

Funksjonelle studier av to antatte
peptid-ligander tilhørende IDA-RELATED
PEPTIDE-familien i *Arabidopsis thaliana*
(vårskrinneblom)

Rannveig Viste

Bioteknologi (5 årig)

Innlevert: juni 2013

Hovedveileder: Atle M. Bones, IBI

Medveileder: Tore Brembu, IBT
Javad Najafi, IBT

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Institutt for biologi

TAKK

TAKK

Først vil jeg takke min veileder Atle M. Bones som gav meg muligheten til å gjennomføre en masteroppgave i gruppen for Celle- og molekylærbiologi (CMB). Spesielt vil jeg takke for inspirerende dialog og evne til å vise retning i et fagfelt som er overveldende stort.

Videre vil jeg takke mine medveiledere Tore Brembu og Javad Najafi for å ha blitt introdusert for noen av biologiens utallige irrganger, for så ved hjelp av gode tilbakemeldinger og oppmuntrende, alltid støttende kommentarer bli ledet gjennom de mange vanskelighetene.

Jeg vil også takke de øvrige medlemmer av CMB-gruppen, spesielt Per Winge som har øst over meg fra sin enorme kunnskapsmengde, Ane Kjersti Vie for gode innspill i forhold til de gjennomførte eksperimentene og Torfinn Sparstad for teknisk hjelp og alltid lune kommentarer.

Til mine medstudenter og «masterfelleskapet på lesesalen» går en stor takk for inspirasjon og støtte, mange fruktbare diskusjoner og utallige matpauser.

Helt til slutt vil jeg takke min kjære Trygve. Med din oppmuntring fikk jeg impulsene som gjorde det lettere for meg å gjennomføre oppgaven.

Trondheim, 16. juni 2013

Rannveig Viste

SAMMENDRAG

Små sekreerte peptider har vist seg å spille en viktig rolle i plantenes signalisering. Responser nedstrøms for peptidsignalisering inngår i et komplekst reguleringsnettverk som karakteriseres av kryss-signalisering mellom ulike spor. Plantens evne til å regulere nettverkene gjør den i stand til endre genuttrykk i respons på ytre og indre påvirkninger, for på best mulig måte å sikre utvikling, vekst og forsvar.

IDA RELATED PEPTIDE (IRP)1 og IRP9, to antatte sekreerte peptider tilhører sammen med IRP10 den utvidede *INFLORESCENCE DEFICIENT IN ABSCISSION (IDA)*-genfamilien. På grunn av likheter på proteinnivå antas IRP9 å ha en overflødighetsfunksjon med IRP10 i signalspor. Funksjonene til de antatte peptidene IRP1 og IRP9 ble studert i knockout-, RNAi-, dobbelmutant- og overuttrykkslinjer under ulike abiotiske og biotiske betingelser.

Etter behandling med UV-B stråling økte genuttrykkene av *IRP1* og *IRP9* betydelig, og en mulig overflødighetsfunksjon mellom IRP1 og IRP10 ble påvist.

Ved transkripsjonsanalyser av linjer med overuttrykk av *IRP1* ble det vist reduksjon i uttrykket av tre gener i *JASMONATE ZIM-DOMAIN (JAZ)*-familien og en økning i transkripsjon av det jasmonat (JA)-induserte genet *PLANT DEFENSIN1.2*. Videre viste en *IRP1*-RNAi linje økt motstand mot det bakterielle patogenet *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, hvilket kan bety at peptidet i tillegg til en funksjon i JA-signalisering har en funksjon som signalmolekyl for en negativ regulator av salisylsignalisering.

ABSTRACT

Small secreted peptides have been shown to play an important role in cell-to-cell signaling in plants. Responses downstream of peptide signaling are parts of a complex regulatory network that is characterized by cross-signaling between different pathways. These regulatory networks make plants capable of modifying gene expression in response to internal and external influences, in order to ensure the development, growth and defense.

IDA RELATED PEPTIDE (IRP)1 and IRP9 are two putatively secreted peptides belonging to the extended INFLORESCENCE DEFICIENT IN ABSCISSION (IDA) family. The peptide IRP9 is assumed to be redundant to IRP10 due to high similarity on protein level. Knockout, RNAi, double mutant, and overexpression lines of *IRP1* and *IRP9* were studied under various abiotic and biotic conditions.

After treatment with UV-B radiation, increased gene expression of *IRP1* and *IRP9* was observed and a possible redundancy between IRP1 and IRP10 detected.

During RT-qPCR analysis of *IRP1* overexpression lines increased gene expression of three genes in *JASMONATE ZIM-DOMAIN*-family was observed. An increase in *PLANT DEFENSIN1.2* was also observed. *IRP1*-RNAi lines showed increased resistance to the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, which suggests that the peptide has a role both in jasmonate signaling and also is a signal molecule for a negative regulator in salicylic acid-pathways.

INNHALDSFORTEGNELSE

TAKK.....	i
SAMMENDRAG	iii
ABSTRACT	v
FORKORTELSER	ix
1. INTRODUKSJON	1
1.1 <i>Arabidopsis thaliana</i>	1
1.2 Plantenes basale immunforsvar	2
1.3 Signaloverføring ved MAPK-kaskader	8
1.4 Jasmonat og gener i plantens basale immunforsvar	10
1.5 Små sekresjonspeptider med signalfunksjon	14
1.6 Oppgavens mål	17
2. MATERIALER OG METODE.....	19
2.1 Dyrkning av planter – standard betingelser	19
2.2 Arbeid med RNA	20
2.3 RT-qPCR	24
2.4 Arbeid med DNA.....	30
2.5 Kryssing og verifisering av transformerte linjer.....	33
2.6 Transkripsjonsanalyser av gener i immunforsvaret.....	36
2.7 Abiotisk stress.....	37
2.8 Biotisk stress.....	38
2.9 Analyser av data	40
3 RESULTATER	43
3.1. Genotyping og verifisering av linjer til bruk i forsøk.....	43

INNHALDSFORTEGNELSE

3.2	Transkripsjonsanalyser av ulike målgener i basalt immunforsvar	46
3.3.	Transkripsjonsanalyser etter UV-B stråling	47
3.4.	Intercellulær vekst av <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000.....	50
3.5.	Effekt på rotvekst ved Flg22-peptid tilsatt vekstmedia	53
4	DISKUSJON	57
4.1	Generering av dobbelmutant- og overuttrykkslinjer	57
4.2	Forskjeller i genuttrykk for planter sprayet med IRP-peptid og ubehandlede overuttrykkslinjer	58
4.3	Ekspresjonsanalyser i planter behandlet med UV-B stråling	62
4.4	To ulike tilnærminger til biotiske interaksjoner	64
4.5	De benyttede transgene linjene i oppgaven gav ulike resultater.....	66
4.6	Forslag til videre arbeid	66
5	KONKLUSJON	68
	REFERANSER	69
	VEDLEGG	74

FORKORTELSER

ACS4	1-AMINOCYCLOPROPANE-1-CARBOXYLATE SYNTHASE 4
35S-promoter	Overuttrykkspromoter fra Cauliflower Mosaic Virus
<i>A. brassicicola</i>	<i>Alternaria brassicicola</i>
Avr	Antivirulente proteiner
<i>B. cinerea</i>	<i>Botrytis cinerea</i>
BAK1	BRASSINOSTEROID INSENSITIVE1-ASSOCIATED RECEPTOR KINASE1
BAR	BIALAPHOS RESISTANCE
bp	Basepar
BP/KNAT1	BREVIPEDICELLUS/KNOTTED-LIKE FROM ARABIDOPSIS THALIANA1
CaMV	Cauliflower mosaic virus
CFU	Kolonidannende enheter
COI1	CORONATINE INSENSITIVE1
COP1	CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENIC1
COR	Coronatine
Cq	Kvantifiseringssyklus
CYP	Cytokrom P450
CYP71A13	CYTOCHROME P450, FAMILY 71, SUBFAMILY A, POLYPEPTIDE13
CYP83B1	CYTOCHROME P450, FAMILY 83, SUBFAMILY B, POLYPEPTIDE1
ETI	Effektortrigget immunitet
Flg22	Syntetisk derivert flagellin
FLS2	FLAGELLIN-SENSITIVE2
HR	Hypersensitiv respons
HY5	ELONGATED HYPOCOTYL5
HYH	HY5 HOMOLOG
Hz	Herzt
IDA	INFLORESCENCE DEFICIENT IN ABSCISSION
IRP1	IDA RELATED PEPTIDE1
IRP10	IDA RELATED PEPTIDE10
IRP9	IDA RELATED PEPTIDE9
JA	Jasmonat
JAI3	JASMONATE INSENSITIVE3
JA-Ile	Jasmonat-Isoleucin
JAZ	JASMONATE ZIM DOMAIN
JAZ1	JASMONATE-ZIM-DOMAIN PROTEIN1
JAZ3	JASMONATE -INSENSITIVE3
KAPP	KINASE ASSOCIATED PROTEIN PHOSPHATASE
KNAT2	KNOTTED-LIKE FROM ARABIDOPSIS THALIANA2
KNAT6	KNOTTED-LIKE FROM ARABIDOPSIS THALIANA6
LRR	Leucinrike repetisjoner
MAMP	Mikrobeassosierte molekylære mønstre

FORKORTELSER

MAPK	Mitogenaktivert protein kinase
MeJA	Metyl-jasmonat
MYB51	MYB DOMAIN PROTEIN 51
NB-LRR	Nukleotidbindende leucinrike repetisjoner
OPDA	12-oxo-phytodienoic syre
<i>P. syringae</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>
PAD3	PHYTOALEXIN DEFICIENT3
PR	PATHOGENESIS-RELATED
PRR	Mønstergjennkjennende reseptorer
<i>Pst</i> DC3000	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000
PTI	Mønstertrigget immunitet
R	Resistensgen
RLK	Reseptorlignende kinaser
ROS	Reaktive oksygenforbindelser
RPM	runder per minutt
SA	Salisylsyre
SAR	Systemisk oppnådd motstand
SCF	Skp1/Cullin/F-boks
TTSS	Type III protein sekresjonssystem
UVR8	UV RESISTANCE LOCUS8
vt	Villtype

1 INTRODUKSJON

1.1 *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis thaliana (vårskrinneblom) (Figur 1.1.1) tilhører slekten *Arabidopsis* (skrinneblomslekten) og er sammen med matplanter fra slektene *Brassica* (kålslekten) og *A Armoracia* (pepperrotslekten) medlem av familien *Brassicaceae*, korsblomstfamilien. *Arabidopsis thaliana* (heretter kalt *Arabidopsis*) er av liten agronomisk betydning, men har utviklet seg til å bli en viktig modellplante som benyttes til grunnleggende forskning innenfor områdene biokjemi, genetik og molekylærbiologi. Planten er diploid, består av omtrent 130×10^6 basepar (Mbp) fordelt på fem kromosomer. Det foreligger gode genetiske og fysiske kart over alle fem kromosomparene.



Figur 1.1.1. *Arabidopsis thaliana*. Bildet er av en villtype plante med Col-0 bakgrunn. Planten er 31 dager gammel og har blitt dyrket under standard betingelser. Bildet er tatt av kandidaten.

INTRODUKSJON

Planten har kort generasjonstid. Det tar omtrent seks uker fra frøene spirer til planten er moden. Den er lett å dyrke på begrenset plass, er liten av størrelse og setter et stort antall frø ved selvbestøving (Weigel og Glazebrook, 2002). Disse egenskapene, sammen med at den er lett å transformere ved hjelp av *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*)-mediert transformasjon (Clough og Bent, 1998), gjør *Arabidopsis* nyttig i genetiske studier.

1.2 Plantenes basale immunforsvar

Planter er stedfaste og utsettes kontinuerlig for faktorer fra det ytre miljøet som kan være stressende eller skadelige for plantens utvikling og vekst. Det kan være biotiske stressfaktorer forårsaket av mikroorganismer som bakterier eller sopp, men det kan også være abiotiske faktorer som fysisk skade, kulde, varme, vannoverskudd, tørke, salt, osmotisk sjokk, ultrafiolett (UV) stråling, ozon eller tungmetallforgiftning. For å kunne tilpasse seg de varierende omgivelsene må plantecellene ha et mottaksapparat eller spesifikke reseptorer som registrerer miljøsignalene, og signalet må føres gjennom cellen og resultere i en hensiktsmessig respons.

I de følgende avsnittene vil det gjøres rede for abiotisk og biotisk stress og dets innvirkning på plantene. I avsnittet om abiotisk stress er det fokus på UV-B stråling. Avsnittet om biotisk stress gjør rede for plantens basale immunforsvar ved angrep fra patogener, og den vekselvirkningen som skjer mellom patogener og plante. Deretter fokuseres det nærmere på molekylære aspekt ved en infeksjon med det bakterielle patogenet *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000.

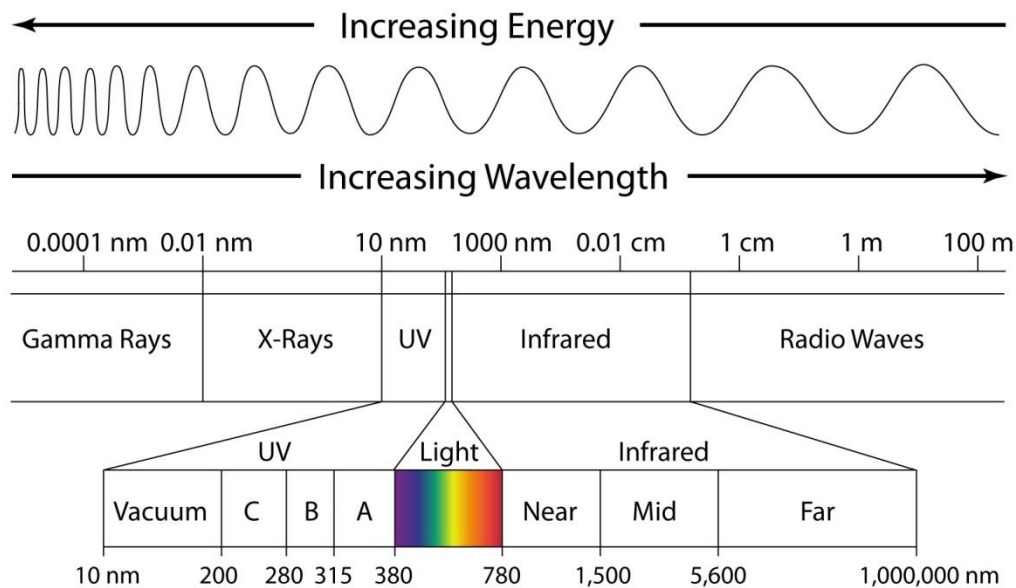
UV-B stråling

Planter blir kontinuerlig utsatt for elektromagnetisk stråling fra solen. Til forskjell fra dyr utgjør lyssignaler i planter viktige stimuli som er nødvendige for induksjon av utviklingsmessige morfologiske prosesser, som for eksempel spiring og utvikling av blomsterorganer (Taiz og Zeiger, 2010). Strålingen kan også være av en slik karakter at den ledsages av DNA-skade og muligens cellenekrose.

Den elektromagnetiske strålingen fra solen (Figur 1.2.1) som påvirker plantene omfatter synlig lys (bølgelengdene 380 nm - 780 nm) og deler av UV-spekteret (10 nm - 380 nm) (Ulm et al., 2004).

INTRODUKSJON

UV-stråling har kortere bølgelengde enn synlig lys, og er i det elektromagnetiske spekteret å finne mellom røntgenstråler og synlig lys. UV-stråling deles inn i tre klasser: UV-A stråling er nærmest synlig lys og omfatter bølgelengdene 315-380 nm, UV-B stråling omfatter bølgelengdene 280-315 nm og UV-C stråling bølgelengdene 200-280 nm (Stapleton, 1992). Strålingen fra solen som passerer gjennom atmosfæren til jorden er i UV-A og deler av UV-B spekteret. Den resterende strålingen blir absorbert av atmosfærens ozonlag (Ulm et al., 2004).



Figur 1.2.1. Det elektromagnetiske spekteret. Figuren viser beliggenheten av UV-strålingen i det elektromagnetiske spekteret mellom røntgenstråler og synlig lys. UV-A og UV-B stråling er nærmest synlig lys. Det framkommer også fra figuren hvordan strålingens energi øker omvendt proporsjonalt til bølgelengden. Figuren er hentet fra Ayer (2013).

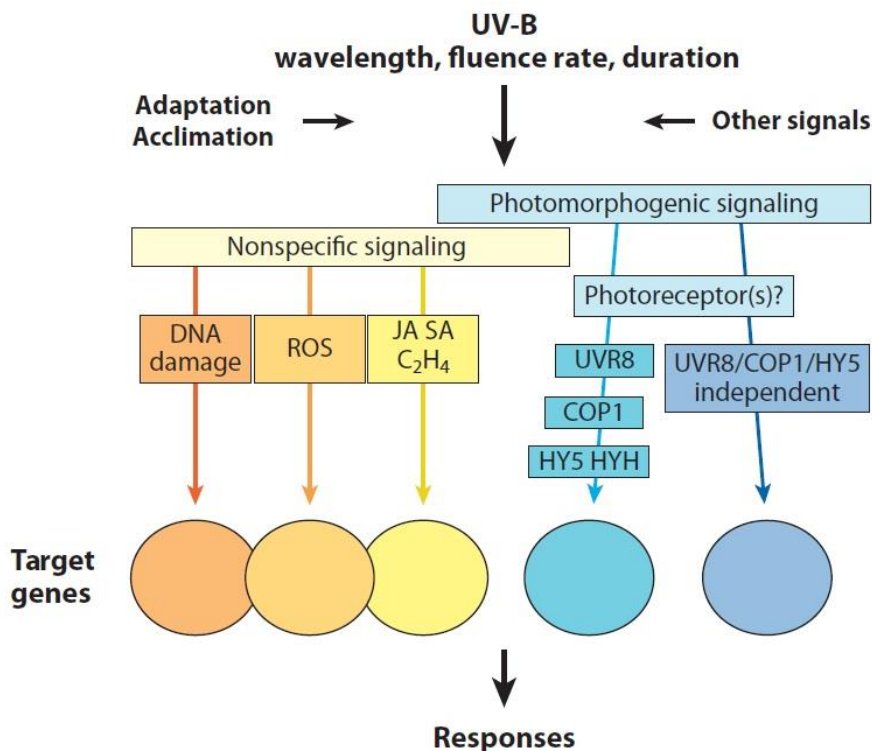
Effekten av UV-B strålingen på plantene avhenger av innstrålingstetthet, strålingens bølgelengde og varigheten av strålingen. Innstrålingstetthet (I) uttrykkes i watt (W), typisk som: $I = W m^{-2}$ eller innstrålingstetthet per døgn uttrykt i joule (J): $I = kJ m^{-2} d^{-1}$ (Heijde og Ulm, 2012).

Begrepet foton-flukstetthet benyttes også om stråling. Det er et kvantitativt mål angitt som antall mol fotoner som treffer et gitt areal per sekund, uttrykt som $\mu mol fotoner m^{-2} s^{-1}$ (Heijde og Ulm, 2012). Omregning fra innstrålingstetthet til flukstetthet er vist i Vedlegg A.9.

Generelt vil et signal overføres gjennom cellen ved hjelp av et signal-transduksjonsspor og ledsages av en respons. Figur 1.2.2 viser en klassifisering av sammenhengene mellom

INTRODUKSJON

signaltransduksjon og respons som tar utgangspunkt i at ulike innstrålingstetthet inducerer ulike spor. En klassifisering vil aldri være nøyaktig fordi energimengden som inducerer de ulike sporene er forskjellig fra plante til plante både fordi det er overlapp mellom sporene, og fordi plantene kan være adaptert til ulike verdier av UV-B stråling og dermed ha varierende respons (Jenkins, 2009). Ved å benytte denne tilnærmingen er det likevel mulig å belyse de fundamentale forskjellene i plantens respons på strålingen.



Figur 1.2.2. Signaltransduksjonsspor involvert i UV-B-respons. Klassifisering av plantens respons på UV-B stråling basert på bølglengde, innstrålingstetthet og varighet av strålingen. Forskjeller i strålingen inducerer ulike sett av spesifikke gener. UV-B stråling med lav innstrålingstetthet aktiverer fotoreseptoren UVR8. Signalsporet nedstrøms for UVR8 inkluderer COP1 og HY5/HYH. Ved induksjon av signalsporet utløses en morfologisk respons. En stråling som har høyere innstrålingstetthet antas å bli registrert av en uspesifikk signalkjede som også aktiveres ved skade og i stressituasjoner. I tillegg kan det tenkes at det finnes reseptorer som ikke er beskrevet enda. COP1, CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENIC1; HY5, ELONGATED HYPOCOTYL5; HYH, HY5 HOMOLOG; ROS, reaktive oksygenforbindelser; JA, jasmonat; SA, salisylsyre; UVR8, UV RESISTANCE LOCUS8. Figuren er hentet fra Jenkins (2009).

I litteraturen omtales «høy» og «lav» innstrålingstetthet, uten at det gis mål på hva som er høy og lav dose. Forskjellene skyldes hvilken effekt strålingen utøver på planten. Lav stråling blir omtalt som positivt for plantene idet utviklingsmessige prosesser blir stimulert, mens høy stråling kan ledsages av negativt stress (Hideg et al., 2013).

INTRODUKSJON

For UV-B stråling med lang bølgelengde og lav innstrålingstetthet er det vist at signaltransduksjon i stor grad medieres av reseptoren UVR8 (Rizzini et al., 2011), E3 ubiquitin ligasen CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENIC1 (COP1) og transkripsjonsfaktorene ELONGATED HYPOCOTYL5 (HY5) og HY5-HOMOLOG (HYH). Målgene for signalkjeden medierer fotomorfogene responser som den utviklingsmessige overgangen fra spirers vekst i mørket til vekst i lys. Stråling med lav flukstetthet ledsages også av økt genuttrykk for gener som er involvert i UV-beskyttelse (Ulm et al., 2004; Ulm og Nagy, 2005; Brown og Jenkins, 2008).

