014)

- Ruiz-Ferrer V., Voinnet O. 2009. Roles of plant small RNAs in biotic stress responses. *Annual Review of Plant Biology*, 60: 485-510
- Rupar M. 2014. Lokalizacija in sledenje krompirjevega virusa Y v rastlinah krompirja (*Solanum tuberosum* L.). Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 69-73
- Shah J. 2009. Plants under attack: systemic signals in defence. *Current Opinion in Plant Biology*, 12: 459-464
- Simón-Mateo C., García J.A. 2006. MicroRNA-guided processing impairs Plum pox virus replication, but the virus readily evolves to escape this silencing mechanism. *Journal of Virology*, 89, 5: 2429-2436
- Singh D.P., Moore C.A., Gilliland A., Carr J.P. 2004. Activation of multiple antiviral defence mechanisms by salicylic acid. *Molecular Plant Pathology*, 5, 1: 57-63
- Singh R.P., Valkonen J.P.T., Gray S.M., Boonham N., Jones R.A.C., Kerlan C., Schubert J. 2008. The naming of Potato virus Y strains infecting potato. *Archives of Virology*, 153: 1-13
- Ståhlberg A., Hakansson J., Xian X., Semb H., Kubista M. 2004. Properties of the reverse transcription reaction in mRNA quantification. *Clinical Chemistry*, 50, 3: 509-515
- Sochor J., Babula P., Adam V., Krska B., Kizek R. 2012. Sharka: The past, the present and the future. *Viruses*, 4: 2853-2901
- Swift G. H., Peyton M., MacDonald R. 2000. Assessment of RNA quality by semi-quantitative RT-PCR of multiple regions of a long ubiquitous mRNA. *BioTechniques*, 28: 524-531
- Swiss Institute of Bioinformatics. 2011. ViralZone: Potyvirus. Lausanne, Swiss Institute of Bioinformatics: 1 str.
http://viralzone.expasy.org/all_by_species/50.html (2.9.2014)
- Talarczyk A., Hennig J. 2001. Early defence responses in plants infected with pathogenic organisms. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 6, 4: 955-970

- Thermo Fisher Scientific. 2008. NanoDrop 1000 Spectrophotometer 3.7: User's manual. Wilmington, Thermo Fisher Scientific: 105 str.
<http://www.NanoDrop.com/library/nd-1000-v3.7-users-manual-8.5x11.pdf>
(3.7.2014)
- Thermo Fisher Scientific. 2012. Interpretation of nucleic acid 260/280 ratios. Wilmington, Thermo Fisher Scientific: 1 str.
<http://www.NanoDrop.com/Library/T123-NanoDrop-Lite-Interpretation-of-Nucleic-Acid-260-280-Ratios.pdf> (15.6.2014)
- Urcuqui-Inchima S., Haenni A.L., Bernardi F. 2001. Potyvirus proteins: a wealth of functions. *Virus Research*, 74: 157-175
- USDA, ARS & Department of Plant Pathology. 2014. Managing Potato virus Y in seed potato production: PVY symptoms on yukon gem. Ithaca, USDA, ARS & Department of Plant Pathology: 1 str.
http://www.potatovirus.com/index.cfm/gallery.page/Yukon_Gem.htm (10.7.2014)
- Valasek M.A., Repa J.J. 2005. The power of real-time PCR. *Advances in Physiology Education*, 29: 151-159
- Veluchamy Remesh S., Ratnaparkhe M.B., Kumawat G., Kumar Gupta G., Husain S.M. 2014. Plant miRNAome and antiviral resistance: a retrospective view and prospective challenges. *Virus Genes*, 48, 1: 1-14
- Vijayapalani P., Maeshima M., Nagasaki-Takekuchi N., Miller W.A. 2012. Interaction of the trans-frame potyvirus protein P3N-PIPO with host protein PcaP1 facilitates potyvirus movement. *PloS Pathogens*, 8, 4: e1002639, doi: 10.1371/journal.ppat.1002639: 15 str.
- Vlot A.C., Dempsey D.A., Klessig D.F. 2009. Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual Review of Phytopathology*, 47: 177-206
- Wang M.B., Masuta C., Smith N.A., Shimura H. 2012. RNA silencing and plant viral diseases. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 25, 10: 1275-1285
- Wang W.X., Wilfred B.R., Baldwin D.A., Isett R.B., Ren N. Stromberg A., Nelson P.T. 2008. Focus on RNA isolation: Obtaining RNA for microRNA (miRNA) expression profiling analyses of neural tissue. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1779: 749-757

- Warren M., Krüger K., Shoeman A.S. 2005. Potato virus Y (PVY) and Potato leafroll virus (PLRV): Literature review for potatoes South Africa. Pretoria, University of Pretoria: 32 str.
http://www.potatoes.co.za/SiteResources/documents/5%20PVY_PLRV_Review.pdf
(19.6.2014)
- 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
- White R.F. 1979. Acetylsalicylic acid (aspirin) induces resistance to tobacco mosaic virus in tobacco. Virology, 99: 410–412
- Wieczorek P., Wrzesinska B., Obrepalska-Stepłowska A. 2013. Assessment of reference gene stability influenced by extremely divergent disease symptoms in *Solanum lycopersicum* L. Journal of Virological Methods, 194: 161-168
- Wong M. L., Medrano J.F. 2005. Real-time PCR for mRNA quantification. BioTechniques, 39, 1: 75-85
- Zhu Q.H., Fan L., Liu Y., Xu H., Llewellyn D., Wilson I. 2013. miR482 regulation of *NBS-LRR* defence genes during fungal pathogen infection in cotton. PLoS ONE, 8, 12: e84390, doi: 10.1371/journal.pone.0084390: 11 str.