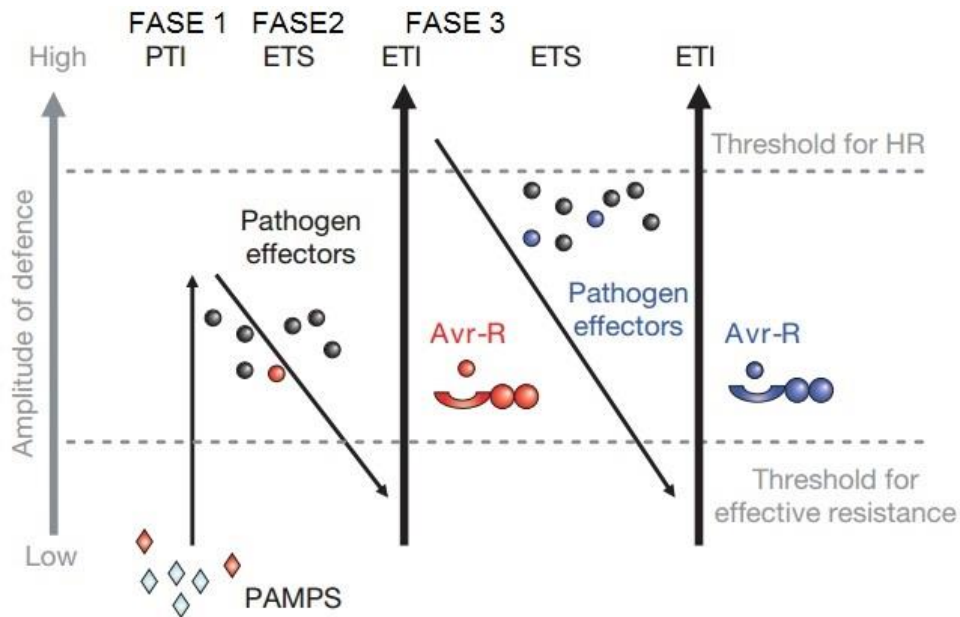
Det er ikke identifisert reseptorer for UV-B med høy innstrålingstetthet og kort bølgelengde. Høy innstrålingstetthet og kort bølgelengde ledsages av produksjon av reaktive oksygenforbindelser (ROS, fra engelsk: «Reactive oxygen species»), og skade i cellulære mekanismer som DNA replikasjon. Denne typen UV-B stråling induserer flere av sporene som inngår i forsvarsreaksjoner etter skader, og som medieres av plantehormonene. Generelt vil gener som blir uttrykt i stressrespons bli transkribert. Det støtter at responsen medieres gjennom uspesifikke signalveier som også aktiveres ved andre former for stress (Jenkins, 2009).

Biotisk stressrespons

Plantepatogener benytter ulike strategier for å få tilgang til plantenes reservoar av næringsrike molekyler. Planter mangler mobile immunceller og adaptivt immunforsvar slik som pattedyrene har. I stedet er plantene avhengig av de enkelte cellenes evne til å gjenkjenne molekyler fra patogenene og aktivering av lokal eller systemisk signalisering fra de infiserte cellene (Boller og Felix, 2009).

Figur 1.4 viser en modell etter Jones og Dangl (2006) som beskriver hvordan planten på to ulike måter kan gjenkjenne og respondere til patogenenes forsøk på å skape en infeksjon. Responsene kalles patogentrigget immunitet (PTI) og effektortrigget immunitet (ETI).

INTRODUKSJON



Figur 1.2.3. Plantens basale immunforsvar. Figuren viser en modell som illustrerer vekselvirkningene mellom patogenenes forsøk på å infisere planten og plantens respons til dette. I fase 1 registrerer planten MAMP'er (røde ruter) via PRR'er, og PTI induseres. I fase 2 injiserer patogenet spesielle effektorproteiner (Avr) som omgår PTI eller på annet måte undertrykker plantens immunforsvar. I fase 3 er et effektorprotein (vist i rødt) gjenkjent av et R-genprodukt (forbindelsen Avr-R) og ETI aktiveres. ETI ledsages av induksjon av HR. Avr, antivirulente proteiner; ETI, effektortriggeret immunitet; ETS, effektortriggeret sårbarhet; HR, hypersensitiv respons; MAMP, mikrobeassosiert molekylært mønster; PRR, mønstergjenkjennende reseptorer; PTI, patogentrigget immunitet; R, R-genreseptor; Figuren er modifisert etter Jones og Dangl (2006).

Plantenes første respons til et mulig patogenangrep induseres ved at mønstergjenkjennende reseptorer (PRR'er, fra engelsk: «Pattern recognition receptors») i cellemembranen gjenkjenner mikrobeassosierte molekylære mønster (MAMP'er, fra engelsk: «Microbe-associated molecular patterns»). Et MAMP er et høyt konservert epitop fra patogene molekyler, for eksempel kitin fra sopp, peptidoglykan eller flagellin fra bakterier. MAMP'ene kan være felles for en rekke mikrober, og utløser den uspesifikke patogentriggede immunresponsen PTI (Figur 1.4 fase en). Samlet gir PTI en motstand mot bakterier og sopp som kan være tilstrekkelig for å stoppe videre kolonisering, men det er ikke alltid nok (Jones og Dangl, 2006).

Suksessfulle patogener undertrykker PTI ved å produsere effektorproteiner, kalt antivirulente (Avr) proteiner. De injiseres i planten via type III sekresjonssystem (TTSS), vist i Figur 1.2.3, fase to. Patogenets virulens fremmes ved at de omgår plantens forsvar ved å imitere cellulære molekyler eller ved å undertrykke cellulære funksjoner. Det vil enten medføre at patogenene

INTRODUKSJON

lykkes med invasjonen og skaper en infeksjon, eller ved at planten responderer på effektorproteinene med å iverksette en effektor-trigget immunrespons (ETI) (Jones og Dangl, 2006).

Ved aktiveringen av ETI vil nukleotidebindende leucinrik repetisjon (NB-LRR, fra engelsk: «Nucleotide-binding leucine-rich repeat»)-reseptorer i cytoplasma respondere på patogene effektorproteiner. Effektorproteinene blir gjenkjent via indirekte eller direkte binding til NB-LRR reseptorene (Figur 1.4 fase tre). Reseptorene kodes av resistens (*R*)-gener (Jones og Dangl, 2006; Dodds og Rathjen, 2010).

ETI er en mye raskere respons enn PTI og resulterer ofte i hypersensitiv respons (HR), en form for programmert celledød som oppstår i de infiserte cellene. HR begrenser den videre koloniseringen av biotrofe patogener, men begrenser ikke veksten av nekrotrofe patogener (Jones og Dangl, 2006).

Etter aktivering av HR blir vevet motstandsdyktig mot flere patogener for en lengre tid, et fenomen som kalles systemisk oppnådd motstand (SAR, fra engelsk: «Systemic acquired resistance.»). SAR setter planten i en høy beredskap, hvor forsvarsresponsen aktiveres raskere i tilfelle nye angrep (Morel og Dangl, 1997).

Flagellin-FLS2 interaksjon

Reseptoren FLAGELLIN-SENSITIVE 2 (FLS2) er en godt beskrevet PRR reseptor (Gomez-Gomez et al., 1999) som direkte binder bakterielt flagellin. FLS2 igangsetter aktiv signalisering og er en viktig komponent både i initieringen og amplifiseringen av de basale forsvarsresponsene i planten (Gomez-Gomez et al., 1999; Dodds og Rathjen, 2010). Flg22 er et syntetisk derivert peptid som omfatter 22 aminosyrer i det mest konserverte område av flagellin. Flg22 binder til FLS2 på samme måte som flagellin og blir benyttet for å studere responser nedstrøms for FLS2-reseptoren (Gomez-Gomez og Boller, 2002).

FLS2 er en transmembran RECEPTOR-LIKE KINASE (RLK) som har et ekstracellulært LRR domene og et intracellulært serin/treonin protein kinase domene. Til sammenligning er det også vist i pattedyrene at det finnes en stor gruppe transmembrane PRRer, kalt Toll-liknende reseptorer. Toll-liknende reseptorer har tilsvarende ekstracellulære LRR domener (Chinchilla et al., 2006).

I løpet av de første minuttene etter stimulering med flagellin eller Flg22 danner FLS2 et kompleks med LRR-RLKen BRASSINOSTEROID INSENSITIVE1-ASSOCIATED

INTRODUKSJON

RECEPTOR KINASE1 (BAK1). FLS2 og BAK1 danner en heterodimer som aktiverer en MAPK-kaskade (Chinchilla et al., 2007).

Responser nedstrøms for flagellin/Flg22-FLS2 interaksjonen er, i tillegg til aktivering av MAPK-kaskader, fluks av Ca^{2+} -ioner over plasmamembranen, frigivelse av ROS og endringer i plantens genuttrykk som medfører transkripsjon av *PATHOGENESIS-RELATED (PR)*-gener, kallosedeponeringer og vekstreduksjon (Gomez-Gomez og Boller, 2000; Dodds og Rathjen, 2010)

Effektorproteiner og toksiner

For å studere patogen-planteforbindelser der patogenene produserer effektorproteiner, benyttes ofte *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst* DC3000) som modellpatogen. *Pst* DC3000 påfører planten bakterieflekker (fra engelsk: «Bacterial speck disease») (Wei et al., 2007). Patogenes virulens skyldes at effektorproteiner modellerer plantens PTI- og ETI-responser og den systemiske hormonsignaliseringen, for å sikre sin egen overlevelse (Jones og Dangl, 2006).

Pst DC3000 injiserer omtrent 30 effektorproteiner ved hjelp av type III sekresjons system (TTSS). I tillegg produserer *Pst* DC3000 toksinet coronatin som imiterer en bioaktiv form for jasmonat (JA) og aktiverer JA-signalspor på bekostning av salisylsyre (SA)-signalspor. SA-avhengige responser er nødvendige for å begrense veksten av *Pst* DC3000 (Laurie-Berry et al., 2006).

Med patogenets omforming av forsvarsresponsene ved hjelp av effektorproteiner og coronatin vil planten ikke være i stand til å bekjempe bakterien fullstendig, men patogenets vekst vil likevel være begrenset av plantens generelle motstand (Katagiri et al., 2002).

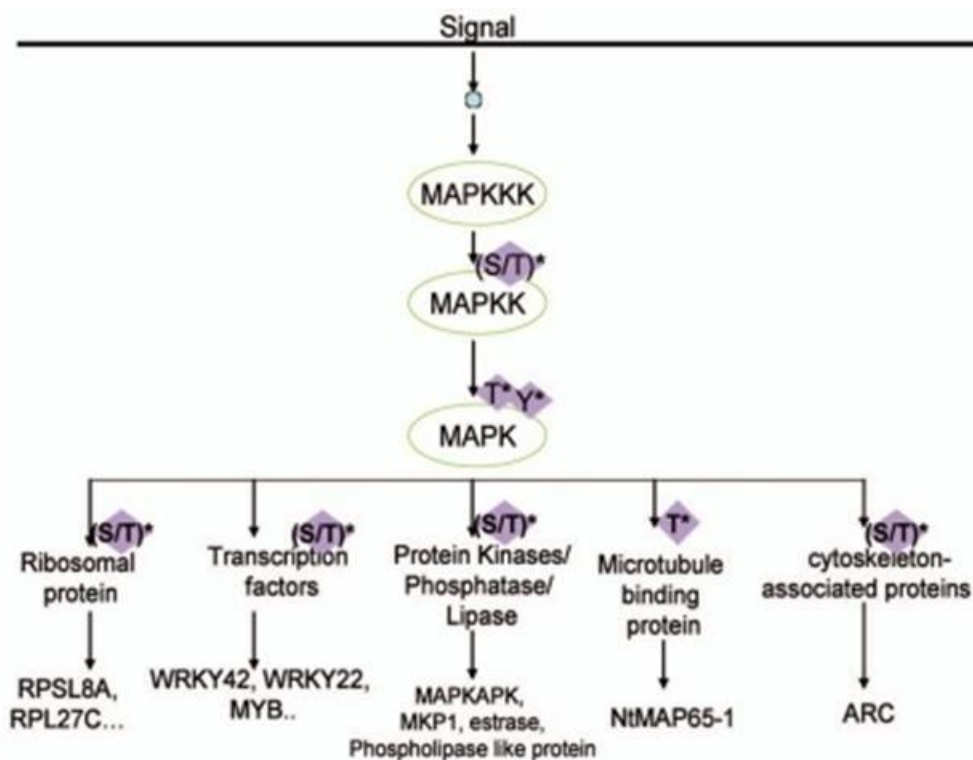
1.3 Signaloverføring ved MAPK-kaskader

Et av de mest studerte sporene for signaloverføring er mitogen-aktivert protein kinase (MAPK) kaskade, som ved hjelp av proteinkinaser og sekvensiell fosforylering forbinder reseptorregistrerte signaler til intracellulær respons (Jones og Dangl, 2006; Taj et al., 2010). Evolusjonsmessig er MAPK-kaskaden et gammelt spor som finnes i både encellede og flercellede eukaryote celler (Taj et al., 2010).

I en generell modell av et MAPK kinasespor (Figur 1.3.1) vil en aktivert reseptor eller en aktivert MAP kinase kinase kinase kinase (MAP4K) fosforylere serin/treonin- eller

INTRODUKSJON

treonin/tyrosin-enheter på en MAP kinase kinase kinase (MAPKKK, MAP3K eller MEKK). Nedstrøms for MAPKKK vil MAP kinase kinase (MAPKK) aktiveres ved fosforylering, og deretter blir MAPK aktivert. Målene for de ulike MAPK-kaskadene kan være ulike proteiner i cytoplasma eller nukleus. Målproteinene kan være andre kinaser, enzymer eller transkripsjonsfaktorer som regulerer gentranskripsjonen i henhold til stimuli (Rodriguez et al., 2010; Taj et al., 2010).



Figur 1.3.1. Oversikt over en MAPK-kaskade. Skjematisk framstilling av en signaltransduksjonskaskade som overfører et oppstrøms signal fra MAPKKK til MAPK ved å fosforylere serin/treonin- eller treonin/tyrosin-enheter på nedstrøms kinaser. Den siste kinasen i sporet, MAPK, blir aktivert ved fosforylering og blir i svært mange tilfeller transportert til nukleus hvor den påvirker cellens gentranskripsjon ved å fosforylere ulike transkripsjonsfaktorer. Figuren er hentet fra Taj et al. (2010).

Den cellulære responsen til et signal er resultat av intensitet og varighet av MAPK aktiveringen og bestemmes av samspillet mellom fosforylering og defosforylering, ved at tyrosin- og serin/treonin-spesifikke fosfataser binder og hydrolyserer aktiverte MAPKer.

INTRODUKSJON

Aktiviteten og konsentrasjonen av fosfataser danner en effektiv feedback-løkke som regulerer MAPK-kaskaden (Bartels et al., 2010).

Komponentene i hver enkelt MAPK kinase kaskade blir holdt samlet og adskilt fra andre kaskader ved hjelp av støtteproteiner, membranforankrede proteiner og adapterproteiner. Slik sikres en rask signalisering og overkrysning mellom sporene i cellen begrenses (Rodriguez et al., 2010; Taj et al., 2010; Samajova et al., 2013).

1.4 Jasmonat og gener i plantens basale immunforsvar

SA-medierte forsvarsresponser er rettet mot biotrofe patogener som henter næring fra levende organismer, mens herbivorer og nekrotrofe patogener blir oftest påvirket av JA/ET-medierte forsvarsresponser. De nekrotrofe bakteriene dreper verten og henter næring fra det døde organiske vevet. Det endelige utfallet av en aktivert forsvarsrespons er summen av hormonene som inngår i responsen og hormonenes kinetikk (Verhage et al., 2010; Thaler et al., 2012).

I dette avsnittet blir det gjort rede for viktige gener som inngår i jasmonat-signalisering. Deretter blir det gjort kort rede for andre gener som inngår i plantenes basale immunforsvar, og som kan bli induisert ved plantepatogene interaksjoner.

Fokuset på jasmonat og utvalget av gener som blir omtalt er gjort på bakgrunn av mikromatriseforsøk hvor planter ble sprayet med syntetisk derivert IDA RELATED PEPTIDE (IRP)1-peptid (Javad Najafi, upublisert material). De omtalte genene var blant dem som viste størst økning i genuttrykk. De ble benyttet som målgener ved transkripsjonsanalyser utført med RT-qPCR (Avsnittene 3.2 og 4.2).

Jasmonat

Jasmonat (JA)-familien består av flere små lipid-deriverte molekyler syntetisert fra linolensyre (18:3) (Acosta og Farmer, 2010). I kloroplastmembranen blir linolensyren omdannet til 12-oxo-phytodienoic syre (OPDA) og blir deretter overført til peroxisomene. En videre reduksjon av OPDA produserer jasmonsyre (Staswick, 2008). Jasmonsyre metaboliseres videre til bioaktive og ikke bioaktive JA-derivater (Katsir et al., 2008a).

Jasmonat-mediert signalisering kontrollerer ulike aspekter av plantens forsvar, utvikling og vekst. Spesifikt inngår JA-signalisering i respons til skade og forsvar mot herbivorer og nekrotrofe patogener som *Botrytis cinerea* (*B. cinerea*) og *Alternaria brassicicola* (*A. brassicicola*). Respons til nekrotrofe patogener medieres som et samspill mellom JA og

INTRODUKSJON

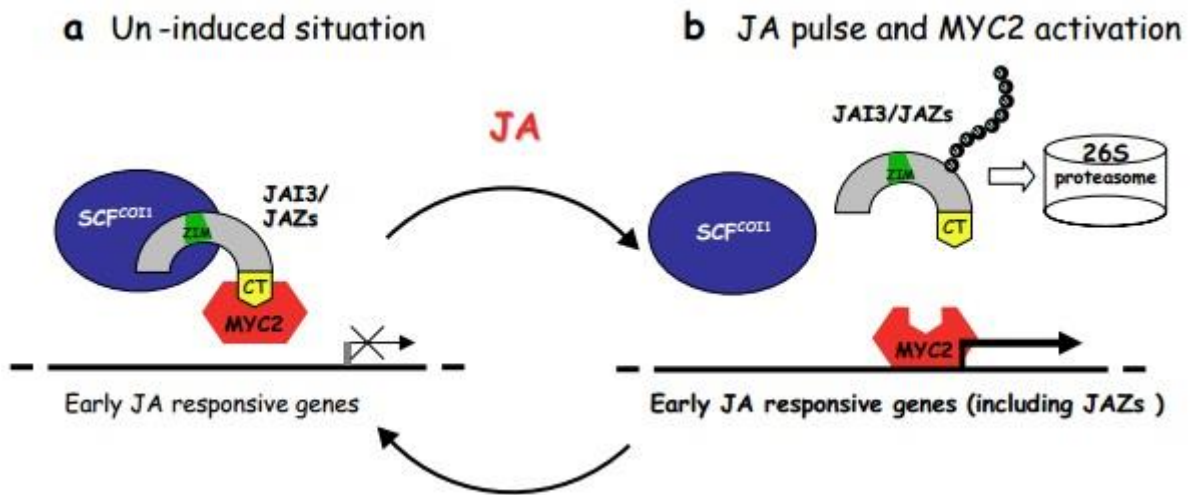
etylen (Rowe et al., 2010). Andre prosesser som er avhengig av JA-signalisering er respons på UV-stråling og ozon og utvikling av reproduktive organer (Katsir et al., 2008a). Planter som har konstitutivt uttrykk av JA eller som har blitt sprayet med metyl-JA (MeJA) har redusert rotvekst (Staswick et al., 1992; Ellis et al., 2002).

Den bioaktive formen for JA, jasmonat konjugert til isoleucin (JA-Ile), har som primærreseptor F-boks proteinet CORONATIN INSENSITIVE1 (COI1). COI1 er en del av Skp1/Cullin/F-boks SCF(COI1) ubiquitin E3 ligase-komplekset (Pauwels og Goossens, 2011). Genetiske analyser indikerer at COI1 er nødvendig for de fleste prosessene som involverer JA-signalisering (Katsir et al., 2008b).

Ved binding av JA-Ile til SCF(COI1) vil ubiquitin E3-ligasekomplekset merke for destruksjon proteiner som tilhører JASMONATE ZIM DOMAIN (JAZ) familien (Pauwels og Goossens, 2011).

I *Arabidopsis* er det 12 medlemmer i JAZ-familien (Katsir et al., 2008b). To av JAZ-proteinene, JASMONATE-INSENSITIVE3 (JAI3) og JASMONATE-ZIM-DOMAIN PROTEIN1 (JAZ1), er vist å binde transkripsjonsfaktoren AtMYC2 og forhindre transkripsjon av JA-responsive gener (Figur 1.4.1 a, neste side). Ved destruksjon av JAZ-proteinene blir AtMYC2 frigjort (Figur 1.4.1 b, neste side) og genene blir transkribert (Chini et al., 2007).

Transkripsjonsfaktoren AtMYC2 fungerer som en negativ regulator for JA-responsive gener som *PLANT DEFENSIN1.2* (*PDF1.2*), *PATHOGENESIS-RELATED3* (*PR3*) og *PATHOGENESIS-RELATED4* (*PR4*) (Dombrecht et al., 2007). I tillegg blir genuttrykket av *JAZ*-genene regulert av AtMYC2, slik at det blir dannet en feedback-løkke som regulerer den hormonelle JA-induserte responsen (Chini et al., 2007; Katsir et al., 2008a).



Figur 1.4.1. Skjematisk modell som viser hvordan JAZ-proteiner undertrykker MYC2-mediert JA-respons. (a) I fravær av JA er JAI3/JAZ-proteiner bundet til SCF(COI1) og MYC2. Transkripsjonsfaktoren MYC2 er inaktivert. (b) Ved JA akkumulering vil SCF(COI1) fremme destruksjon av JAI3/JAZ-proteiner ved hjelp av 26S proteasom. MYC2 blir frigjort og aktiverer transkripsjon av tidlige JA-responsive gener, inkludert JAZ-genene slik at den ikke-induserte tilstanden av MYC2 gjenopprettes. COI1, CORONATIN INSENSITIVE1; JA, jasmonat; JAI3, JASMONATE-INSENSITIVE3; JAZ, JASMONATE-ZIM-DOMAIN PROTEIN; MYC2, AtMYC2; SCF, Skp1/Cullin/F-boks. Figuren er hentet fra Chini et al. (2007).

Coronatin er et plantetoksin som produserer av noen linjer av *P. syringae*. Coronatin virker som en potent agonist til JA-Ile og aktiverer JA-signalisering. JA-signalsporet og SA-signalsporet er antagonistiske i natur. SA-signalisering, som mer effektivt bekjemper de biotrofe patogenene, vil etter patogenets utskillelse av coronatin være undertrykket (Laurie-Berry et al., 2006; Katsir et al., 2008b). Det er vist at AtMYC2 er nødvendig for å undertrykke SA-avhengig forsvar etter infeksjon med *Pst* DC3000 ved at planter som er *myc2*-mutante viser økt forsvar mot både sopp-patogener som *B. cinerea* og mot *P. syringae* (Laurie-Berry et al., 2006; Dombrecht et al., 2007).

Gener som inngår i plantens basale immunforsvar

Salisylsyre (SA, fra engelsk: «Salicylic acid») har en sentral rolle i plantens basale immunforsvar mot biotrofe patogener (Rowe et al., 2010). Etter angrep fra patogener som injiserer effektorproteiner iverksettes HR, hvilket medfører en rask programmert celledød av de infiserte cellene. Deretter iverksetter organismen systemisk aktivert resistens (SAR). SAR er en induert forsvarsrespons som ledsages av langtidsbeskyttelse mot flere mikroorganismer (Uknes et al., 1992).

INTRODUKSJON

Akkumulering av SA resulterer i økt transkripsjon av SAR-markørene PATOGENESIS-RELATED (PR)-proteiner. PR-proteiner medvirker trolig til en generell økt motstand mot biotrofiske patogener som sopp, virus og bakterier (Uknes et al., 1992).

Plantehormonet etylen (ET) inngår i hormonell regulering av planteutvikling, vekst og forsvarsrespons (Taiz og Zeiger, 2010).

1-AMINOCYCLOPROPANE-1-CARBOXYLATE SYNTHASE 4 (ACS4) koder for et enzym ACS4 som inngår i biosyntesen av ET, idet det omdanner S-Adenosyl methionine (Ado Met) til 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC), som er en kjemisk forløper til ET. Det er flere medlemmer i ACS-familien. De blir ulikt regulert på transkripsjonsnivå både av utviklingsmessige- og miljømessige signaler i respons til innvendige og utvendige signaler (Yamagami et al., 2003).

Medlemmene av korsblomstfamilien forsvarer seg mot patogener og herbivorer med sekundærmetabolitter kalt indol-glukosinolater. Indol-glukosinolatene er nitrogen- og svovelholdige forbindelser, som har potente, giftige nedbrytingsprodukter som påvirker patogener og herbivorer på ulike vis (Bones og Rossiter, 2006; Grubb og Abel, 2006).

MYB DOMAIN PROTEIN 51 (MYB51) ble av Gigolashvili et al. (2007) vist å være en viktig transkripsjonsfaktor som kontrollerer biosyntesen av indol-glukosinolat i *Arabidopsis*. I tillegg demonstrerte de også at *CYTOCHROME P450, FAMILY 83, SUBFAMILY B, POLYPEPTIDE1 (CYP83B1)*, som koder for et enzym som inngår i biosyntesen av glukosinolater, også reguleres av MYB51 (Gigolashvili et al., 2007; Clay et al., 2009).

Flere proteiner fra cytokrom P450 (CYP) superfamilien er involvert i planteforsvaret i form av kjemiske antimikrobielle molekyler. *CYTOCHROME P450, FAMILY 71, SUBFAMILY A, POLYPEPTIDE13 (CYP71A13)* og *PHYTOALEXIN DEFICIENT3 (PAD3)* er gener som er involvert i biosyntese av camalexin, et antibakterielt molekyl som ødelegger patogenenes cellemembran (Zhou et al., 1999; Clay et al., 2009).

CHITINASE-gener koder for enzymer som katalyserer degradering av kitin, hovedkomponenten i insektenes eksoskjelett og en viktig komponent i celleveggen til flere sopparter (Verburg og Huynh, 1991).

1.5 Små sekresjonspeptider med signalfunksjon

Plantenes utvikling, vekst og forsvar blir i stor grad mediert av plantehormonene auxin, cytokinin, gibberellin, abscisinsyre, etylen, brassinosteroider og jasmonat. I tillegg inngår små sekrete og ikke-sekretede peptid-signaler som en viktig del av reguleringen. Det første peptidet som ble beskrevet var tomat systemin i 1991 (Matsubayashi og Sakagami, 2006), men siden er det i genomet til *Arabidopsis* identifisert flere enn 1000 små gener (< 250 bp), med bare et ekson, som koder for antatte peptider (Lease og Walker, 2006).

Noen få peptider virker direkte som antimikrobielle molekyler i plantens immunforsvar og andre som chelater. De aller fleste peptidene blir sekretet og utøver sin virkning gjennom reseptorer på celleoverflaten til omliggende celler. Å oppklare funksjonen til peptidene vil gi verdifull innsikt i intercellulær kommunikasjon og økt forståelse for grunnleggende plantebiologi (Lease og Walker, 2006; Matsubayashi, 2012).

Lite sekresjonspeptid med signal peptid i N-terminal ende

Strukturelt kan de sekrete peptidene deles inn i to ulike klasser. Peptidene i den første klassen karakteriseres ved at de har flere intramolekulære disulfid-bånd, mens peptidene i den andre klassen blir post-translasjonelt proteolytisk prosessert og kan få introdusert kjemiske grupper i flere av peptidets aminosyrer (Matsubayashi, 2012).

Pre-proteinet til et antatt sekresjonspeptid som blir post-translasjonelt proteolytisk prosessert har i N-terminal ende en kort aminosyresekvens som utgjør et signalpeptid. Formålet med signalpeptidet er å forflytte pre-proteinet fra cellens endoplasmatiske retikulum hvor det blir produsert, til peptidets endelige destinasjon, som kan være ekstracellulært eller i plasmamembranene. Det antas at transporten skjer via vanlig vei for sekrete proteiner (Rojo og Denecke, 2008). Når korrekt lokalisasjon er nådd kuttet signalpeptidet fra pre-proteinet. Pre-proteinet blir videre prosessert slik at det modne bioaktive peptidet består av ti til tjue aminosyrer. Peptidet virker som ligand til nærliggende reseptorer som aktiverer nedstrøms signalspor (Matsubayashi, 2012).

Sekresjonspeptidet IDA

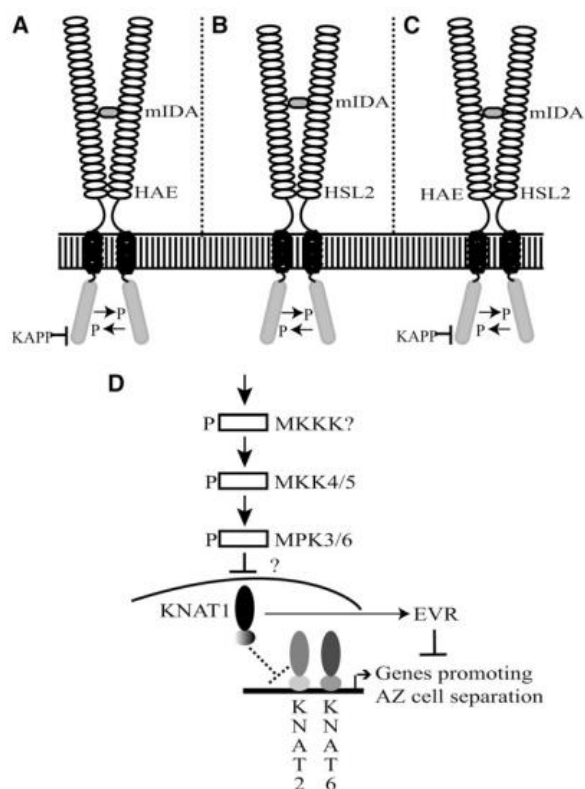
Et eksempel på et sekresjonspeptid hvor både deler av signalveien og funksjonen til peptidet er kjent er INFLORESCENCE DEFICIENT IN ABSCISSION (IDA).

INTRODUKSJON

Butenko et al. (2003) studerte en *Arabidopsis* mutant, *inflorescence defincient in abscission* (*ida*), som ikke var i stand til å felle blomsteorganene (dekkblad, kronblad og støvbærer). Mutanten utviklet et normalt avkastningslag og responderte normalt på etylen i forsøk hvor trippel-responsen ble testet, men likevel beholdt *ida*-mutanten blomsterorganene. Ved nærmere studier ble det vist at proteinet IDA har en funksjon i en utviklingsprosess som er uavhengig av etylen, og at proteinet har egenskaper som et sekretert peptid (Butenko et al., 2003).

Genetiske interaksjonsstudier har vist at IDA og reseptorene HAESA (HAE) og HAESA-LIKE (HSL)-2 virker i samme signalspor (Stenvik et al., 2008; Butenko et al., 2009). HAE og HSL2 er LRR-RLKer som regulerer celleseparasjonen før avkastningen av blomsterorganer. Det er også vist at en MAPK kaskade som inkluderer MKK4/MKK5, MAPK3 og MAPK6 inngår i signalsporet nedstrøms for IDA, HAE og HSL2 (Cho et al., 2008). En foreslått signalvei nedstrøms for IDA (Figur 1.5.1, neste side) involverer transkripsjonsfaktorene BREVIPEDICELLUS (BP)/KNOTTED-LIKE FROM ARABIDOPSIS THALIANA1 (KNAT1) som undertrykker mutasjon i *IDA*-genet, og KNAT2 og KNAT6 som i samarbeid med KNAT1 trolig aktiverer avkastning av blomsterorganer (Shi et al., 2011).

INTRODUKSJON



Figur 1.5.1. Modell for IDA signalisering. Liganden IDA kan binde (A) en HAE-homodimer, (B) en HSL2 homodimer eller (C) en HAE-HSL2 heterodimer slik at reseptorkinase domenet autofosforyleres (P). Proteinfosfatasen KINASE ASSOCIATED PROTEIN PHOSPHATASE (KAPP) defosforylerer aktivert HAE. Signalet fra reseptoren tenkes overført (D) ved hjelp av en MAPK-kaskade som omfatter MKK4, MKK5, MPK3 og MPK6. BP/KNAT1, nedstrøms for MAPK-kaskaden, antas å regulere avkastning av blomsterorganer negativt ved å hemme transkripsjonsfaktorene KNAT2 og KNAT6. Ved aktivering av IDA signalkaskaden virker KNAT2 og KNAT6 som positive regulatorer for organavkastning. Figuren er hentet fra (Shi et al., 2011)

Antatte sekresjonspeptider: IRP1, IRP9 og IRP10

Fylogenetiske studier har påvist flere gener som er homologe til *IDA*. Genene *IDA RELATED PEPTIDE1* (*IRP1*, At4g28460), *IRP9* (At2g23270) og *IRP10* (At4g37290), som blir studert i denne oppgaven, antas å tilhøre den utvidede *IDA*-superfamilien (Ane Kjersti Vie, upublisert material).

Felles for medlemmene i superfamilien er at genene koder for små proteiner. Proteinene har et signalpeptid i N-terminal ende, en variabel midtre del og et konservert motiv i C-terminal ende. Sammenligninger av aminosyresekvensene viser at det C-terminal konserverte motivet i peptidene *IRP9* og *IRP10* (Ane Kjersti Vie, upublisert material). I Vedlegg A.10 viser en figur med aminosyresekvensene for *IDA*, *IRP1*, *IRP9* og *IRP10*.

INTRODUKSJON

Reseptorene for IRP-peptidene er ikke kjent, men det antas at de sitter i cellemembranen, og at de i likhet med HAE/HSL2 og FLS2 danner homo- eller heterodimerer som autofosforyles ved aktivering. Nedstrøms for reseptorene er det trolig en MAPK-kaskade.

Det er ikke kjent hvilke transkripsjonsfaktorer som blir aktivert nedstrøms for peptidene, eller hvordan IRP-signalisering står i forbindelse med andre signalkaskader.

1.6 Oppgavens mål

In silico analyser av data fra ulike utvikling-, vekst- og stressforsøk tilgjengelig på nettstedet «The Bio-Analytic Resource for Plant Biology» (<http://bbc.botany.utoronto.ca>) viste moderat økning i genuttrykket for *IRP1*, *IRP9* og *IRP10* etter påvirkninger med abiotisk og biotisk stress (Ane Kjersti Vie, upubliserte materiale).

Fra disse data ble det formulert en hypotese om at genene *IRP1*, *IRP9* og *IRP10* koder for sekrede peptider som modulerer signalspor i plantens immunforsvar.

Målet var å identifisere spesifikke fenotyper som kunne gi indikasjoner på peptidenes funksjon i immunforsvaret. Fenotype ble observert når plantene ble utsatt for ulike typer abiotisk- og biotisk stress.

Det skulle benyttes linjer som var knockout/knockdown, dobbel/trippelmutante og linjer som overuttrykker *IRP1*, *IRP9* og *IRP10* i forsøkene. Oppgavens mål er formulert nedenunder.

Forberedende arbeid:

- Verifisere overuttrykkslinjer for *IRP1*, *IRP9* og *IRP10*
- Generere dobbel- og trippelmutanter ved kryssing
- Gjennomføre transkripsjonsanalyser for målgener i immunforsvaret

Effekt av abiotisk- og biotisk stress:

- Abiotisk stress i form av UV-B stråling
Hensikt: Å undersøke strålingens effekt i knockout/knockdown mutanter
Å undersøke om det er overflødighet i signalsporene
- Biotisk stress i form av *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000

INTRODUKSJON

Hensikt: Å undersøke vekst av *Pst* DC3000 i knockout/knockdown-mutanter og overuttrykkslinjer

- Biotisk stress i form av det MAMP-deriverte peptidet Flg22

Hensikt: Å undersøke Flg22-peptidets effekt på rotvekst i knockout-mutanter og overuttrykkslinjer

2 MATERIALER OG METODE

2.1 Dyrkning av planter – standard betingelser

Gassfasesterilisering av frø

Når frø fra flere linjer skulle plates ut samtidig ble gassfasesterilisering benyttet. Metoden er etter Maud Hinchee og kolleger ved Monsanto (Clough og Bent, 1998).

Et 250 ml beger med 100 ml klorin (Lilleborg) og 3 ml 36 % (volum/volum) HCl (Merck) ble sammen med frø i åpne 1,5 ml mikrosentrifugerør plassert i en forseglet kontainer i 3-5 timer. Mikrosentrifugerørene ble umiddelbart lukket da kontaineren ble åpnet.

For å spre frøene ved utplating ble mikrosentrifugerøret tilsatt 0,1 % (vekt/volum) agarose for rutine laboratoriearbeid (Sigma-Aldrich).

Våtfasesterilisering av frø

Våtfasesterilisering ble brukt når frø fra få linjer skulle steriliseres.

Det ble benyttet tre løsninger til steriliseringen:

1. 70 % (volum/volum) etanol
2. Blekeløsning: Forholdet 10:40:1 av klorin (Lilleborg), dobbel destillert vann og 5 % (volum/volum) Tween20 (Sigma-Aldrich)
3. Vaskeløsning: Forholdet 5:1 av dobbel destillert vann og 5 % (volum/volum) Tween20 (Sigma-Aldrich)

I et 1,5 ml mikrosentrifugerør ble det tilsatt 1 ml 70 % (volum/volum) etanol sammen med frøene. Etter fem minutt ble etanolen pipettert av og 1 ml blekeløsning ble helt over frøene. Etter ytterligere fem minutter ble blekeløsningen pipettert av og 1 ml vaskeløsning ble tilsatt og fikk virke i fem minutt. Vaskeløsningen ble pipettert av.

For å spre frøene ved utplating på medium ble det tilsatt 0,1 % (vekt/volum) agarose for rutine laboratoriearbeid (Sigma-Aldrich) til mikrosentrifugerøret.

Stratifisering

Stratifisering utføres for å synkronisere frøspiringen.

Frø ble sådd ut i flytende eller fast medium og satt på kjølerom (4 °C) i 1-3 dager før de ble overført til spirerom med standard betingelser.

Standard vekstbetingelser

Frø platet ut på ½ MS medium i petriskåler ble dyrket på spirerom med fotosyntetisk aktiv stråling (PAR, fra engelsk: «Photosynthetic active radiation») i området 7,5-9,8 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 16 t lys/8 t mørke. Belysning var ved lysstoffrør av typen Osram L 36W/827. Temperatur 21-23 °C.

Spirer overført fra petriskåler til jord ble dyrket på vekstrom med PAR i området 14,7-16,9 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 16 t lys/8 t mørke. Belysning var ved Osram Powerstar HQI-BT D Pro 400 W. Temperatur 21-23 °C.

Oppskrift for vekstmedium og den benyttede plantejorden er oppgitt i vedlegg A.1.1.

2.2 Arbeid med RNA

Metode for RNA-isolering

Ribonukleinsyre (RNA) er et biologisk molekyl med mange ulike funksjoner, deriblant messenger RNA (mRNA), som tjener som templat ved proteinsyntese. Analyser av RNA isolert fra celler gir et øyeblikksbilde av en organismes genuttrykk, og er et viktig verktøy ved studier av cellulære responser. RNA degradering forårsaket av ribonukleaser (RNaser) er en vanlig årsak til at analyser mislykkes.

Endogene og eksogene RNaser er stabile, aktive enzymer som ikke trenger ko-faktorer for å fungere. De er vanskelige å inaktivere, og kun en liten del RNase tilstede i løsningen er nok til å degradere RNA. Ved isolering av RNA er det derfor viktig og umiddelbart fryse høstet vev i flytende nitrogen, arbeide med videre RNA-isolering i RNase-frie omgivelser og å benytte RNase-fritt utstyr.

All isolering og rensing av RNA i dette masterarbeidet ble gjennomført med Spectrum™ Plant Total RNA-sett (Sigma-Aldrich) i henhold til produsentens anbefalinger.

Ved kolonne-isolering bindes RNA i kolonnen, mens polysakkarider, genomisk DNA og andre urenheter blir vasket bort.

MATERIALER OG METODE

1. 90-110 mg frossent plantevev ble veid ut i 2 ml mikrosentrifugerør, plassert i frossen modul og knust ved hjelp av Tissuelyser II (Qiagen, Hilden, Germany). Vevet ble knust i 2 x 1 minutt ved 25 Hz.
2. Det ble tilsatt 500 µl lyseringsbuffer og 5 µl 2-Mercaptoetanol (Sigma) til vevet. Prøvene ble overført til en ikke frossen modul og knust ytterligere i 2 x 1 minutt ved 25 Hz. Prøvene ble inkubert i varmeskap i 4-5 minutt ved 56 °C og deretter sentrifugert i Heraeus Biofuge Fresco (DJB Labcare Ltd, Buckinghamshire, UK) ved 16 000 x g i 3 minutt.
3. Supernatanten ble overført til filtreringskolonne og sentrifugert ved 16 000 x g i 1 minutt.
4. Filtreringskolonnen ble fjernet og lysatet ble tilsatt 500 µl bindeløsning. Løsningene ble blandet ved pipettering.
5. 700 µl løsning ble overført til bindekolonne og sentrifugert ved 16 000 x g, 1 minutt. Gjennomstrømsvæsken ble kastet. Prosedyren ble repetert for de resterende 300 µl.
6. Det ble tilsatt 300 µl Vaskeløsning-1 til bindekolonnen. Kolonnen ble sentrifugert 16 000 x g i 1 minutt. Gjennomstrømsvæsken ble kastet.
7. For å fjerne genomisk DNA ble prøvene behandlet med RNase-fri DNase løst i RDD buffer (Qiagen, Hamburg GmbH, Tyskland). En blanding av 10 µl RNase fri DNase og 70 µl RDD buffer ble påført direkte på filteret i hver kolonne. Kolonnene ble inkubert ved romtemperatur i 15 minutt.
8. Det ble tilsatt 500 µl Vaskeløsning-1 til bindekolonnen. Kolonnen ble sentrifugert 16 000 x g i 1 minutt og gjennomstrømsvæsken ble kastet.
9. Det ble tilsatt 500 µl Vaskeløsning-2 (fortynnet med 100 % etanol). Kolonnen ble sentrifugert 1 minutt ved 16 000 x g. Gjennomstrømsvæsken ble kastet. Vasketrinnet ble repetert en gang.
10. Bindekolonnene ble sentrifugert ved 16 000 x g i 2 minutt for å tørke.
11. Bindekolonnene ble overført til nye 1,5 ml mikrosentrifugerør og 50-60 µl elueringsløsning ble påført sentrum av filteret. Etter 1 minutts inkubering ble kolonnen sentrifugert 16 000 x g i 1 minutt.
12. Mikrosentrifugerør med isolert RNA ble plassert på is. Konsentrasjon og renhet til RNA ble bestemt spektrofotometrisk med NanoDrop ND-1000 v3.7 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA) og kvaliteten ble kontrollert med formaldehyd-agarosegel elektroforese. Renset RNA ble lagret ved -80 °C før ytterligere analyser.

NanoDrop1000-spektrofotometri

Det ble gjennomført kontroll av renhet og konsentrasjonsmåling av RNAet ved å benytte NanoDrop1000 Spectrophotometer v3.7 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA).

Ved spektrofotometri utnyttes de ulike molekylenes evne til å absorbere UV-B stråling ved ulike bølgelengder. Nukleinsyrene RNA og DNA absorberer stråling ved bølgelengde 260 nm, mens proteiner og fenoler absorberer stråling ved 280 nm (Quiagen, 2009).

Nukleinsyrenes absorpsjonen av stråling ved 260 nm benyttes for å bestemme prøvens konsentrasjon av nukleinsyrer. Konsentrasjonen oppgis i ng/ μ l (Quiagen, 2009).

Raten A_{260}/A_{280} gir et mål på renheten til en prøve med rensset RNA eller DNA, ved at rent RNA har en A_{260}/A_{280} rate på 1.9-2.1. Raten til rent DNA er omtrent 1,8. Raten A_{260}/A_{230} er et annet mål på renhet, og verdier i området 1,8-2,2 indikerer en ren prøve. Lave rater kan bety at prøven er forurenset med proteiner, fenoler eller andre molekyler som er rensset sammen med RNAet eller DNAet (Thermo Fisher Scientific, 2008; Taylor et al., 2010).

Det ble benyttet 1 μ l rensset RNA ved målinger av konsentrasjon og renhet ved NanoDrop1000-spektrofotometri.

Formaldehyd agarosegel-elektroforese

Kvaliteten til rensset RNA ble kontrollert ved formaldehyd agarosegel (FA-gel)-elektroforese.

Ved elektroforese benyttes det et elektrisk felt for å separere fragmenter i forhold til ladning. RNA-molekyler har negativt ladede sukkerfosfatgrupper og vil bevege seg mot den positive elektroden i et elektrisk felt. Farten molekylet beveger seg med avhenger av den totale elektriske ladningen og motstand i mediet molekylet bevegges gjennom (Reece, 2004).

God kvalitet vises ved at de ribosomale rRNA-molekylene fremstår som tydelige bånd på FA-gelen etter elektroforese. Forholdet mellom stor (26S) og liten (18S) ribosomal RNA-enhet skal være omtrent 2:1 og inspiseres visuelt. I de tilfellene båndene ikke er tydelige, men fremstår som utflytende mot de mindre RNA-båndene, er det mulig at prøven ble degradert før eller i løpet av RNA rensingen (Quiagen, 2009; Taylor et al., 2010).

Oppskrift for FA-gel og FA-gel kjørebuffer er å finne i vedlegg A1.2

- 1,5-2 μ g RNA-templat og RNase fritt vann ble blandet til et sluttvolum på 8 μ l. 2 μ l 5x RNA loading buffer ble tilsatt løsningen.
- RNA ble inkubert ved 65 °C i 3-5 minutt og umiddelbart avkjølt på is.

MATERIALER OG METODE

- Prøvene ble overført til FA-gel som var plassert i FA-gel kjørebuffer.
- Elektroforese ble utført ved 70 V i 60-80 minutt.
- Separert DNA ble visualisert ved hjelp av GEL DOC 2000 (BIO-RAD, Hercules, USA) programvaren Quantity One.