ZAHVALA

Najprej bi se rada najlepše zahvalila prof. dr. Kristini Gruden, za možnost opravljanja raziskovalnega dela na Nacionalnem inštitutu za biologijo, za prijaznost, vse nove in nasvete ter pregled magistrske naloge.

Prav tako se najlepše zahvaljujem doc. dr. Blagajani Herzog Velikonja za sprejeto mentorstvo in pregled magistrske naloge.

Zahvaljujem se tudi recenzentki doc. dr. Mojca Viršček Marn ter predsednici komisije prof. dr. Darji Žgur Bertok za pregled magistrske naloge.

Še posebej se zahvaljujem dr. Špeli Baebler, ki me je uvedla v laboratorijsko delo, za vso njeno pomoč pri izvedbi poskusov, vse praktične nasvete, usmerjanje, spodbudo in za ves njen čas, ki mi ga je namenila med raziskovalnim delom.

Posebno hvaležna sem tudi dr. Matevžu Ruparju za pomoč pri delu ter nasvete.

Zahvala gre tudi vsem ostalim zaposlenim z Oddelka za biotehnologijo in sistemsko biologijo Nacionalnega inštituta za biologijo za prijetno vzdušje, spodbudne besede, prijaznost in ker so mi bili vedno pripravljeni priskočiti na pomoč.

Na koncu bi se rada zahvalila vsem bližnjim za vso njihovo brezmejno pomoč in razumevanje. Iskrena hvala staršem za lepa študijska leta, ki sta mi jih omogočila in vso moralno podporo tekom nastajanja magistrske naloge. Prav posebna zahvala pa gre Davorinu, ki me je vseskozi podpiral, spodbujal in mi stal ob strani.

PRILOGE

Priloga A: Rastlinski material, ki smo ga uporabili za preučevanje širjenja in pomnoževanja PVY N605 in PVY N605-GFP v RT-qPCR v enem koraku

Genotipska različica krompirja	Genotipska različica virusa	Dan po inokulaciji	Št. rastline	Št. zgornjega neinokuliranega lista
Désirée	PVY N605	6	1	1
Désirée	PVY N605	6	1	2
Désirée	PVY N605	6	2	1
Désirée	PVY N605	6	2	2
Désirée	PVY N605-GFP	6	1	1
Désirée	PVY N605-GFP	6	2	2
Désirée	PVY N605-GFP	6	1	1
Désirée	PVY N605-GFP	6	2	2
NahG-Désirée	PVY N605	6	1	1
NahG-Désirée	PVY N605	6	1	2
NahG-Désirée	PVY N605	6	2	1
NahG-Désirée	PVY N605	6	2	2
NahG-Désirée	PVY N605-GFP	6	1	1
NahG-Désirée	PVY N605-GFP	6	2	2
NahG-Désirée	PVY N605-GFP	6	1	1
NahG-Désirée	PVY N605-GFP	6	2	2
Désirée	PVY N605	11	1	1
Désirée	PVY N605	11	1	2
Désirée	PVY N605	11	1	3
Désirée	PVY N605	11	2	1
Désirée	PVY N605	11	2	2
Désirée	PVY N605	11	2	3
Désirée	PVY N605-GFP	11	1	1
Désirée	PVY N605-GFP	11	1	2
Désirée	PVY N605-GFP	11	1	3
Désirée	PVY N605-GFP	11	2	1
Désirée	PVY N605-GFP	11	2	2
Désirée	PVY N605-GFP	11	2	3
NahG-Désirée	PVY N605-GFP	11	1	1
NahG-Désirée	PVY N605-GFP	11	1	2
NahG-Désirée	PVY N605-GFP	11	1	3
NahG-Désirée	PVY N605-GFP	11	2	1
NahG-Désirée	PVY N605	11	2	2
NahG-Désirée	PVY N605	11	2	3
NahG-Désirée	PVY N605-GFP	11	1	1
NahG-Désirée	PVY N605-GFP	11	1	2
NahG-Désirée	PVY N605-GFP	11	1	3
NahG-Désirée	PVY N605-GFP	11	2	1
NahG-Désirée	PVY N605-GFP	11	2	2
NahG-Désirée	PVY N605-GFP	11	2	3
Désirée	PVY N605	18	1	1

»se nadaljuje«

»nadaljevanje priloge A: Rastlinski material, ki smo ga uporabili za preučevanje širjenja in pomnoževanja PVY N605 in PVY N605-GFP v RT-qPCR v enem koraku

Genotipska različica krompirja	Genotipska različica virusa	Dan po inokulaciji	Št. rastline	Št. zgornjega neinokuliranega lista
Désirée	PVY N605	18	1	2
Désirée	PVY N605	18	2	1
Désirée	PVY N605	18	2	2
Désirée	PVY N605-GFP	18	1	1
Désirée	PVY N605-GFP	18	2	2
Désirée	PVY N605-GFP	18	1	1
Désirée	PVY N605-GFP	18	2	2
NahG-Désirée	PVY N605	18	1	1
NahG-Désirée	PVY N605	18	1	2
NahG-Désirée	PVY N605	18	2	1
NahG-Désirée	PVY N605	18	2	2
NahG-Désirée	PVY N605-GFP	18	1	1
NahG-Désirée	PVY N605-GFP	18	2	2
NahG-Désirée	PVY N605-GFP	18	1	1
NahG-Désirée	PVY N605-GFP	18	2	2