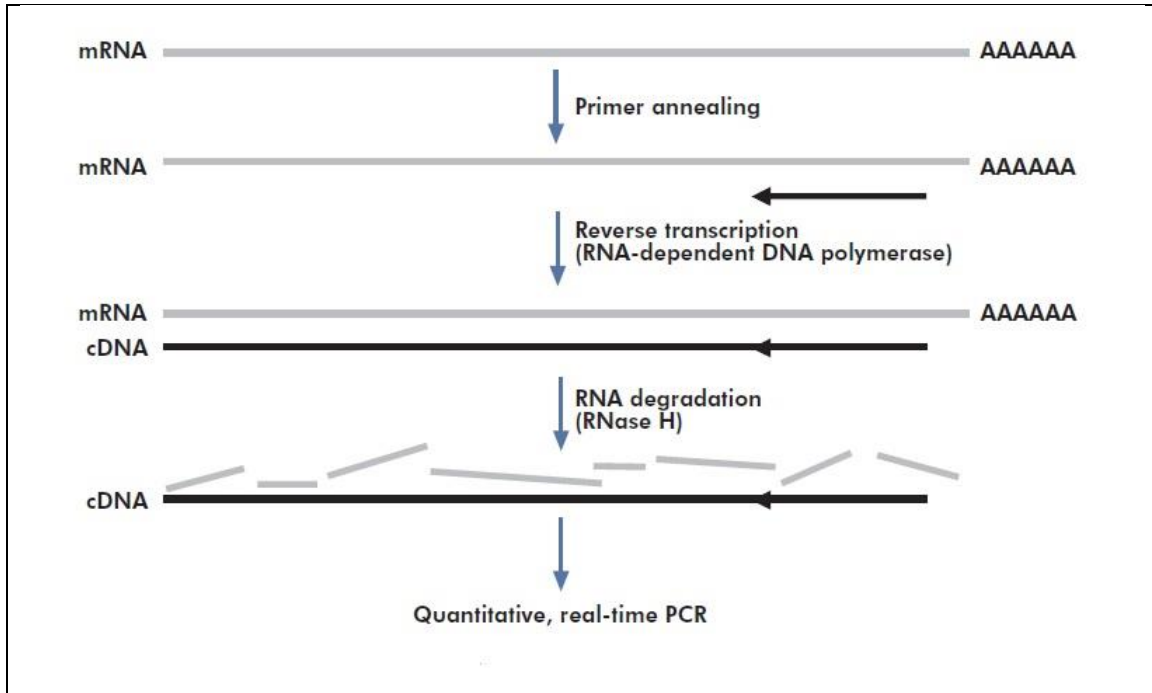
Syntese av cDNA

Til bruk i nedstrøms applikasjoner er mRNA uegnet fordi det er ustabil og degraderes lett. For å kunne benytte mRNA i nedstrøms applikasjoner som qPCR, blir det laget kopier av RNAet ved å gjennomføre syntese av komplementært DNA (cDNA, fra engelsk: «Complementary DNA»). Syntesen utføres ved hjelp funksjonene til enzymet revers transkriptase (RT) (Reece, 2004).

RT, opprinnelig kjent fra retrovirus som human immunodeficiency virus (HIV), har tre primære enzymaktiviteter: RNA-avhengig DNA-polymeraseaktivitet, hybridavhengig ekso-ribonukleaseaktivitet og DNA-avhengig DNA-polymeraseaktivitet (Quiagen, 2009). I dette masterarbeidet ble QuantiTect[®] Reverse Transcription-sett benyttet (Quiagen).

Enzymet Quantiscript Reverse Transcriptase er spesielt utviklet for å benyttes til to-trinns RT-qPCR. Enzymmiksen består av Omniscript Reverse Transcriptase, Sensiscript Reverse Transcriptase og en RNase inhibitor (RNase H). I reaksjonen er det også inkludert en RT Buffer med dNTPer, og en RT primer miks, som består av både oligo-dT og tilfeldige primere slik at cDNA syntetiseres fra alle RNA-regioner, inkludert 5'-enden (Quiagen, 2009).

Som vist i Figur 3.1 vil en kombinasjon de to førstnevnte funksjonene til RT-enzymet medføre at enkeltrådet RNA (ssRNA, fra engelsk: «Single stranded RNA») transkriberes til enkeltrådet cDNA. Først vil primerne hybridisere til RNA og initiere revers transkripsjon ved aktiviteten til RNA-avhengig DNA-polymerase. Dernest vil RNaseH spesifikt degradere RNA i RNA:cDNA hybridene. Den tredje aktiviteten, DNA-avhengig DNA polymerase, vil benytte det nylig genererte cDNA som templat og genere dobbeltrådet DNA (dsDNA, fra engelsk: «Double stranded DNA»).



Figur 2.2.1. Syntese av cDNA Syntese av cDNA ved enzymet Quantiscript Reverse Transcriptase. Primere hybridiserer til RNA og initierer revers transkripsjon ved aktiviteten til RNA-avhengig DNA-polymerase. Derneft vil RNaseH spesifikt degradere RNA i RNA:DNA hybrider slik at sscDNA dannes. Figuren er hentet fra Quiagen (2009).

All cDNA syntese ble utført ved hjelp av QuantiTect[®] Reverse Trancription Kit (Qiagen), i henhold til produsentens anbefalinger.

1. RNA-templat (1 µg) ble tilsatt 2 µl 7x gDNA Wipeout Buffer og RNase-fritt vann til et sluttvolum på 14 µl. Løsningen ble inkubert 2 minutt ved 42 °C og deretter avkjølt på is.
2. Det ble laget en RT-mastermiks som bestod av 1 µl Quantiscript RT-enzym, 4 µl 5x Quantiscript RT-Buffer og 1 µl Quantiscript RT-Primermiks.
3. Mastermiksen ble tilsatt templat-RNA.
4. Løsningen ble inkubert i 15 minutter ved 42 °C og etterpå i 3 minutter ved 95 °C for å inaktivere RT-enzymet.
5. Løsningene i reaksjonstubene ble deretter fortynnet med Milli-Q vann til en sluttkonsentrasjon på 0,01 µg/µl, og lagret umiddelbart ved -20 °C.

2.3 RT-qPCR

Metoden revers transkriptase kvantitativ polymerase kjedereaksjon (RT-qPCR, fra engelsk: «Reverse-transcription quantitative polymerase chain reaction») blir benyttet for å gi et relativt mål for en celledens genuttrykk. I analysene benyttes templat (cDNA, DNA, plasmider),

primerpar for ønsket gen og fluorescerende kjemikalier som måler konsentrasjonen av PCR-produkt ved hjelp av intensitet i fluorescens (Taylor et al., 2010).

Prinsipper ved gjennomføring av qPCR

Prinsipper for PCR

PCR består av tre trinn som repeteres i termosyklus. De tre trinnene er denaturering, hybridisering og polymerisering.

Ved denaturering, som skjer ved temperaturer i området 94-95 °C, vil dobbelstreng (ds)DNA smelte til enkeltstreng (ss)DNA og danne templat for primer hybridisering (Reece, 2004).

Ved hybridisering av primer og ssDNA dannes ionebånd mellom nukleotidenes baser. Ionebåndene blir kontinuerlig dannet og brutt. I de tilfellene primeren er nøyaktig komplementær til ssDNA vil ionebindingen være stabil lenge nok til at DNA-polymerasen fester seg. Når noen få baser er kopiert vil ionebåndet være sterkt nok til at polymeriseringen av hele templatet kan gjennomføres. Optimal temperatur for hybridisering varierer med primerparets innhold av basene guanin og cytosin, og er ofte i området 50-60 °C (Reece, 2004).

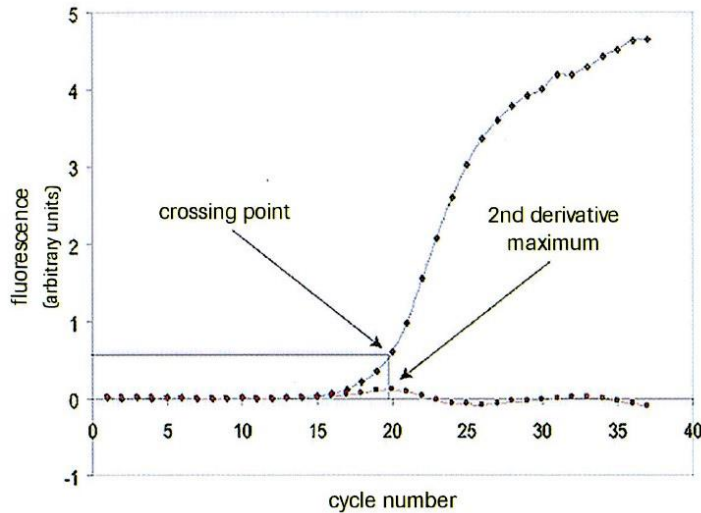
DNA-polymerasens optimale arbeidstemperatur er 72 °C. Polymerisering av produkt skjer ved at baser tilføres komplementært i 3'-ende av primeren. Begge opprinnelige DNA-tråder kopieres, hvilket resulterer i eksponentiell vekst i amplikon (Reece, 2004).

Overvåkning av økning amplikon mens qPCR-reaksjonen pågår

De fleste systemene som benyttes ved gjennomføring av qPCR kvantifiserer responsen fra et fluorescent fargestoff. Fargestoffet som ble benyttet i dette arbeidet er SYBR Green I, som binder spesifikt til dsDNA. SYBR Green 1 avgir fluorescens når det blir bestrålt med UV-lys med bølglengden 530 nm. Måling av fluorescens gjennomføres etter hvert polymeriseringstrinn, slik at det økende nivået av amplifisert produkt blir registrert. Økningen i fluorescens er direkte proporsjonalt til mengden syntetisert dsDNA (Wong og Medrano, 2005).

Kryssende punkt (C_p, fra engelsk: «Crossing point») oppnås når nivået for fluorescens i en amplifiseringsreaksjon overstiger fluorescens i reaksjonens bakgrunn. C_p-verdien (Figur 2.3.1) beregnes som den dobbeltderiverte av amplifiseringskurven, og korresponderer

til det punktet hvor stigningstallet til prøvens fluorescenskurve øker kraftig (Roche Applied Science, 2008a).



Figur 2.3.1. Dobbeltderivert maksimum-metode for beregning av verdi for krysningspunkt. Verdien for krysningspunktet korresponderer til det punktet hvor amplifiseringskurvens stigningstall øker kraftig. Verdien for punktet beregnes som den dobbeltderiverte av amplifiseringskurven. Figuren er hentet fra Roche Applied Science (2008a).

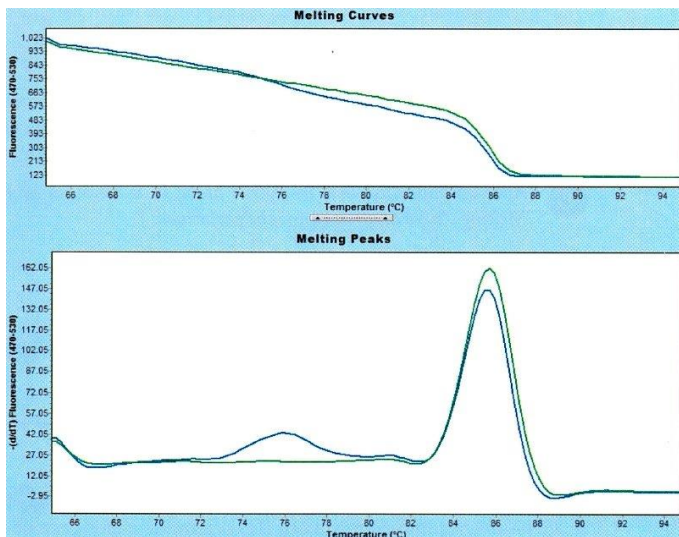
I det følgende vil begrepet kvantifiseringssyklus (Cq, fra engelsk «Cycle of quantification») erstatte begrepet Cp-verdi som følge av retningslinjer for publisering av RT-qPCR-data tilgjengelig ved <http://miqe.gene-quantification.info/> (Bustin et al., 2009).

Smeltepunktsanalyse

Etter gjennomført qPCR blir det gjort en smeltepunktsanalyse. Smeltepunktet defineres som den temperaturen der halvparten av alle molekylene av et gitt amplicon er hybridisert og den resterende halvpart består av ssDNA (Roche Applied Science, 2008a).

De faktorene som i størst grad påvirker smeltepunktet er DNA-sekvensens sammensetning, innholdet av basene guanin og cytosin versus adenin og tymin, og konsentrasjon av ioner i løsningen. Guanin og cytosin danner sterkere ionebindinger enn adenin og tymin. Et høyt innhold av guanin/cytosin vil derfor generere et tilsvarende høyt smeltepunkt. Dersom DNA-trådene danner sekundære strukturer som konkurrerer med dsDNA vil også det medføre høyere smeltepunkt. Ioner som K^+ og Mg^{2+} har en innflytelse, fordi DNA er ladet og interaksjon med kationer kan kompensere denne ladningen (Roche Applied Science, 2008b).

Smeltepunktanalysen i programvaren for Light Cycler[®] 480 (Roche Applied Science) kalles Tm-calling. Rådataene fra smeltekurvene normaliseres før smeltepunktet fremstilles grafisk på to måter. Den ene framstillingen (Figur 2.3.2 øverst) viser ved hvilken temperatur de enkelte produktene er fullstendig denaturert. Den andre framstillingen (Figur 2.3.2 nederst) viser de ulike produktenes smeltepunkt som smeltetopper. Ulike topper betyr at produktene har ulikt smeltepunkt. Forskjellene mellom de smeltepunktene vises også som forskjeller i kurvenes bredde og høyde. Dersom det benyttede primerparet danner flere produkter, ikke-spesifikke produkter eller primerdimerer vil det grafisk avbildes flere temperaturtopper (Roche Applied Science, 2008b).



Figur 2.3.2. Smeltepunktanalyse. Smeltekurven (øverst) viser for alle produktene temperaturen for denaturering. Temperaturen oppgis langs X-aksen. Y-aksen oppgir målt fluorescensen. I smeltetoppkurven (nederst) er de deriverte produktene av smeltekurvene kalkulert, og den enkelte prøves smeltepunkt vises som en topp. Forskjeller mellom de ulike prøvenes smeltepunkt fremkommer både som ulik bredde på kurven og som ulike topper. Temperaturen er oppgitt langs X-aksen. Y-aksen oppgir verdien for de deriverte produktene av smeltekurvene. Figuren er hentet fra Roche Applied Science (2008a).

Primerdesign

De genspesifikke primerene som benyttes ved qPCR konstrueres slik at de genererer et produkt som dekker 75-150 bp av en unik sekvens i målgenet. Primersekvensene skal være mellom 15 og 25 baser. Innholdet av guanin og cytosin bør være mellom femti og seksti prosent og gi smeltetemperaturer på 55 - 65 °C. Innholdet av guanin/cytosin i forover og revers primer bør være likt (Nonis et al., 2011).

MATERIALER OG METODE

For å unngå at primersekvensen bindes til feil sted i templatet bør det blant primersekvensens fem siste baser være tre eller færre guanin/cytosin baser. Repeterende sekvenser med samme base bør unngås (Nonis et al., 2011).

Primerne skal være konstruert slik at de ikke danner primerdimerer eller hårnåls-løkker. De skal generere kun et amplikon (Nonis et al., 2011).

Amplifiseringseffektivitet til primerparene

Amplifiseringseffektiviteten til primerparene avtar med tiden reaksjonen pågår. I tidlig eksponentiell fase gjennomføres amplifisering stabilt. Deretter faller amplifiseringseffektiviteten gradvis mot null når komponenter i løsningen er forbrukt (Wong og Medrano, 2005).

Primereffektiviteten bør ideelt ligge mellom 90 % og 110 %. Ved hundre prosents effektivitet doubles alt produkt ved hver syklus. Amplifiseringseffektivitet høyere enn 110 prosent kan generere primerdimerer og ikke-spesifikke amplikon, mens effektivitet lavere enn 90 prosent kan skyldes kontaminering med Taq-polymerase inhibitorer, primerssekvenser med høye eller ikke optimale hybridiseringstemperaturer eller dannelse av sekundære strukturer (Taylor et al., 2010).

Primereffektivitet for hver enkelt reaksjon og gjennomsnittlig effektivitet for hvert primerpar ble beregnet med LinReg, versjon 12.18 (tilgjengelig fra <http://www.hartfaalcentrum.nl>).

Kontroller

To kontroller ble benyttet for å sjekke at prøvene ikke var kontaminert med genomisk DNA. Minus revers transkriptase (-RT) kontrollerer for DNA kontaminering i cDNA-templatet.

For hvert primerpar ble det i tillegg utført minus templat kontroll (NTC, fra engelsk: «No template control») som kontrollerer at buffere og løsninger er fri for DNA-kontaminering. Positiv NTC kontroll er av liten betydning for resultatet dersom det er 6-7 sykler forskjell på amplifisert produkt og amplifisert NTC.

Fremgangsmåte ved qPCR

Alle RT-qPCR reaksjonene ble forberedt med primere for ønsket gen, cDNA-templat og 2x LightCycler[®] 480 SYBR Green I Master (Roche Applied Science), som også inneholder FastStart Taq DNA-polymerase, SYBR Green I farge spesifikk for dsDNA, reaksjonsbuffer

MATERIALER OG METODE

og nukleotider (dATP, dCTP, dGTP og dUTP). Blandingsforhold for reagensene er oppgitt i Tabell 2.3.1.

Tabell 2.3.1. Reagenser brukt ved qPCR

Volum	Reagens
5,0 µl	Templat cDNA [10 ng/µl]
3,0 µl	2x LightCycler® 480 SYBR Green I Master
1,0 µl	qPrimer-f [10 µM]
1,0 µl	qPrimer-r [10 µM]
10,0 µl	H ₂ O, PCR-gradient
20,0 µl	Totalt

Prøvene ble applisert på 96-brønners plater. Platene ble forseglet med gjennomsiktig film og sentrifugert ved 15 000 x g i 2 minutter.

Analysene ble gjennomført med LightCycler® 480 (Roche Applied Science, Mannheim, Tyskland). Spesifikasjoner for programmet er oppgitt i tabell 2.3.2.

Tabell 2.3.2. Spesifikasjoner for qPCR-program

Steg	Temperatur	Tid	Sykler
Preinkubering	95 °C	5 min	1
Denaturering	95 °C	10 sek	
Hybridisering	55 °C	10 sek	45
Polymerisering	72 °C	10 min	
Smeltepunktsanalyse	65 °C	Fra 65 °C til 97 °C i	
	97 °C	intervaller på 10° per sekund	1
Nedkjøling	40 °C	∞	

Primerparet qTIP41-like (At4g34270) f + r (Czechowski et al., 2005) ble benyttet til normalisering og primerparet qCYP71A13 (At2g30770) ble benyttet ved amplifisering av RT- kontroll. De benyttede primersekvensene er oppgitt i vedlegg A2.1.

Rådata fra LightCycler® 480 ble overført til programvaren LinReg som beregnet individuell og gjennomsnittlig primereffektivitet og baselinjekorrigert individuell Cq-verdi for alle prøvene. Cq-verdiene og gjennomsnittlig primereffektivitet ble videre analysert ved hjelp av programvarene REST2009 (Qiagen) eller Qbase^{PLUS} (Biogazelle).

2.4 Arbeid med DNA

DNA-isolering og genotyping

En organismes genotype definerer hvilke genvarianter den bærer. Ved å gjennomføre genotyping er det mulig å fastslå om individet er homozygot eller heterozygot for et bestemt gen, og om en transgen linje inneholder den ønskede konstruksjon.

I denne oppgaven ble det benyttet to metoder for å isolere DNA for genotyping: En kolonnebasert metode ved hjelp av E.Z.N.A.[®] SP Plant DNA Kit dry Specimen protokoll (Omega Bio-Tec), og en langt raskere metode gjennomført ved å bruke REExtract-N-Amp[™] Plant PCR-sett (Sigma-Aldrich).

Isolasjon av DNA ved bruk av E.Z.N.A.[™] SP Plant DNA Kit dry Specimen-protokoll

Protokollen representerer en robust metode for å isolere totalt cellulært DNA. En viktig egenskap til kolonnene som benyttes ved DNA-isolering er matrisen HiBind[®], som spesifikt men reversibelt binder DNA under optimale forhold, mens proteiner og andre forurensende molekyler blir fjernet. Metoden gir godt DNA-utbytte (Omega Bio-Tek, 2012).

1. Fra plantene ble det høstet bladvev direkte i flytende nitrogen. I underkant av 100 mg vev ble veid opp og knust ved hjelp av Tissuelyser II (Qiagen, Hilden, Tyskland), 2 x 1 minutt, 25 Hz. Det ble tilsatt 600 µl buffer SP1 til løsningen, som deretter ble blandet kraftig på vorteksmikser.
2. Cellene ble lysert ved 10 min inkubasjon, 65 °C. Tuben med prøven ble vendt flere ganger i løpet av inkubasjonstiden.
3. Det ble tilsatt 210 µl buffer SP2 og løsningen ble blandet på vorteksmikser. Prøvene ble deretter inkubert 5 minutt på is, etterfulgt av sentrifugering i Heraeus Biofuge Fresco (DJB Labcare Ltd, Buckinghamshire, Storbritannia), ved 16 000 x g i 10 minutt.
4. Supernatanten ble pipettert over i en Omega[®] Homogenizer-kolonne og sentrifugert ved 16 000 x g i 2 minutt.

MATERIALER OG METODE

5. Lysatet fra sentrifugering ble overført til et nytt mikrotuberør, og fra dette ble 400 µl lysat tilsatt 600 µl buffer SP3 og blandet kraftig på vorteksmikser, til blandingen ble homogen.
6. HiBind[®]-kolonnen ble forberedt ved å tilsette 200 µl ekvibrerings-buffer og sentrifugert ved 16 000 x g i 2 minutt.
7. 650 µl av lysatet ble tilsatt til HiBind[®]-kolonnen. Prøven ble sentrifugert ved 16 000 x g i 1 minutt og gjennomstrømsvæsken ble kastet. Samme trinn ble gjennomført for de resterende 350 µl lysat.
8. Kolonnen ble overført til et nytt sentrifugerør og tilsatt 650 µl SPW vaskebuffer (tilsatt 96 % (volum/volum) etanol), etterfulgt av sentrifugering ved 16 000 x g, 1 minutt. Gjennomstrømsvæsken ble kastet. Vasketrinnet ble repetert en gang.
9. Et siste sentrifugeringstrinn for å tørke HiBind[®]-kolonnen ble gjennomført ved 16 000 x g i 2 minutt.
10. HiBind[®]-kolonnen ble overført til et nytt 1,5 ml mikrosentrifugerør. 50 µl elueringsbuffer, forvarmet til 65 °C, ble tilsatt, og prøven ble inkubert ved romtemperatur i 3 - 5 minutt. For å eluere DNA ble prøvene sentrifugert ved 16 000 x g i 1 minutt.
11. Det ble gjennomført kontroll av renhet ved bruk av NanoDrop 1000 Spectrophotometer v3.7 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA) (Avsnitt 2.2).

DNAet ble korttids lagret ved 4 °C, og langtidslagret -20 °C

Reagenser ved PCR-amplifisering er oppført i Tabell 2.4.1.

Tabell 2.4.1. Reagenser brukt ved PCR-amplifisering

Volum	Reagens
2,0 µl	10x Optimisert DyNAzyme Buffer
2,0 µl	dNTP mikstur [10 mM] (Thermo Scientific)
1,0 µl	Primer-f [10 µM] Primer-r [10 µM]
1,0 µl	qPrimer-r [10 µM]
0,5 µl	DyNAzyme II DNA Polymerase [2 U/µl] (Thermo Scientific)
12,5 µl	Autoklavert Milli-Q vann
20,0 µl	Totalt

MATERIALER OG METODE

Isolasjon av DNA ved bruk av REDEExtract-N-Amp™ Plant PCR-sett

Settet inneholdt reagenser for å ekstrahere og amplifisere genomisk DNA.

Det ble i et 2,0 ml mikrosentrifugerør tilsatt 50 µl ekstraksjonsløsning og en bit plantevev med diameter 0,5 - 0,7 cm. Vevet og løsningen ble blandet kort og inkubert ved 95 °C i 15-20 minutt. 50 µl fortynningsløsning ble tilsatt, prøven ble blandet kort og oppbevart ved 4 °C (holdbar 4-5 dager).

Reagenser brukt til PCR-amplifisering er oppført i Tabell 2.4.2.

Tabell 2.4.2. Reagenser til PCR-amplifisering

Volum	Reagens
5,0 ml	REDEExtract-N-Amp PCR ReadyMix
1,5 µl	Primer-f [3,3 µM]
1,5 µl	Primer-r [3,3 µM]
2,0 µl	DNA-templat
10,0 µl	Totalt

Amplifisering av gen produkt

Prinsippene for PCR-amplifisering er forklart i Avsnitt 2.3.

Amplifisering av genprodukt ble ved begge metodene utført med Termosykler GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, Paisley, Storbritannia). De benyttede parametere er oppført i Tabell 2.4.3.

Tabell 2.4.3. Parameter brukt ved amplifisering av genprodukt

Steg	Temperatur	Tid	Sykler
Preinkubering	94 °C	5 min	1
Denaturering	94 °C	30 sek	
Hybridisering	50-53 °C	30 sek	30
Polymerisering	72 °C	30 min	
Ekstra polymerisering	72 °C	10 min	1
Hold	4 °C	∞	

Agarosegel elektroforese

Ved elektroforese benyttes det et elektrisk felt for å separere fragmenter i forhold til ladning. DNA-molekyler har negativt ladede sukkerfosfatgrupper og vil bevege seg mot den positive elektroden i et elektrisk felt. Farten molekylet beveger seg med avhenger av den totale elektriske ladningen (Reece, 2004).

Ved agarosegel elektroforese vil hastigheten DNA-molekylene beveger seg gjennom agarosegelen stå i omvendt forhold til gelens prosentinnhold av agarose, fordi små molekyler beveger seg raskere gjennom agarosegelen enn store molekyler (Reece, 2004).

En høy prosentandel agarose gir god oppløsning for små molekyler. De amplifiserte DNA-molekylene i denne oppgaven var i størrelsesorden 200-900 bp. Det ble gjennomgående brukt 1,1 - 1,3 % (vekt/volum) agarosegel ved gel elektroforese. Oppskrift for agarosegel og TRIS base/eddiksyre/EDTA (TAE)-kjørebuffer er å finne i vedlegg A1.2.

GeneRuler™ 1 kb plus DNA-ladder blir brukt for å identifisere størrelsen til båndene.

- Ved elektroforese av DNA isolert ved hjelp av E.Z.N.A.™ SP Plant DNA Kit dry Specimen-protokoll ble amplifisert DNA tilsatt 2 µl 10x DNA-fargestoff og overført til agarosegelen som var plassert i TAE-kjørebuffer.
- Ved elektroforese av DNA isolert ved hjelp av REExtract-N-Amp™ Plant PCR-sett ble amplifisert DNA overført direkte til agarosegelen som var plassert i TAE-kjørebuffer.
- 3 µl GeneRuler™ 1 kb plus DNA-ladder ble overført til gelen.
- Elektroforese ble kjørt ved 70 V i 60 minutt.
- Separert DNA ble visualisert ved hjelp av GEL DOC 2000 (BIO-RAD, Hercules, USA) programvaren Quantity One.

2.5 Kryssing og verifisering av transformerte linjer

Knockout/knockdown linjer for *IRP1* og *IRP9*

De benyttede knockout- og knockdown-linjene var JIC SM 3.22412 (*irp9*) med En/Spm transposon innsatt 8-9 aminosyrer fra C-terminal ende, og CATMA 4a30120 (*IRP1-RNAi*). Begge linjene har Col-0 bakgrunn, og var kjøpt fra Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC, Nottingham, Storbritannia). Linjene var verifisert før dette masterarbeidet ble påbegynt.

Verifisering av linjer transformert med 35S promoter

For genene *IRP1*, *IRP9* og *IRP10* var det generert overuttrykkskonstruksjoner (Javad Najafi, upublisert material). Disse konstruksjonene ble laget ved å klonere cDNA fra det aktuelle genet inn i vektoren pEarlyGate100, der genet plasseres under kontroll av overuttrykkspromoteren 35S fra Cauliflower Mosaic Virus (Earley et al., 2006). Vektoren inneholder også seleksjonsmarkøren *BIALAPHOS RESISTANCE (BAR)*, som koder for PHOSPHINOTHRICIN ACETYLTRANSFERASE som gir resistens mot glufosinat (basta) (D'Halluin et al., 1992). Villtypeplanter med Col-0 bakgrunn ble transformert med konstruksjonen ved å benytte *A. tumefaciens*-mediert T-DNA-infiltrasjonsmetode (Clough og Bent, 1998).

Homozygot segregasjon av *BAR*-genet og funksjon av 35S-promoter av ønsket gen skulle verifiseres for linjene 35S::*IRP1*, 35S::*IRP9* og 35S::*IRP10*.

Kloning og transformasjon av overuttrykkskonstruksjon var gjennomført før dette masterarbeidet ble påbegynt. Frekvensanalyser for segregasjon av *BAR*-resistens (BAR^r) og verifisering av overuttrykk av ønsket gen med RT-qPCR for linjene 35S::*IRP1*, 35S::*IRP9*, 35S::*IRP10* ble utført som en del av masterarbeidet.

Generasjon-T₁

Gassfasesteriliserte frø fra generasjon-T₁ ble sådd ut på petriskåler (D = 13 cm) på ½ MS medium tilsatt basta (sluttkonsentrasjon 10 µg/ml). Det ble sådd ut 70-90 frø per skål. Frøene ble stratifisert i 3 døgn og deretter overført til spirerom med standard betingelser.

Seks til ni dager etter spiring ble $BAR^r:BAR^s$ -sensitivitet (BAR^s) kontrollert ved å registrere levende og døde spirer. Forventet segregasjon etter mendelisk teori (Feldmann et al., 1997) var rate 3:1 for $BAR^r:BAR^s$.

Segresjonsraten ble kontrollert med Chi-kvadrattest (X^2) for nullhypotesen H_0 : Frekvens for $BAR^r:BAR^s \neq 3:1$. Testobservatorens verdi: $X^2_{0,05, 1 \text{ df}} = 3,84$. Skåler med rate for segresjonsmønster nær 3:1 hadde testverdi mindre enn 3,841.

Fra linjer med korrekt rate ble det overført fem spirer til jord. Spirene ble dyrket under standard betingelser. Plantene selvpollinerte og ved modenhet ble høstet frø fra dem. Frøene ble kalt Generasjon-T₂.

MATERIALER OG METODE

Generasjon-T₂:

Gassfasesteriliserte frø fra generasjon-T₂ ble sådd ut som beskrevet for generasjon-T₁.

Seks til ni dager etter spiring ble plantenes zygotitet kontrollert ved hjelp av rate for BAR^r:BAR^s. Segresjonsraten ble kontrollert med Chi-kvadrattest for nullhypotesen H₀: Frekvens for BAR^r:BAR^s ≠ 1:0. Testobservatorens verdi: $X^2_{0,05, 1 \text{ df}} = 3,841$.

Fra plater med korrekt rate ble det overført fem spirer til jord som ble dyrket med standard betingelser.

En til to uker etter overføring til jord ble det høstet bladvev direkte på flytende nitrogen. RNA-isolering, kontroll av renhet og kvalitet og RT-qPCR ble gjennomført som beskrevet i Avsnittene 2.2 og 2.3.

Data fra RT-qPCR ble analysert med programvaren LinRegPCR og REST2009.

Spirer som ved RT-qPCR-analyse viste en oppregulering av genet selvpollinerte. Det ble ved modenhet høstet frø fra dem. Frøene ble kalt Generasjon-T₃ og ble brukt til forsøk.

Kryssing av knockout/knockdown linjer for å generere dobbelmutante linjer

Kryssing

Dobbeltmutantene *irp9 IRP1-RNAi* 7.1 og *irp9 IRP1-RNAi* 11.2 ble generert ved å benytte pollen fra henholdsvis *IRP1-RNAi* 7.1 og *IRP1-RNAi* 11.2 til å fertilisere *irp9* mutanten.

Gassfasesteriliserte frø ble platet ut på ½ MS i petriskåler (D = 9 cm). Det ble platet ut 6 - 7 frø per skål. Frøene ble stratifisert i 3 døgn og deretter overført til vekstrom med standard betingelser. Etter tolv dager ble spirene overført til jord.

Kryssingen ble foretatt i stadium 6.30-6.50 (Boyes et al., 2001), da plantene hadde 30-50 % av blomstene åpne. På morplanten ble to blomster benyttet til kryssing. Alle andre blomster og skulper ble fjernet. Fra blomstene ble begerblad, blomsterblad og støvbærere fjernet med pinsett. Fruktbladet ble beholdt intakt.

Fra hannplanten ble en åpen blomst valgt. Den ble klemt sammen ved basen slik at blomsterdelene ble spredd og støvbærerne eksponert. Den konvekse overflaten til støvbærerne ble strøket over fruktbladet. Ved hjelp av stereolupe ble det observert pollen på arret og griffelen.

MATERIALER OG METODE

Modne frø ble høstet og tørket i varmeskap ved 28 °C i tre døgn. Frøene ble kalt generasjon-F₁.

Generasjon-F₁ *irp9 IRP1*-RNAi

Gassfasesteriliserte frø fra generasjon-F₁ frø ble sådd ut på petriskåler (D = 13 cm) på ½ MS medium tilsatt basta (sluttkonsentrasjon 10 µg/ml). Det ble sådd ut 70-90 frø per skål. Frøene ble stratifisert i 3 døgn og deretter overført til spirerom med standard betingelser

Etter seks til ni dager ble det kontrollert for zygositet. Begge linjene som inngikk i kryssingen linjene har BAR som selektiv markør. Den forventede raten for BAR^r:BAR^s var 15:16.

Fra petriskåler med korrekt rate ble det overført 30 spirer til jord. 14-20 dager gamle planter ble genotypet.

For å verifisere homozygot segresjon av En/Spm transposon-innskudd i *IRP9* primerparet dSPM-f + *IRP9*-SM-LP benyttet ved PCR-amplifisering. Fravær av genomisk *IRP9* ble verifisert med primerne Ko232 + *IRP9*-SM-RP. Innskudd RNAi ble verifisert med primerne Agri54 + Agri59. Primersekvensene er oppgitt i vedlegg A2.2.

Planter med ønsket genotype selvpollinerte. Frøene ble høstet ved modenhet og tørket i varmeskap ved 28 °C i tre døgn. Frøene ble kalt generasjon-F₂ og ble benyttet i forsøkene.

2.6 Transkripsjonsanalyser av gener i immunforsvaret

For å undersøke om et konstitutivt uttrykk av genene *IRP1* og *IRP9* aktiverer prosesser som kan knyttes til plantens basale immunforsvar, ble det gjennomført RT-qPCR av OE-linjer av *IRP1* og *IRP9* dyrket under standard betingelser. Genuttrykket ble målt for gener som representerer et utvalg av transkripsjonsfaktorer, enzymer og kjemiske forløperproteiner i plantens immunforsvar. Målgene er omtalt i Avsnitt 1.4.

Fra linjene 35S::*IRP1* 1.3.3, 35S::*IRP1* 3.2.1, 35S::*IRP9* 6.4.1, 35S::*IRP9* 7.1.1 og villtype ble 40-50 frø gassfasesterilisert og platet ut på ½ MS, 7 frø per petriskål (d = 13 cm). Frøene ble stratifisert i tre døgn og deretter overført til vekstom med standard betingelser.

Etter fjorten dager ble bladvev fra spirene høstet ved at roten ble kuttet fra med skalpell, og bladvevet overført direkte til flytende nitrogen. Spirene fra hver linje ble fordelt på fire parallelle prøver.

RNA-isolering, kontroll av renhet og kvalitet og RT-qPCR ble gjennomført som beskrevet overfor. Sekvensene for de benyttede primerparene ved RT-qPCR er oppført i Vedlegg A2.1.

Dataene ble analysert med programvarene LinReg og REST2009.

2.7 Abiotisk stress

UV-B bestråling av mutanter og dobbelmutant for *IRP1* og *IRP9*

For å undersøke om peptidene *IRP1* og *IRP9* inngår i stressrespons utløst av UV-B stråling, og om det er overlapp i funksjonen til peptidene, ble knockout/knockdownlinjene og dobbelmutanten bestrålt.

UV-B bestråling av plantene ble utført i to omganger adskilt i tid. Felles for gjennomføringene var at frø fra linjene villtype, *irp9*, *irp9 IRP1-RNAi* 11.2, *IRP1-RNAi* 7.1 og *IRP1-RNAi* 11.2 ble gassfasesterilisert og platet ut på ½ MS medium, 6 frø per petriskål (d = 9 cm). Frøene ble stratifisert to døgn og overført til spirerom med standard betingelser.

Ti dager gamle spirer av villtype, *irp9*, *IRP1-RNAi* 7.1 og *IRP1-RNAi* 11.2 ble overført til jord. 27 dager gamle planter ble bestrålt. Det ble benyttet 3 biologiske paralleller som hver bestod av bladvev fra 8 spirer.

Elleve dager gamle spirer av villtype og *irp9 IRP1-RNAi* 11.2.14 ble overført til jord. 25 dager gamle spirer ble bestrålt. Det ble benyttet 3 biologiske paralleller som hver bestod av bladvev fra 12 spirer.

UV-B strålingen ble gjennomført ved at alle biologiske paralleller ble bestrålt samtidig fra en horisontal UV-B lyskilde. Plantenes rosettblader ble bestrålt 15 minutt, med UV-B lys med bølgelengde 302 nm og innstrålingstetthet 6,1 W m⁻². Innstrålingstettheten ble målt i høyde med rosettbladene med optometer Modell 161 (United Detector Technology, San Diego, USA). Omregning av innstrålingstetthet til foton-flukstetthet er vist i Vedlegg A9.

Umiddelbart etter UV-B behandling ble de bestrålte plantene og kontrollplantene flyttet tilbake til vekstroom med standard betingelser, og observert i tre påfølgende dager.

Etter tre timer ble vev fra rosettbladene høstet direkte på flytende nitrogen. RNA-isolering, kontroll av renhet og kvalitet og RT-qPCR ble gjennomført som beskrevet i Avsnittene 2.2 og 2.3. Dataene ble analysert med LinReg og qBASE^{PLUS}.

2.8 Biotisk stress

Intercellulær vekst av *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000

For å undersøke om *IRP1* og *IRP9* har funksjon i signalspor nedstrøms for interaksjonen flagellin-FLS2 ble veksten til *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst* DC3000) undersøkt i de ulike linjene for *IRP1* og *IRP9* (knockout/knockdown og overuttrykk).

Forsøkene ble gjennomført separat for *IRP1* og *IRP9*. Frø fra linjene villtype, *irp9*, 35S::*IRP9* 6.4.1 og 35S::*IRP9* 7.1.1 eller villtype, *IRP1*-RNAi 7.1, *IRP1*-RNAi 11.2, 35S::*IRP1* 1.3.3 og 35S::*IRP1* 3.2.1 ble gassfasesterilisert.

I alle forsøkene ble det benyttet 24-brønnsplater. Hver brønn (d = 1 cm) ble fylt med 1 ml flytende ½ MS. Tre-fire frø ble sådd ut i hver brønn. Brønnplatene forseglet med Micropore kirurgisk tape. Etter tre døgn stratifisering ble brønnplatene plassert syv døgn i spirerom med standard betingelser.

Forberedelse av bakteriekultur for inokulering

1. Fra en lagerbeholdning med *Pst* DC3000 ble 100 µl bakteriekultur platet ut på LB-medium/rifampicin (sluttkonsentrasjon 50 µg/ml). Platen ble inkubert i varmeskap i to døgn ved 28 °C.
2. Fra platen i punkt 1 ble én bakteriekoloni (CFU, fra engelsk: «Cell forming unit») overført til et 15 ml sentrifugerør med 5 ml flytende Kings B medium/rifampicin (sluttkonsentrasjon 50 µg/ml). Løsningen ble inkubert i 8 – 12 timer i Incubator Shaker Series INNOVA44 (New Brunswick scientific, Stevenage, UK) ved 28 °C, ristehastighet 220 runder per minutt (RPM).
3. 100 µl bakteriekultur fra punkt 2 ble overført til 100 ml Kings B medium/rifampicin (sluttkonsentrasjon 50 µg/ml). Kulturen ble inkubert i risteinkubator i 8 – 12 timer ved 28 °C, ristehastighet 220 RPM.
4. 25 ml fra bakteriekulturen i punkt 3 ble overført til 50 ml sentrifugerør og sentrifugert ved 4 °C i 10 minutt i MegaFuge 1.0R «Heraeus» (DJB Labcare Ltd, Buckinghamshire, UK) ved 4 000 x g.
5. Supernatanten ble hullet av. Bakteriepelleten ble resuspendert i 25 ml MgCl₂ [10 mM] og sentrifugert i 5 minutt ved 4 000 x g, 4 °C. Vasketrinnet ble repetert en gang.
6. Bakteriepelleten ble løst i MgCl₂ til absorbans ved 600 nm var 0,02. Absorbansen ble målt med MBA 2000 spectrometer (Perkin Elmer, Massachusetts, USA) 0,02. Fra denne

MATERIALER OG METODE

løsningsen ble 100 µl blandet med 9,9 ml MgCl₂. Det tilsvarer en bakterietetthet på 10⁶ bakterier per ml.

Inokulering av spirer

1. Før inokulering med bakteriekultur ble spirene dyppet i Milli-Q vann, tørket og deretter overført til ny 24-brønnsplate tilsatt 1 ml flytende ½ MS uten sukker. Det ble benyttet 4 biologiske paralleller á 3 spirer for hver linje.
2. Til hver av brønnene ble det tilsatt 50 µl bakteriekultur fra punkt 6 over. Platene ble forselet med Micropore kirurgisk tape.
3. Platene ble inkubert ved 26 °C på ristebrett 45 - 50 RPM i Convironskap 1251 (Conviro, Winnipeg, Manitoba, Kanada). Det ble benyttet 4 lystoffrør av typen Sylvania ECO Octron 17W T8 4100K, PAR 58 µmol m⁻² s⁻¹ 24t/døgn.

Høsting og homogenisering av plantevev, fortynningsserie for fire paralleller og inkubering

1. Følgende prosedyre ble gjennomført 1, 2 og 3 dager etter inokulering:
2. Spirene ble vasket 10 - 15 sekund i 70 % (volum/volum) etanol og skylt 10 - 15 sekund i Milli-Q vann. Etter lett tørking ble spirene overført til 1,5 ml mikrotuber tilsatt 100 µl kald MgCl₂ [10 mM] og knust med en pistill til løsningen var homogen. Pistillen ble skylt med ytterligere 100µl MgCl₂ [10 mM].
3. Det ble laget fortynningsserier av løsningene med homogent plantevev. For dag en ble fortynningene 10⁻², 10⁻³ og 10⁻⁴ benyttet. For andre dag ble fortynningene 10⁻³, 10⁻⁴ og 10⁻⁵ benyttet, og for tredje dag fortynningene 10⁻⁴, 10⁻⁵ og 10⁻⁶. Fortynningsvæsken var MgCl₂ [10 mM].
4. Det fortynnete plantevevet ble platet ut på petriskåler (d = 9 cm) på LB medium/ rifampicin (sluttkonsentrasjon 50 µg/ml). Hver plate inneholdt fire biologiske paralleller fra én fortynning.
5. Platene ble inkubert ved 28 °C i 18-24 timer og deretter overført til kjølerom ved 4 °C i 12-18 timer. Koloniene ble talt.
6. Det ble gjennomført variansanalyse og sammenlignende statistiske tester av verdiene ved hjelp av programvaren IBM SPSS statistic 20.

Undersøkelse av rotvekst til spirer dyrket i medium tilsatt Flg22-peptid

Vekstreduksjon av røtter ved tilsetning av Flg22 til vekstmediet ble vist av Gomez-Gomez et al. (1999) og er en etablert metode for å studere geners innflytelse i spor nedstrøms for Flg22-FLS2 interaksjonen. Metoden ble benyttet for å undersøke om de ulike linjene for *IRP9* (knockout, dobbelknockout og OE) var signifikant forskjellig fra tilsvarende endringer i villtype.

Frø fra linjene 35S::*IRP9*, 6.4.1, 35S::*IRP9* 7.1.1, *irp9*, og villtype ble gassfasesterilisert. 10 – 12 frø ble platet ut på linje på firkantplatene (s = 12 cm). Det ble benyttet seks plater per linje, der tre plater bestod av ½ MS medium (kontrollmedium) og tre plater besto av ½ MS tilsatt Flg22 [100 nM].

Frøene ble stratifisert i tre døgn og deretter plassert vertikalt i stativ på spirerom med standard vekstbetingelser.

Spirene ble fotografert etter seks, elleve og femten dager. Rotlengden ble målt ved bruk av programvaren ImageJ (utviklet av National Institutes of Health, USA, tilgjengelig fra <http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

Det ble gjennomført variansanalyse og sammenlignende statistiske tester av verdiene ved hjelp av programvaren IBM SPSS statistic 20.

2.9 Analyser av data

Dataanalyser med programvarene LinReg, REST2009 og qBASE^{PLUS}

Rådata fra LightCycler[®] 480 ble analysert med LinReg (<http://www.hartfaalcentrum.nl>). LinReg beregnet baselinjekorrigert individuell C_q-verdi for alle prøvene, samt individuell og gjennomsnittlig primereffektivitet. Gjennomsnittlig primereffektivitet og individuell C_q-verdi ble benyttet ved videre analyser med programvarene REST2009 (<http://www.qiagen.com>) eller qBASE^{PLUS} (<http://www.biogazelle.com/>).

REST2009-analyser beregnet raten for genuttrykket for målgenet relativt til kontrollgenet. Det ble benyttet en randomiserende statistisk test for å undersøke nullhypotesen: «Forskjellene i genuttrykk av behandlede prøver og kontrollprøver skyldes tilfeldigheter». 95 % konfidensintervall og standard feil (SE) ble beregnet ved å bruke bootstrapping metode. (Pfaffl et al., 2002). Ved bruk av programvaren REST2009 ble flere målgener for hver linje undersøkt samtidig.

MATERIALER OG METODE

Programvaren qBASE^{PLUS} representerte et nyere alternativ for genuttrykksanalyser. Programvaren utviste større fleksibilitet ved analyser av datasettene, ved at det var mulig å importere data fra genuttrykksmålinger fra flere linjer samtidig og ved at programvaren hadde et større utvalg av statistiske tester enn REST2009. Det gjorde det mulig å analysere sammenhenger mellom flere linjer og målgener samtidig. Nullhypotesen som ble undersøkt var som for analyser med REST2009: «Forskjellene i genuttrykk av behandlede prøver og kontrollprøver skyldes tilfeldigheter» (Hellemans, 2013).

Resultatene fra qBASE^{PLUS}-analysene omfattet gjennomsnittlig rate for endring i genuttrykk relativt til kontroll og 95 % konfidensintervall. Datasettet ble analysert med enveis ANOVA, og ved signifikante endringer i genuttrykket ble innebygget Tukey-HSD post hoc test benyttet. De statistiske analysene ble utført på log₁₀-transformerte data. Resultatene ble reskalert til lineær form relativt til en selvbestemt gruppe (Hellemans, 2013).

Statistiske tester

I forsøkene hvor intercellulær vekst av *Pst* DC3000 og undersøkelse av rotvekst til spirer som vokste i medium tilsatt Flg22-peptid ble statistiske undersøkelser utført med programvaren IBM SPSS Statistics 20. Dataenes gruppegjennomsnitt ble testet med enveis ANOVA. Nullhypotesen var: «Alle gruppegjennomsnitt tilhører samme populasjon».

I forsøket hvor rotveksten til spirer som vokste i medium tilsatt Flg22-peptid ble undersøkt, ble toveis ANOVA benyttet for å undersøke mulig signifikant interaksjon mellom variablene «Rotlengde i kontrollmedium versus medium tilsatt Flg22-peptid» og «villtype versus transgen linje». Nullhypotesen var: «Den resulterende effekt av variablene er lik for alle linjene».

Forutsetninger for å kunne bruke ANOVA-tester er at dataene er uavhengige, normalfordelte og at de har lik varians (Pallant, 2010). Shapiro-Wilk-test ble utført for å teste dataenes normalfordeling. Nullhypotesen var: «Alle målinger tilhører samme populasjon». Levenes test ble anvendt for å teste likhet i gruppevariansene. Nullhypotesen var: «Variansen til de ulike gruppegjennomsnittene som sammenlignes er homogen».

Enveis ANOVA gir signifikant p-verdi dersom ett eller flere gruppegjennomsnitt er signifikant forskjellig fra de øvrige. Ved signifikante forskjeller mellom gruppegjennomsnittene ble post hoc-testen Tukey honestly significant difference (HSD) anvendt for

MATERIALER OG METODE

data med homogen varians. I de tilfellene variansen ikke var homogen ble post hoc-testen Games-Howell benyttet.

3 RESULTATER

Fokuset i masterarbeidet har vært på genene *IRP1* (At4g28460), *IRP9* (At2g23270) og *IRP10* (At4g37290) og deres genfunksjoner knyttet til stressresponser. Den benyttede tilnærmingen i studiene var å utsette plantene for abiotisk og biotisk stressbehandling og søke etter spesifikke fenotype i linjer med avslått, nedregulert eller overuttrykt transkripsjon av genene.

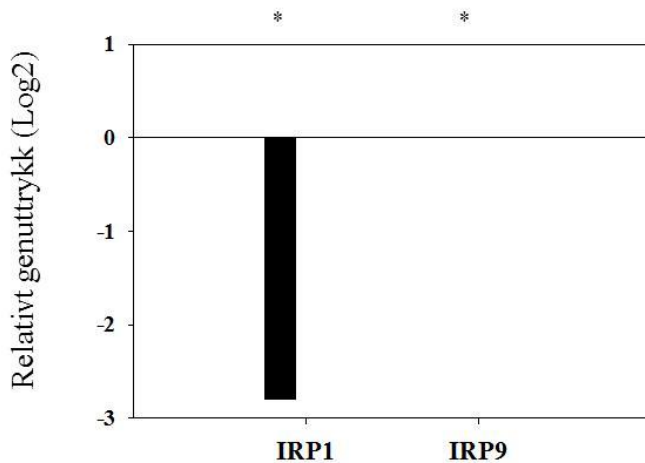
3.1 Genotyping og verifisering av linjer til bruk i forsøk

Dobbelknockoutlinjer

Fra Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC, <http://arabidopsis.info>) ble det kjøpt og verifisert én En/Spm transposon knockout linje for *IRP9* og to AGRİKOLA RNAi linjer for *IRP1*, navngitt *IRP1*-RNAi 7.1 og *IRP1*-RNAi 11.2. Fra mutanten *irp9* og de to *IRP1*-RNAi-linjene ble det generert to dobbelmutantlinjer, som beskrevet i Avsnitt 2.5. De kryssede linjene ble navngitt *irp9 IRP1*-RNAi 7.1 og *irp9 IRP1*-RNAi 11.2. Blant 30 linjer av dobbelmutanten *irp9 IRP1*-RNAi 11.2 ble det, ved genotyping, verifisert én linje som var homozygot for *irp9* knockout og i tillegg hadde innsatt hpRNA. Derimot ble det blant 60 linjer av dobbelmutanten *irp9 IRP1*-RNAi 7.1 ikke verifisert noen linjer som hadde begge trekkene.

Det ble gjennomført RT-qPCR analyse for målgenene *IRP1* og *IRP9* i linje *irp9 IRP1*-RNAi 11.2. Resultatene fra LinReg- og REST2009-analysene er vist i Vedleggene A4.1 og A5.1. I Figur 3.1.1, neste side, viser genuttrykket av *IRP1* og *IRP9* relativt til villtype. *IRP1* var omtrent seks ganger nedregulert, mens uttrykket av *IRP9* var uregulert.

RESULTATER



Figur 3.1.1. Relativt uttrykk av genene *IRP1* og *IRP9* i dobbelmutantlinjen *irp9 IRP1-RNAi 11.2*. Bladvev fra 21 dager gamle spirer dyrket under normale forhold ble høstet og analysert med RT-qPCR. Kolonnene viser uttrykk av én plante relativt til villtype, log₂-transformert. Asterisk indikerer signifikant ($p < 0,05$) forskjell fra villtype beregnet med programvaren REST2009.

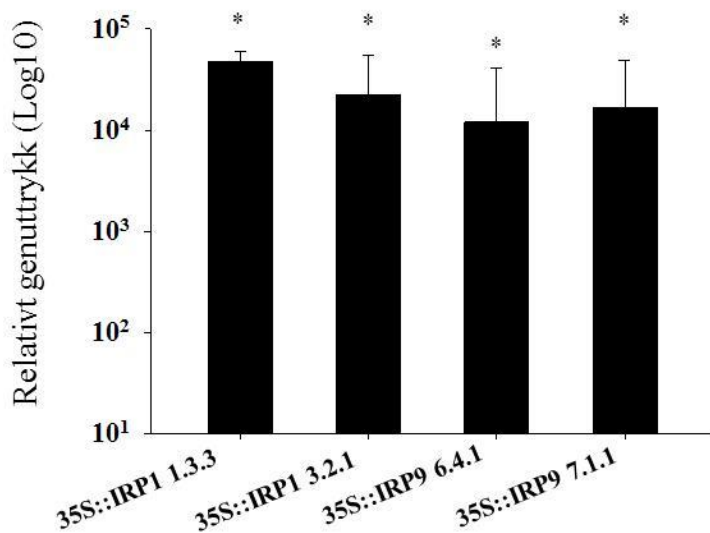
Overuttrykkslinjer

For genene *IRP1*, *IRP9* og *IRP10* var det generert overuttrykkskonstruksjoner (Javad Najafi, upublisert material). Disse konstruksjonene ble laget ved å klonere cDNA fra det aktuelle genet inn i vektoren pEarlyGate (pEG)100, der genet plasseres under kontroll av overuttrykkspromoteren 35S fra Cauliflower Mosaic Virus (CaMV) (Earley et al., 2006). Vektoren inneholder også seleksjonsmarkøren *BIALAPHOS RESISTANCE (BAR)*, som koder for PHOSPHINOTHRICIN ACETYLTRANSFERASE og gir resistens mot basta (D'Halluin et al., 1992). Plantene ble transformert med konstruksjonen ved å benytte *A. tumefaciens*-mediert T-DNA-infiltrasjonsmetode (Clough og Bent, 1998). De transformerte plantene selvpollinerte, og avkom fra de to påfølgende generasjonene (kalt generasjon-T₁ og -T₂) ble undersøkt for segregasjon av 35S-konstruksjonen. Genuttrykket for generasjon-T₂ linjer med korrekt frekvens ble kontrollert med RT-qPCR og påfølgende analyser med LinReg og REST2009.

Frekvensanalysene for overuttrykkslinjene for genene *IRP1* og *IRP9* var gjennomført før dette masterarbeidet ble påbegynt. Frekvensene for BAR-resistens:BAR-sensitivitet (BAR^r:BAR^s) for linjen 35S::*IRP10* i generasjon-T₁ og -T₂ er gitt i Vedlegg A3. Data fra LinReg-analysene er oppført i Vedlegg A4.2 og analysene fra REST2009 i Vedlegg A5.2. Analysene fra REST2009 viste økt genuttrykk i to linjer med overuttrykkskonstruksjon for henholdsvis

RESULTATER

IRP1 og *IRP9*, men ikke for noen linjer *IRP10*. Figur 3.1.2 viser genuttrykket for overuttrykkslinjene med økt genuttrykk.



Figur 3.1.2. Genuttrykk for linjer som overuttrykker henholdsvis *IRP1* og *IRP9*. Bladvev ble høstet fra 21 dager gamle spirer dyrket under normale forhold og analysert med RT-qPCR. Kolonnene viser gjennomsnittlig genuttrykk, for tre biologiske replika relativt til villtype. Verdiene er log10-transformert. Feilfeltene viser 95 % konfidensintervall og asterisk indikerer signifikant ($p < 0,05$) forskjell fra villtype, beregnet med REST2009.

En samlet oversikt over linjene som ble brukt i masterarbeidet er gitt i Tabell 3.1.

Tabell 3.1. Oversikt over linjene som ble benyttet til forsøk i oppgaven.

Gen	Type transformasjon	Uttrykk	Navn
<i>IRP1</i>	35S-promoter	Overuttrykk	35S::IRP1 1.3.3
	35S-promoter	Overuttrykk	35S::IRP1 3.2.1
	RNAi-linje	Knockdown	IRP1-RNAi 7.1
	RNAi-linje	Knockdown	IRP1-RNAi 11.2
<i>IRP9</i>	35S-promoter	Overuttrykk	35S:: <i>IRP9</i> 6.2.1
	35S-promoter	Overuttrykk	35S:: <i>IRP9</i> 7.1.1
	En/Spm transposon	Knockout	<i>irp9</i>
<i>IRP9</i> og <i>IRP1</i>	En/Spm transposon	Dobbel knockout/	<i>irp9 IRP1</i> -RNAi 11.2
	RNAi-linje	Knockdown	

3.2 Transkripsjonsanalyser av ulike målgener i basalt immunforsvar

Det er satt fram en hypotese om at de antatte sekreerte peptidene som kodes av genene *IRP1* og *IRP9* har en regulerende effekt i plantens immunforsvar. I dette forsøket ble det undersøkt om overuttrykk av genene har en mulig innflytelse i signalspor i plantens basale immunforsvar.

Det ble utført transkripsjonsanalyser med RT-qPCR av ulike målgener i planter dyrket under normale betingelser. Målgenene som ble undersøkt (Avsnitt 1.4) representerer et utvalg av transkripsjonsfaktorer, enzymer og kjemiske forløperproteiner som inngår i plantenes basale immunforsvar. De ble valgt på bakgrunn av data fra mikromatriseanalyser utført på cDNA fra friske planter som var sprayet med syntetisk deriverte peptider av *IRP1* og *IRP9* (Javad Najafi, upublisert material).

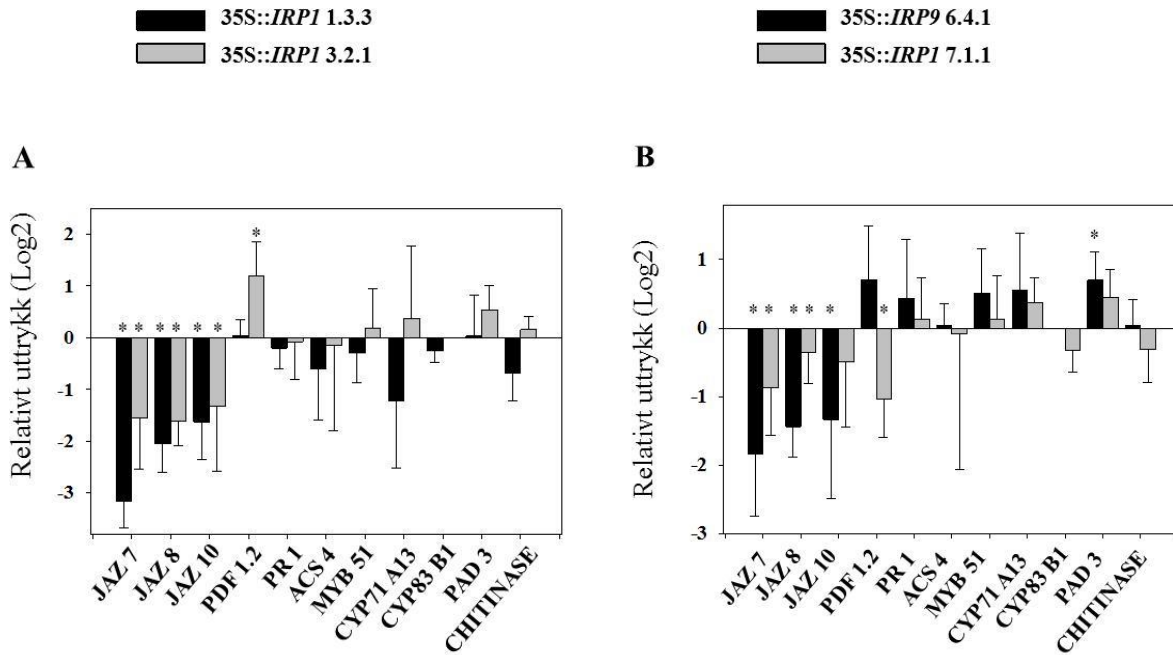
Dataene fra RT-qPCR-forsøkene ble analysert med LinReg og REST2009. Cq-verdier og verdiene for primereffektivitet er oppført i Vedlegg A4.3. Relativt genuttrykk, 95 % konfidensintervall og resultater fra hypotesetesting er oppført i Vedlegg A5.3. Figur 3.2.1, neste side viser transkribert uttrykk av målgenene i to ulike overuttrykkslinjer for henholdsvis *IRP1* (A) og *IRP9* (B).

Med ett unntak (*JAZ10* i linje 35S::*IRP9* 7.1.1) vises det for alle overuttrykkslinjene en signifikant ($p < 0,05$) nedregulering av uttrykket til *JAZ*-genene relativt til villtype. Den største nedreguleringen ble observert for *JAZ7* i linje 35S::*IRP1* 1.3.3, og er på mer enn åtte ganger. I *IRP1*-overuttrykkslinjene er de øvrige *JAZ*-genene tre-fire ganger nedregulert. I linje 35S::*IRP9* 6.4.1 er også nedreguleringen av *JAZ*-genene omtrent tre ganger, mens i linje 35S::*IRP9* 7.1.1 er nedreguleringen 1-2 ganger.

Plantedefensingenet *PDF1.2* er i linje 35S::*IRP1* 3.2.1 signifikant oppregulert omtrent to ganger, men likt uttrykt som villtype i OE-linje 1.3.3. I overuttrykkslinjene for *IRP9* er *PDF1.2* omtrent halvannen gang oppregulert i linje 6.4.1, men signifikant nedregulert to ganger i linje 7.1.1.

For de resterende målgenene, med unntak av *PAD3*, var genuttrykket i de fire overuttrykkslinjene tilnærmet likt genuttrykket i villtype. For *PAD3* i linje 35S::*IRP9* 6.4.1 ble det vist en signifikant oppregulering på omtrent halvannen gang, mens uttrykket ikke var signifikant forskjellig fra villtype i OE-linje 1.7.7.

RESULTATER



Figur 3.2.1 Relativt uttrykk av genene *JAZ7*, *JAZ8*, *JAZ10*, *PDF1.2*, *PR1*, *ACS4*, *MYB51*, *CYP71A13*, *CYP83B1*, *PAD3* og *CHITINASE* i overuttrykkslinjene (A) 35S:*IRP1* 1.3.3 og 3.2.1, og (B) 35S:*IRP9* 6.4.1 og 7.1.1. RT-qPCR ble utført på bladvev, høstet fra 14 dager gamle spirer dyrket under normale forhold. Kolonnene viser relativt uttrykk, log₂-transformert, fra gjennomsnitt av fire biologiske replika, hver bestående av minst 10 spirer. Gener som ble likt uttrykt som villtype avbildes med verdien 0, mens gener oppregulert relativt til villtype avbildes med kolonner med positive verdier. Gener som er nedregulert avbildes med kolonner med negative verdier. Feilfeltene viser standardfeil og asterisk indikerer signifikant ($p < 0,05$) forskjell fra villtype beregnet med programvaren REST2009. RT-qPCR-analysene ble repetert én gang (samme RNA) med lignende resultater.

3.3 Transkripsjonsanalyser etter UV-B stråling

IRP1, *IRP9* og *IRP10* antas å være sekreerte peptider som tilhører samme subfamilie fordi de har en lignende oppbygning med signalpeptid i N-terminal ende, og en konservert aminosyresekvens i C-terminal ende (Ane Kjersti Vie, upublisert material). I tillegg er det stor likhet mellom aminosyresekvensene til proteinene *IRP9* og *IRP10*. Det antas derfor at *IRP9* og *IRP10* kan ha overlappende funksjoner i de signalsporene de inngår i.

For å undersøke om *IRP1* og *IRP9* inngår i signalspor nedstrøms for UV-B stråling, og om *IRP9* og *IRP10* har overflødigheitsfunksjoner i signalsporene, ble knockout- og knockdown-mutanter for genene bestrålt 15 minutter med UV-B-stråling med bølgelengde 302 nm og

RESULTATER

innstrålingstetthet på $6.1 \text{ J m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Etter tre timer ble bladvevet høstet. Det ble utført transkripsjonsanalyse ved RT-qPCR for målgenene *IRP1*, *IRP9* og *IRP10*. *HY5* ble benyttet som positiv kontroll i forsøket. Plantene ble etter bestråling flyttet tilbake til normale forhold og observert tre påfølgende dager. Det ble ikke observert synlige forskjeller mellom kontrollplantene og UV-B bestrålte planter.

Data fra RT-qPCR ble analysert med programvarene LinReg og qBASE^{PLUS}. Resultatene fra LinReg er vist i Vedlegg A4.4. Relativt genuttrykk, 95 % konfidensintervall og resultatene fra enveis ANOVA, beregnet med qBASE^{PLUS} er oppført i Vedlegg A6. Figur 3.3.1, neste side, viser relativt genuttrykk for målgenene *IRP1* (A), *IRP9* (B), *IRP10* (C) og *HY5* (D).

Genuttrykket for målgenet *IRP1* i ubehandlet tilstand i de to RNAi knockdown-linjene (Figur 3.3.1 A) er signifikant nedregulert relativt til villtype. Genuttrykket av *IRP1* i dobbelmutanten er tilnærmet likt uttrykket i villtype.

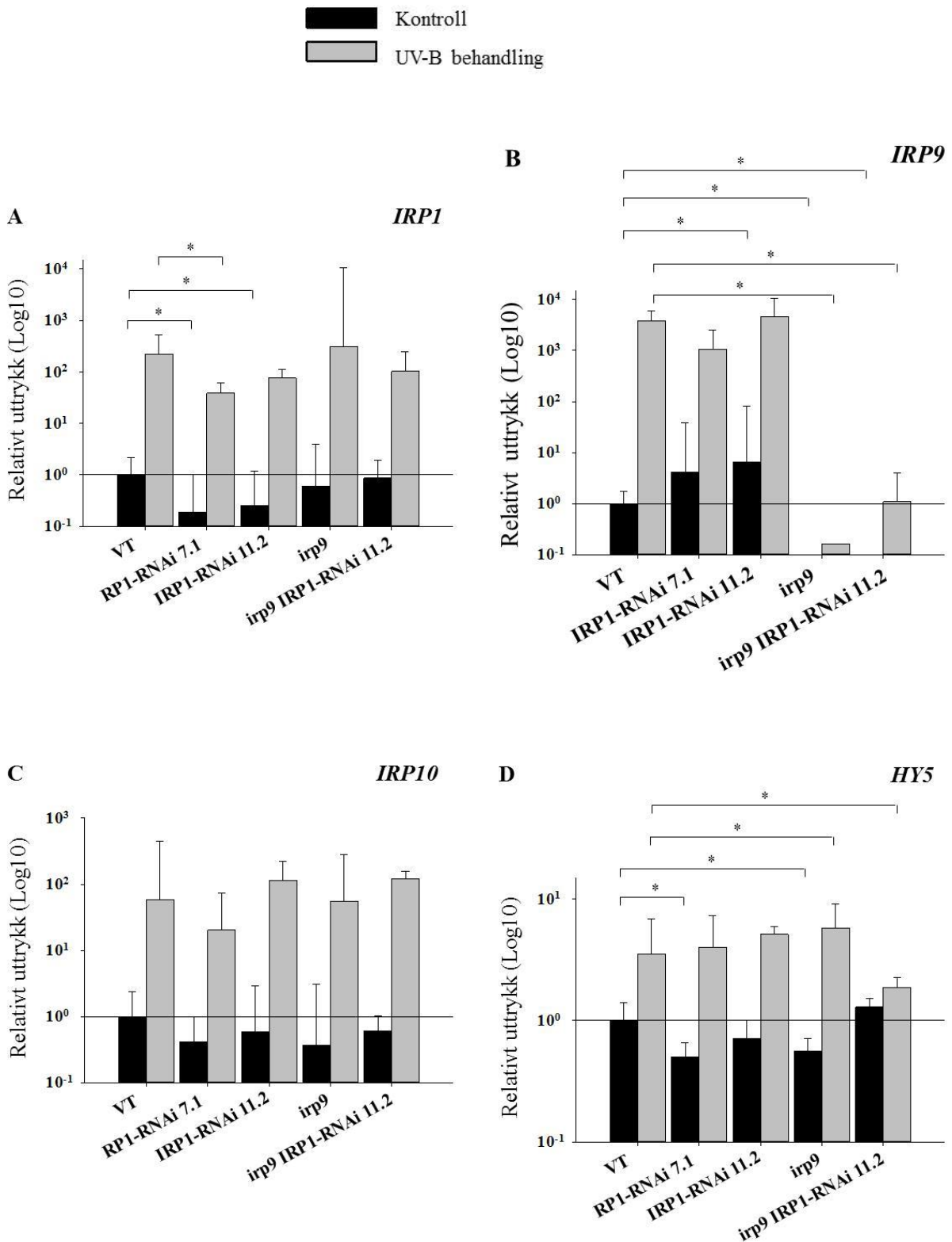
Villtype og *irp9*-mutanten viser høyest oppregulering av *IRP1* etter UV-B behandling. Genuttrykket i RNAi linjene etter UV-B behandling er betydelig oppregulert relativt til ubehandlet kontroll. Uttrykket i linje *IRP1*-RNAi 7.1 er signifikant lavere enn uttrykket i villtype. For knockdown linje RNAi 11.2 og dobbelmutant linje er genuttrykket relativt til villtype ikke signifikant lavere.

I analysene utført for målgenet *IRP9*, Figur 3.3.1 B, er transkripsjonen uregulert i ubehandlede kontroller for *irp9*-mutanten og dobbelmutanten *irp9 IRP1*-RNAi 11.2. Ved UV-B stråling oppreguleres genuttrykket for villtype mer enn 3700 ganger, mens effekten av knockout-mutasjonen i *irp9*-mutantenene bekreftes ved at genuttrykket forblir tilnærmet uregulert. Genuttrykket av *IRP9* i *IRP1*-RNAi linjene er ikke signifikant forskjellige fra villtype.

Figur 3.3.1 C viser transkripsjonsanalysene for målgenet *IRP10*. Det ble ikke påvist signifikante forskjeller relativt til villtype i ubehandlede eller UV-B behandlede linjer. Det bemerkes likevel at genuttrykket av *IRP10* i linjene *IRP1*-RNAi 11.2 og *irp9 IRP1*-RNAi 11.2 etter UV-B behandling er omtrent det dobbelte relativt til villtype.

HY5 (Figur 3.3.1 D) ble benyttet som positiv kontroll i eksperimentet. Ved transkripsjonsanalyser av dette målgenet ble det for dobbelmutanten *irp9 IRP1*-RNAi 11.2 vist en manglende oppregulering av genuttrykket etter UV-B behandling. I *irp9*-mutanten ble det vist en signifikant økning i genuttrykk ved UV-B behandlingen, relativt til villtype.

RESULTATER



Figur 3.3.1. Effekt av UV-B bestråling i knockout og knockdown linjer for genene *IRP1* og *IRP9*. Linjene villtype, *IRP1*-RNAi 7.1, *IRP1*-RNAi 11.2, *irp9* og *irp9 IRP1*-RNAi 11.2 ble UV-B bestrålt 15 minutter ved bølgelengde 302 nm og innstrålingstetthet 6,1 J m⁻² s⁻¹. Bladvev ble høstet etter tre timer, og RT-qPCR ble gjennomført for målgene *IRP1*, *IRP9*

RESULTATER

og *IRP10*. *HY5* var positiv kontroll i forsøket. Kolonnene representerer relativt genuttrykk sammenlignet med ubehandlet villtype, som er gitt verdien 1. Alle verdiene er log₁₀-transformert. For hver linje ble relativt genuttrykk beregnet fra tre biologiske replika, hver bestående av 8-12 spirer. Feilfeltene viser 95 % konfidensintervall. Asterisk indikerer signifikante ($p < 0,05$) forskjeller beregnet med enveis ANOVA utført med programvaren qBASE^{PLUS}. For alle linjene resulterte UV-B strålingen, med ett unntak, i en signifikant økning av genuttrykkene relativt til ubehandlet kontroll. Responsen er ikke markert med asterisk på figurene. Unntaket var *irp9 IRP1*-RNAi 11.2. Forsøket ble utført én gang.

3.4 Intercellulær vekst av *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000

For å undersøke om *IRP1* og *IRP9* har en funksjon i signalspor nedstrøms for interaksjonen Flg22/FLS2 ble intercellulær vekst av *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst* DC3000) studert over tid i knockout/ knockdown- og OE-linjer for *IRP1* og *IRP9*.

I dette forsøket ble antall kolonidannende enheter (CFU, fra engelsk: «Cell forming units») per spire benyttet som et mål på den bakterielle veksten. Bladvev fra fire paralleller med *Arabidopsis*-spirer ble knust og seriefortynnet. Antall CFU ble beregnet som gjennomsnittet av fire biologiske paralleller som viste tellbar vekst i tre ulike fortynninger. Det var vanskelig å få nøyaktigheten i metoden så god at forskjellene i antall CFU for de fire biologiske parallellene varierte innenfor samme tierpotens. Resultatene fremstilt i Figur 3.4.2, neste side, er datasettet som viste lavest standardavvik.

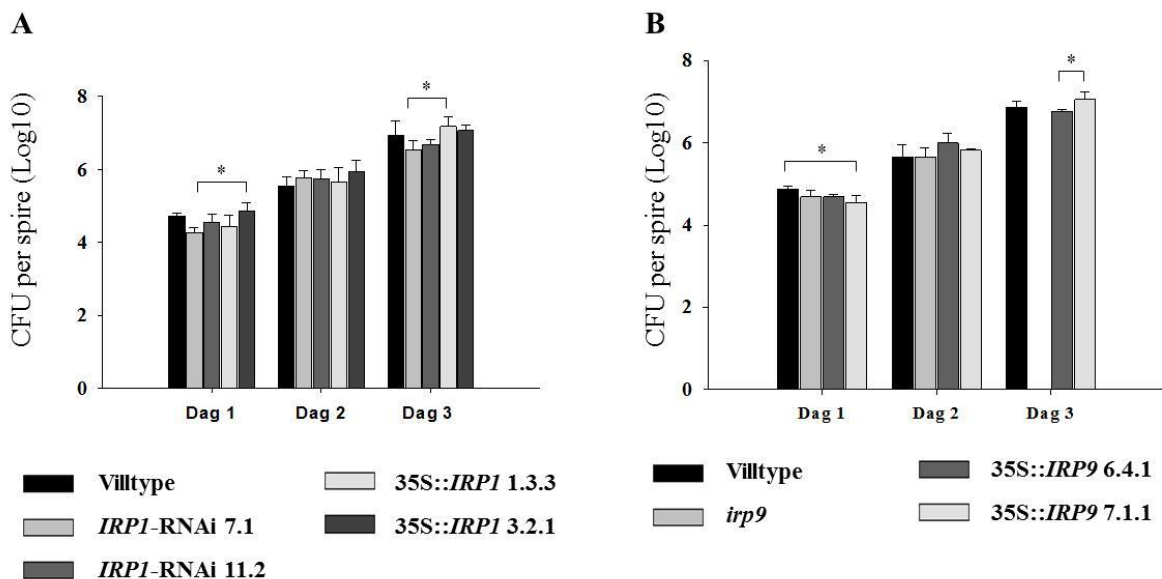
Verdiene for bakterieforøkelse per spire i de ulike transformerte linjene er vist i Vedlegg A7.

Figur 3.4.1 viser forsøksoppsettet. Figur 3.4.2 viser grafisk antall CFU per spire for RNAi-linjer og OE-linjer for *IRP1* (A) og *irp9*-mutant og OE-linjer for *IRP9* (B).

RESULTATER



Figur 3.4.1 Forsøksoppsett for analyse av intracellulær vekst av *Pst* DC3000 i *Arabidopsis*. Spirene ble dyrket i 24 brønns plater, én plate for hver dag etter inokulering, til sammen tre plater per forsøk. Hver brønn inneholdt 1 ml flytende ½ MS (uten sukker), inokulert med 50 µl bakteriekultur med bakterietetthet 10^6 CFU per ml. Etter inokulering ble spirene dyrket under konstant lys ($50\text{--}65 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ved 28°C på ristebrett (46 RPM) i henholdsvis én, to og tre dager. På brønnplaten avleses de ulike linjene horisontalt, mens de vertikale rekkene viser fire biologiske paralleller á tre spirer.



Figur 3.4.2 Bakterievekst av *Pst* DC3000 i knockdown og overuttrykkslinjer for *IRP1* (A), og knockout og overuttrykkslinjer for *IRP9* (B). Sju dager gamle spirer ble inokulert med *Pst* DC3000 bakteriekultur. Bakterieveksten ble målt første, andre og tredje dag etter inokulering. (A) viser bakterievekst i villtype, *IRP1*-RNAi 7.1, *IRP1*-RNAi 11.2, 35S::*IRP1* 1.3.3 og 35S::*IRP1* 3.2.1, mens (B) viser bakterievekst i villtype, *irp9*, 35S::*IRP9* 6.4.1 og 35S::*IRP9* 7.1.1. Kolonnene viser log₁₀-transformerte verdier for gjennomsnittlig CFU per spire beregnet fra fire biologiske replika, á tre spirer. Feilfeltet viser standardavvik. Enveis ANOVA ble utført på log₁₀-transformerte gruppegjennomsnitt. Asterisk indikerer signifikant forskjell ($p < 0,05$).

RESULTATER

Ved normalitetstesting av linjene som inngikk i undersøkelse av *IRP1* ble det påvist manglende normalfordeling for villtype, dag 1. For å kunne utføre videre testinger ble en parallell med verdien 4,61 fjernet som avviker. De tre øvrige parallellene hadde verdiene 4,76, 4,77 og 4,75 og utgjorde gruppegjennomsnittet som ble benyttet i de videre testene. Ved test av linjene som inngikk i undersøkelse av *IRP9* antydte verdiene for *irp9*-mutanten ved dag tre to separate gruppegjennomsnitt, hvilket medførte at gruppen ble ekskludert fra analysene. En oppsummering av testene utført med enveis ANOVA og Tukey HSD post hoc test, er oppført i Tabellene 3.6.1 og 3.6.2. Testene ble utført med programvaren IBM SPSS Statistics 20.

Tabell 3.6.1. Tabellen viser en oversikt over gjennomsnittlig CFU per spire og standardavvik for RNAi-linjene og OE-linjene for *IRP1*. Verdiene er log10-transformert. Gruppene ble testet med signifikansnivå $p < 0,05$. Linjene som innenfor samme dag som hadde likt gruppegjennomsnitt er gitt samme bokstav. Linjene som viste signifikante forskjeller innenfor samme dag er gitt ulike bokstaver og er markert med asterisk.

Linje	Dag 1	Dag 2	Dag3
Villtype	4,76 ± 0,01 ^a	5,54 ± 0,25 ^a	6,94 ± 0,40 ^a
<i>IRP1</i> -RNAi 7.1	4,27 ± 0,13 ^{b*}	5,76 ± 0,22 ^a	6,54 ± 0,24 ^{b*}
<i>IRP1</i> -RNAi 11.2	4,55 ± 0,23 ^a	5,73 ± 0,26 ^a	6,68 ± 0,15 ^a
35S:: <i>IRP1</i> 1.3.3	4,42 ± 0,38 ^a	5,66 ± 0,38 ^a	7,18 ± 0,27 ^{c*}
35S:: <i>IRP1</i> 3.2.1	4,85 ± 0,24 ^{c*}	5,94 ± 0,33 ^a	7,07 ± 0,16 ^b

Tabell 3.6.2. Tabellen viser en oversikt over gjennomsnittlig CFU per spire og standardavvik for *irp9*-mutant og OE-linjene for *IRP9*. Verdiene er log10-transformert. Gruppene ble testet med signifikansnivå $p < 0,05$. Linjene som innenfor samme dag hadde likt gruppegjennomsnitt er gitt samme bokstav. Linjene som viste signifikante forskjeller innenfor samme dag er gitt ulike bokstaver og er markert med asterisk. Knockout-mutanten *irp9* ble utelatt fra testene dag tre på grunn av manglende normalfordeling av gruppegjennomsnittet.

Linje	Dag 1	Dag 2	Dag3
Villtype	4,86 ± 0,09 ^{a*}	5,65 ± 0,30 ^a	6,86 ± 0,16 ^a
<i>irp9</i>	4,68 ± 0,16 ^b	5,82 ± 0,23 ^a	
35S:: <i>IRP9</i> 6.4.1	4,69 ± 0,05 ^b	5,99 ± 0,23 ^a	6,76 ± 0,04 ^{b*}
35S:: <i>IRP9</i> 7.1.1	4,55 ± 0,18 ^{c*}	5,82 ± 0,03 ^a	7,07 ± 0,19 ^{c*}

Følgende observasjoner, ikke dokumentert med bilder eller målinger, ble gjort dag tre i forsøkene som involverte de ulike *IRP1*-linjene: Klorose ble i noe grad observert i overuttrykkslinjene og villtype, og i mindre grad i RNAi-linjene. Det ble også observert at

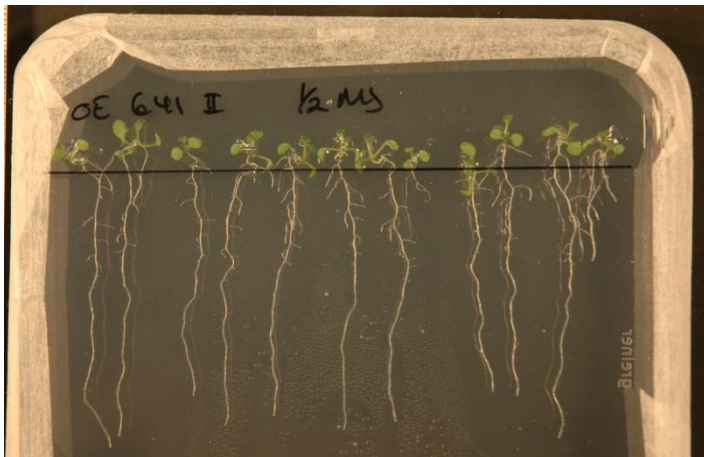
RESULTATER

bladarealet for overuttrykkslinjene var større enn for villtype og RNAi-linjene. I forsøkene med de ulike *IRP9*-linjene ble det ikke observert klorose.

3.5 Effekt på rotvekst ved Flg22-peptid tilsatt vekstmedia

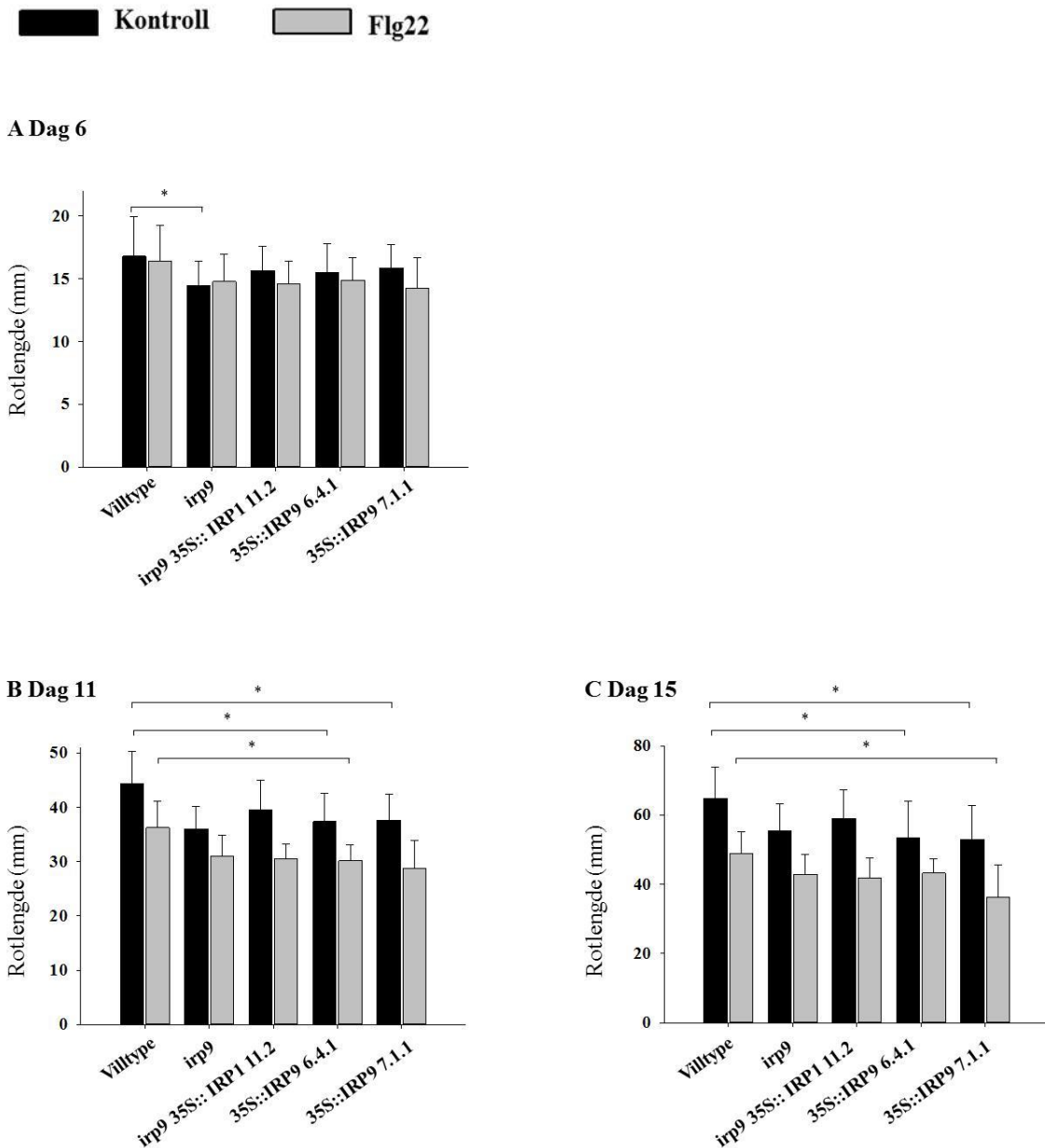
Gomez-Gomez et al. (1999) viste at tilsetning av Flg22-peptid til vekstmediet ledsages av reduksjon i plantenes rotvekst. Vekstreduksjon er etablert som metode for å studere signalspor nedstrøms for Flg22-FLS2 interaksjonen. I dette forsøket ble effekten av Flg22-peptid tilsatt vekstmedia utført for å undersøke om *IRP9* inngår i responser nedstrøms for Flg22-FLS2. Villtype, *irp9*-mutant, OE-linjene av *IRP9*, og dobbelmutanten *irp9 IRP1*-RNAi 11.2 inngikk i forsøket. Frø ble platet ut på firkantplater som ble stilt vertikalt og ble dyrket under normale betingelser. Rotveksten ble målt etter seks, elleve og femten dager.

Figur 3.5.1 viser forsøksoppsettet. Resultatene er grafisk fremstilt i Figur 3.5.2. Gjennomsnittlig rotlengde og tilhørende standardavvik, samt resultater fra enveis og toveis ANOVA er oppført i vedlegg A8.



Figur 3.5.1. Dyrkningsoppsett for rotvekst-eksperiment. Bildet viser rotvekst etter seks dager for linje 35S::*IRP9* 6.4.1, dyrket på kontrollmedium. For hver linje som inngikk i forsøket ble det benyttet tre plater med henholdsvis ½ MS (kontrollmedium) og ½ MS tilsatt Flg22 [100 nM]. Ti- til tretten frø ble platet på en horisontal linje, som vist på figuren. Platene ble deretter plassert vertikalt i stativ og dyrket under normale betingelser.

RESULTATER



Figur 3.5.2. Rotvekst hos villtype, *irp9*, *irp9-IRP1-RNAi* 11.2, *35S::IRP9* 6.4.1 og *35S::IRP9* 7.1.1 under påvirkning av Flg22. Spirer ble dyrket på vertikale plater med kontrollmedium ($\frac{1}{2}$ MS) eller $\frac{1}{2}$ MS tilsatt Flg22 [100 nM]. Rotlengden ble målt etter 6 (A), 11 (B) og 15 (C) dager med programvaren ImageJ. Gjennomsnittlig rotlengde ble analysert med enveis ANOVA og post hoc testene Tukey HSD (6 og 15 dager) og Games-Howell (11 dager). Kolonnene viser gjennomsnittlig lengde for tre biologiske replika, hver bestående av ≥ 10 spirer. Feilfeltene viser standardavvik. Asterisk indikerer signifikant forskjell ($p < 0,05$). For dagene 11 og 15 var rotlengdene til spirene som vokste på medium tilsatt Flg22 signifikant kortere) enn spirene som vokste på kontrollmedium. Det er ikke indikert med asterisk på figurene. Forsøket ble repetert en gang med lignende resultater.

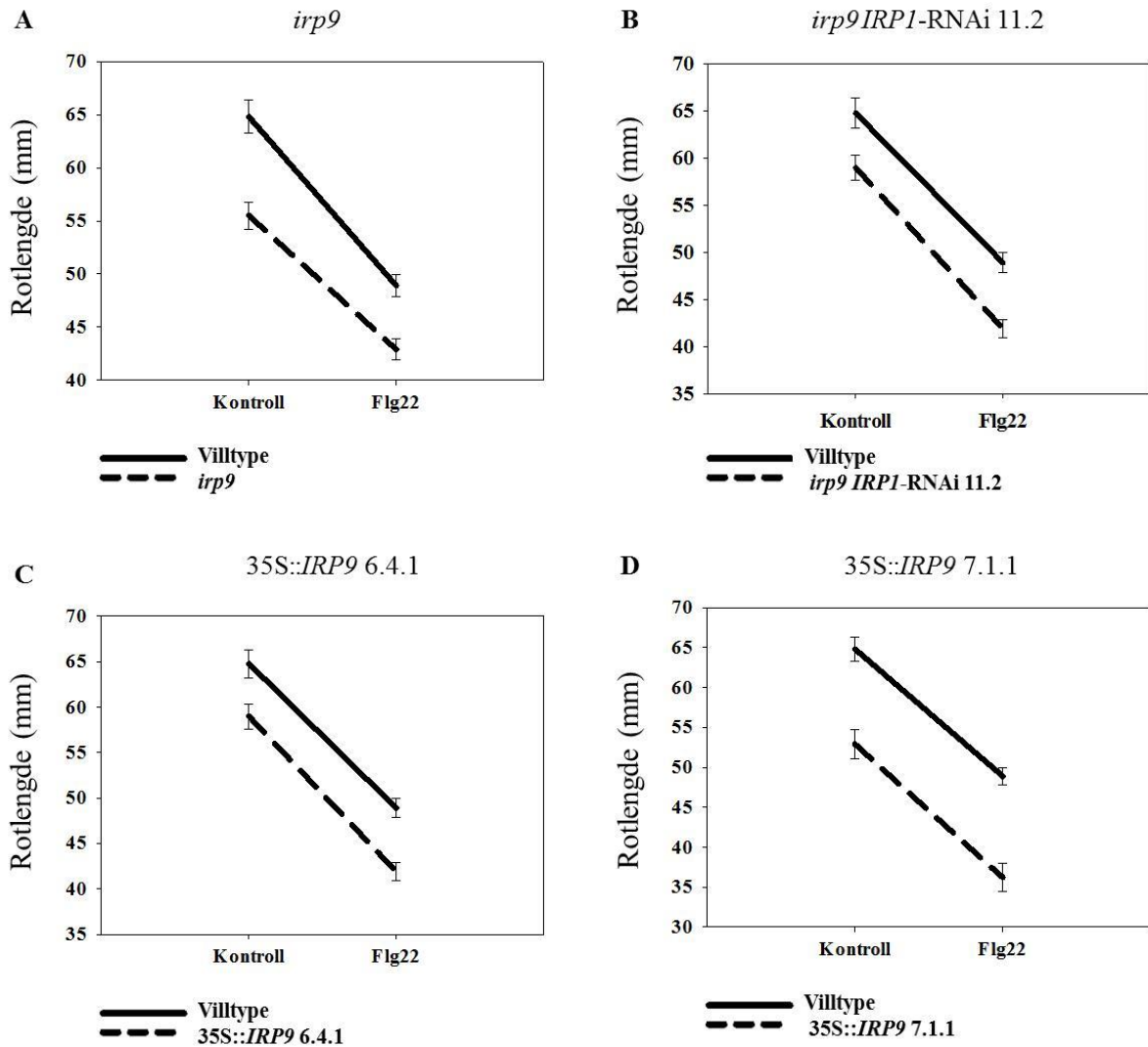
RESULTATER

Etter seks dager ble det ikke påvist forskjeller i rotlengdene til spirene av samme linje som vokste henholdsvis på kontrollmedier og medier tilsatt Flg22-peptidet. Derimot var det signifikant reduksjon av rotlengden til spirene som vokste på medier tilsatt Flg22-peptid etter elleve og femten dager. Disse funnene var forventet.

Etter elleve og femten dager fremkommer det fra forsøket at begge OE-linjene har signifikant kortere rotvekst enn villtype i kontrollmediet. For spirene som vokste i media tilsatt Flg22, vist en signifikant forskjell fra villtype for linje 35S::*IRP9* 6.4.1 etter elleve dager og for linje 35S::*IRP9* 7.1.1 etter femten dager.

For å undersøke den samlede effekten av at to ulike linjer (villtype versus mutant) ble dyrket under to ulike betingelser ($\frac{1}{2}$ MS versus $\frac{1}{2}$ MS tilsatt Flg22) ble det utført toveis ANOVA for målingene utført etter femten dager. Resultatene fra toveis ANOVA er vist i Tabell A8.3, Vedlegg A8. Figur 3.5.3, neste side, gir en visuell framstilling av effekten av Flg22 tilsatt mediet og interaksjonen mellom villtype versus *irp9* (A), *irp9 IRP1*-RNAi 11.2 (B), 35S::*IRP9* 6.4.1 (C) og 35S::*IRP9* 7.1.1 (D).

RESULTATER



Figur 3.5.3. Interaksjon mellom transgen linje versus villtype og effekten av Flg22-peptid tilsatt vekstmedia, testet med toveis ANOVA. For hver linje: (A) *irp9*, (B) *irp9 IRP1-RNAi 11.2*, (C) 35S::*IRP9* 6.4.1 og (D) 35S::*IRP9* 7.1.1 ble det undersøkt om reduksjonen i rotvekst for villtype som følge av Flg22-peptid tilsatt mediet var signifikant forskjellig fra samme reduksjon i transgen linje ved dag 15. Kontrollmediet og media tilsatt Flg22-peptid er gitt som to ulike punkter langs x-aksen, mens rotlengde (mm) er gitt langs y-aksen. De to kurvene i hver figur illustrerer gjennomsnittlig rotlengde for villtype versus rotlengde for transgen linje. Feilfeltene viser standardfeil.

4 DISKUSJON

En plante regulerer de ulike signalnettverkene ved hjelp av tradisjonelle plantehormoner og signalmolekyler som små sekreerte peptider. Den dynamiske reguleringen gjør planten i stand til å endre genuttrykk i forhold til ytre og indre påvirkninger, slik at den på best mulig måte sikrer utvikling, vekst og forsvar. Signalnettverk blir studert i ulike modellorganismer. Økt kunnskap og forståelse for intercellulær kommunikasjon gir kunnskap om grunnleggende plantebiologi og kan siden benyttes blant annet til å forbedre planters motstand mot abiotiske og biotiske faktorer i miljøet (Lease og Walker, 2006; Matsubayashi, 2012).

INFLORESCENCE DEFICIENT IN ABSCISSION (IDA) er et sekret peptid hvor funksjonen er beskrevet og tilhørende reseptor er kjent (Butenko et al., 2003; Shi et al., 2011). I forlengelsen av funksjonsoppklaringen av *IDA*-genet ble det, ved hjelp av sekvenslikhet, avdekket en subfamilie med *IDA-RELATERTE PEPTIDER (IRP)*-gener (Ane Kjersti Vie, upublisert material). Det antas at medlemmene av *IRP*-subfamilien også er sekreerte peptider. I denne oppgaven er funksjonene til de antatte peptidene IRP1 og IRP9 studert ved hjelp av fenotypiske analyser av ulike transgene linjer (knockout/knockdown-mutanter, dobbelmutant og linjer som overuttrykker genene). Opprinnelig var også studiet av funksjonen til IRP10 inkludert i oppgaven, men som følge av manglende knockout/knockdown mutanter og ikke verifiserte overuttrykkslinjer etter transformasjon med overuttrykkskonstruksjon ble genet ekskludert fra oppgaven.

4.1 Generering av dobbelmutant- og overuttrykkslinjer

Lav frekvens for homozygot segresjon av *irp9*-mutasjon og innskudd av hpRNA i dobbelmutant linje

Med støtte i Mendels lov om at trekk nedarves separat (Fairbanks og Rytting, 2001) beregnes den samlede frekvensen for de kryssede *irp9 IRP1-RNAi* linjene som produktet av enkeltfrekvensene. Frekvens for segresjon av individer homozygote for *irp9* knockout i generasjon-F₂ vil være 1:3 og frekvens for homo- eller heterozygot nedarving av hpRNA i samme generasjon vil være 3:1. Det gir en samlet frekvens på 0,18. Det betyr at blant tretti planter av krysset linje *irp9 IRP1-RNAi* 11.2 og seksti planter av krysset linje *irp9 IRP1-RNAi* 7.1, burde det vært henholdsvis fem til seks og elleve planter med korrekt genotype.

DISKUSJON

Det ble verifisert én linje som hadde korrekt genotype blant dobbelmutantene *irp9* IRP1-RNAi 11.2, men ingen blant dobbelmutantene *irp9* IRP1-RNAi 7.1.

En årsak til at frekvensen for dobbelmutanter med korrekt genotype er lav kan skyldes kontaminering med villtypepollen under eller etter gjennomført kryssing. Ved bestøvning trenger hvert frø som skal utvikles minst ett pollen, men alle frøene i en skulpe er bestøvet med flere ulike pollen. Dersom arret ble kontaminert med pollen fra egne pollenknapper, vil frekvensen for segresjon av trekk fra pollinatoren bli redusert. Forholdet kunne vært påvist dersom det ble gjennomført genotyping for hpRNA i generasjonen-F₁.

Manglende overuttrykk av *IRP10* i linjer transformert med 35S::*IRP10*-konstruksjon

Ved *A. tumefaciens*-mediert transformasjon innsettes det i gjennomsnitt 1,5 T-DNA-kopier per transformert plante. Sekvensen innsettes i genomet på tilfeldig sted, men tettheten av innsatte gener er større på kromosomenes armer enn i områdene rundt sentromerene (Alonso et al., 2003).

Ved frekvensanalyser for segresjon av BAR^r:BAR^s i linje 35S::*IRP10* viste analysene normal segresjon av *BAR*-genet i T₁- og T₂-generasjonene, men det ble ikke vist oppregulering av *IRP10* ved RT-qPCR analyser. Det kan tyde på at 35S-promoterens var blitt slått av («gene silencing») i generasjonen-T₂ (Francis og Spiker, 2005), eller at primerparet som ble benyttet for amplifisering av *IRP10* ved RT-qPCR ikke var korrekt. En videre undersøkelse av det manglende genuttrykket ville vært å genotype plantene for 35S-promoterens og gjenta RT-qPCR for *IRP10* med et annet sett primere, dersom 35S-promoterens ble påvist.

4.2 Forskjeller i genuttrykk for planter sprayet med IRP-peptid og ubehandlede overuttrykkslinjer

Resultatene fra RT-qPCR-analysene for linjene som overuttrykker *IRP1* og *IRP9* ble sammenlignet med data fra to mikromatriseanalyser av friske planter som ble sprayet med henholdsvis syntetisk derivert IRP1- og IRP10-peptid. I peptidforsøket ble bladvev fra de sprayede plantene høstet tre timer etter behandling. cRNA ble hybridisert til en Agilent *Arabidopsis* fullgenom V4-brikke (Javad Najafi, upublisert material).

DISKUSJON

På grunn av aminosyre-sekvenslikheten mellom IRP9 og IRP10 ble resultatene fra ekspressjonsanalysene etter at plantene ble sprayet med IRP10-peptid sammenlignet med RT-qPCR-analysene av genuttrykk for linjene som overuttrykker *IRP9*.

Resultatene fra mikromatrise- og RT-qPCR-analysene er vist i Tabellene 4.2.1 (*IRP1*) og 4.2.2 (*IRP9*).

Tabell 4.2.1. Tabellen viser genuttrykk fra mikromatriseanalyser utført tre timer etter at plantene ble sprayet med peptidet IRP1, og fra RT-qPCR-analyser av utvalgte målgener i plantens basale immunforsvar i linjer som overuttrykker *IRP1*. σ^2 representerer varians og SE er standardfeil. Alle verdiene er log₂-transformert og oppgitt relativt til villtype kontroll.

Gen	Mikromatrise-forsøk		RT-qPCR			
	Peptid IRP1		35S:: <i>IRP1</i> 1.3.3		35S:: <i>IRP1</i> 3.2.1	
	Relativt uttrykk	σ^2	Relativt uttrykk	SE	Relativt uttrykk	SE
<i>JAZ7</i>	3,281	0,20	-3,158	-3,68 – (-2,64)	-1,556	-2,55 – (-0,80)
<i>JAZ8</i>	2,115	0,00	-2,047	-2,61 – (-1,24)	-1,626	-2,10 – (-1,24)
<i>JAZ10</i>	2,016	0,24	-1,630	-2,35 – (-1,00)	-1,336	-2,59 – (-0,33)
<i>PDF1.2</i>	1,777	0,07	0,029	-0,42 – 0,35	1,187	-0,52 – 1,86
<i>PR1</i>	-0,248	0,32	-0,199	-0,60 – 0,21	-0,077	-0,80 – 0,53
<i>ACS4</i>	-1,946	1,07	-0,604	-1,60 – 0,40	-0,150	-1,80 – 0,94
<i>MYB51</i>	-0,482	0,21	-0,290	-0,87 – 0,37	0,172	-0,71 – 0,96
<i>CYP71A13</i>	-0,218	0,24	-1,218	-2,53 – 0,85	0,368	-1,06 – 1,78
<i>CYP83B1</i>	-0,212	0,12	-0,250	-0,48 – (-0,09)		
<i>PAD3</i>	0,194	0,18	0,034	-0,48 – 0,83	0,544	-0,14 – 1,01
<i>CHITINASE</i>	-0,519	0,21	-0,680	-1,22 – (-0,24)	0,161	-0,18 – 0,42

DISKUSJON

Tabell 4.2.2. Tabellen viser genuttrykk fra mikromatriseanalyser utført etter planten ble sprayet med peptidet IRP10, og fra RT-qPCR analyser av utvalgte målgener i plantens basale immunforsvar i linjer som overuttrykker *IRP9*. Kolonnen «Peptid IRP10» refererer til mikromatriseforsøket og kolonnene «35S::*IRP9* 6.4.1» og «35S::*IRP9* 7.1.1» viser til RT-qPCR-analysene. σ^2 representerer varians og SE er standardfeil. Alle verdiene er log2-transformert, og er oppgitt relativt til villtype kontroll.

Gen	Mikromatrise-forsøk		RT-qPCR			
	Peptid IRP10		35S:: <i>IRP9</i> 6.4.1		35S:: <i>IRP9</i> 7.1.1	
	Relativt uttrykk	σ^2	Relativt uttrykk	SE	Relativt uttrykk	SE
<i>JAZ7</i>	1,939	0,03	-1,831	-2,75 – (-0,87)	-0,873	-1,56 – (-0,17)
<i>JAZ8</i>	0,929	0,01	-1,438	-1,89 – (-1,08)	-0,351	-0,81 – (-0,07)
<i>JAZ10</i>	0,614	0,00	-1,333	-2,48 – (-0,41)	-0,492	-1,45 – 0,51
<i>PDF1.2</i>			0,708	0,11 – 1,50	-1,041	-1,60 – (-0,43)
<i>PR1</i>	-0,185	0,13	0,434	-0,31 – 1,30	0,130	-0,49 – 0,73
<i>ACS4</i>	-2,044	0,16	0,045	-0,24 – 0,35	-0,088	-2,07 – 1,36
<i>MYB51</i>	-1,145	0,10	0,514	-0,09 – 1,16	0,128	-1,44 – 0,77
<i>CYP71A13</i>	-1,748	0,07	0,549	-0,05 – 1,39	0,379	0,01 – 0,74
<i>CYP83B1</i>	-1,3	0,03			-0,327	-0,65 – 0,03
<i>PAD3</i>	-0,246	0,30	0,698	0,30 – 1,11	0,450	0,12 – 0,85
<i>CHITINASE</i>	0,066	0,54	0,038	-0,36 – 0,42	-0,313	-0,79 – 0,17

Ekspresjonsanalyser av IRP1-peptid behandlede planter og linjer som overuttrykker *IRP1*

I ekspresjonsanalysene for plantene sprayet med IRP1-peptid var genuttrykket av *JAZ*-genene oppregulert 4 - 9 ganger, mens uttrykket av de samme genene var nedregulert 3 - 9 ganger i begge overuttrykkslinjene for *IRP1* (Tabell 4.1).

Oppreguleringen av *JAZ*-genene og *PDF1.2* i IRP1-peptid forsøket kan skyldes at den plutselige høye dosen med IRP1-peptidet aktiverte en biologisk respons via JA-akkumulering. En økt syntese av jasmonat vil på proteinnivå øke degraderingen av *JAZ*-proteiner ved hjelp av E3 ligase komplekset SCF(COI1). *JAZ*-proteinene er negative regulatorer av transkripsjonsfaktorer som aktiverer JA-responsive gener, deriblant *AtMYC2*. Effekten av økt degradering av *JAZ*-proteinene vil derfor være økt transkripsjon av JA-responsive gener som *PDF1.2* (Chini et al., 2007; Katsir et al., 2008a).

AtMYC2 er sentral i forhold til transkripsjon av JA-responsive gener, men også *JAZ*-genene blir regulert av *AtMYC2*. Oppregulering av *JAZ*-genene og *AtMYC2* kan derfor være et uttrykk for den feedback-løkken *JAZ*-proteinene og *AtMYC2* er en del av, og som regulerer den hormonelle responsen induisert av økt JA-syntese (Chini et al., 2007). I

DISKUSJON

mikromatriseanalysene fra IRP1-peptid forsøket var uttrykket av *AtMYC2* oppregulert omtrent 2,5 ganger (Javad Najafi, upublisert material).

RT-qPCR-analysene for linjene som overuttrykte *IRP1* viste en nedregulering av transkripsjonen av *JAZ*-genene, og en oppregulering av *PDF1.2* i én OE-linje. Oppreguleringen av *PDF1.2* var trolig forårsaket av nedreguleringen av *JAZ*-genene.

Nedreguleringen av *JAZ*-genene kan være forårsaket av en biologisk permanent desensibilisering av signaloverføring fra IRP-reseptorene, for å motvirke effekten av å ha konstitutivt uttrykk av et gen som normalt ikke er uttrykt. Flere signaloverføringsspor i planter og dyr reguleres med desensibilisering ved at komponenter i sporet, ofte reseptoren, blir refraktær til et vedvarende eller repetert signal (Foley et al., 2006). Den refraktære perioden varer oftest i noen få minutter eller timer. I noen tilfeller er det blitt vist at den refraktære perioden varer i flere dager (Farber et al., 2003; Foley et al., 2006).

Ekspresjonsanalyser av IRP10-peptid behandlede planter og linjer som overuttrykker *IRP9*

Mikromatriseanalysene utført for IRP10-peptid behandlede planter ble sammenlignet med genuttrykk i OE-linjer for *IRP9* på grunnlag av likhet på proteinnivå. Den syntetisk deriverte sekvensen til IRP10-peptidet bestod av 41 aminosyrer. Ved BLAST-søk ble sekvensen sammenlignet med tilsvarende sekvens i IRP9. Det ble funnet 28 (68 %) identiske og 33 (80 %) positive aminosyrer i sekvensen.

I mikromatriseanalysene fra plantene som ble behandlet med IRP10-peptid framkom en moderat oppregulering av *JAZ7*, omtrent 4 ganger, mens *JAZ8* og *JAZ10* var tilnærmet uregulert. 35S::*IRP9* 6.4.1 viste derimot en 2,5 - 4 gangers nedregulering av *JAZ7*, *JAZ8* og *JAZ10*. En mulig nedregulering av *JAZ7*, *JAZ8* og *JAZ10* i linje 35S::*IRP9* 7.1.1 var mindre tydelig (Tabell 4.2).

De genene som var mest oppregulerte i mikromatriseforsøket etter IRP10-peptidbehandling kodet for proteiner som tilhørte familien av defensin-liknende proteiner, BTB AND TAZ DOMAIN-proteiner og varmesjokksproteiner. Defensinene *PDF1.2b*, *PDF1.2c* og *PDF1.3* og transkripsjonsfaktoren *AtMYC2* var tilnærmet uregulert i mikromatriseforsøket (Javad Najafi, upublisert material).

Resultatet antyder en mulig forbindelse mellom *IRP10* og respons på cellulær produksjon av ROS ved uttrykk av *BT*- og varmesjokksgener. På grunn av sekvenslikhet mellom *IRP9* og

DISKUSJON

IRP10 kan en lignende profil ha blitt aktivert i *IRP9*. Forholdene ble ikke bekreftet i RT-qPCR-forsøket, fordi ingen målgener i ROS-responser ble analysert.

Resultatene fra mikromatrise- og RT-qPCR-analysene antyder at IRP1 er involvert i JA-signalisering. Responsen i *JAZ*-genene og *PDF1.2* kan bety at IRP1 har en funksjon som signalpeptid for transkripsjonsfaktorer eller aktivatorer i JA-syntese eller akkumulering av JA i cytoplasma.

For *IRP9* ble det ikke vist en tilsvarende klar tilknytning til JA-signalisering via *JAZ*-genene og *PDF1.2*. Sammenhengen kan likevel ikke utelukkes, fordi stor variasjon i datamaterialet for RT-qPCR-analysene kan ha maskert en mulig forbindelse. Det kan tenkes at *IRP9* har transkripsjonsfaktorer som aktiveres ved økte nivå av ROS i cellen.

4.3 Ekspresjonsanalyser i planter behandlet med UV-B stråling

Mulig overflødighet i signalspor nedstrøms for UV-B stråling for IRP1 og IRP10

Mikromatriseforsøk utført på villtype-planter av Kilian et al. (2007) viste en oppregulering av genuttrykkene til *IRP1*, *IRP9* og *IRP10* etter UV-B-bestråling. *IRP9* og *IRP10* var oppregulert omtrent 1000 ganger, mens responsen i genuttrykket for *IRP1* var omtrent 500 ganger. Oppreguleringen av genene nådde sitt maksimum omkring tre timer etter UV-B eksponering, fordi uttrykket ved dette tidspunktet var betydelig høyere enn etter en og seks timer.

Sekvenslikhetene som er vist for peptidene IRP9 og IRP10 gjør at det forventes en overflødighetsfunksjon i signalsporene som disse peptidene trolig inngår i. For å undersøke omfanget av overflødighet ble det planlagt et forsøk med UV-B bestråling der både knockout/knockdown og dobbel/trippelmutanter av *IRP1*, *IRP9* og *IRP10* skulle inngå. På grunn av manglende verifisert knockout- og OE-linje for *IRP10*, og dermed fravær av dobbel- og trippel-knockoutlinjer, ble forsøket begrenset til å undersøke om peptidet IRP10 har en overflødighetsfunksjon med peptidene IRP1 eller IRP9.

Oppreguleringen av *IRP10* i villtype etter UV-B stråling (Figur 3.3.1 C) var omtrent 60 ganger relativt til villtype kontroll. Genuttrykket av *IRP10* i linjene *IRP1*-RNAi 11.2 og dobbelmutanten *irp9 IRP1*-RNAi 11.2 var omtrent det dobbelte av genuttrykket i villtype etter behandling, henholdsvis omtrent 115 og 120 ganger. Det oppregulerte uttrykket av *IRP10* i linjene *IRP1*-RNAi 11.2 og dobbelmutanten *irp9 IRP1*-RNAi 11.2 relativt til villtype kan ha en biologisk funksjon, selv om det ikke ble påvist en statistisk signifikant oppregulering. Det

DISKUSJON

betyr at det kan foreligge en mulig overflødighetsfunksjon for IRP10-peptider i signalspor som IRP1 inngår i ved UV-B stråling.

Det ble ikke vist signifikant økning i genuttrykk av *IRP10* for linjen *IRP1*-RNAi 7.1 og *irp9*-mutanten relativt til villtype.

Det vises ikke overlapp i funksjonene mellom *IRP1* og *IRP9* (Figurene 3.3.1 A og B).

Resultatet fra forsøket med UV-B stråling viser en mulig overlappende funksjon for peptidene IRP1 og IRP10.

Plantene ble bestrålt med UV-B med meget høy innstrålingstetthet

Flere forfattere har beskrevet at ved UV-B stråling utført med høy energi og lav bølgelengde aktiveres stressresponser ved hjelp av ROS, mens lav energi og lang bølgelengde aktiverer UV-B forsvarsresponser ved hjelp av UVR8-COP1-HY5 signalkjeden (Jenkins, 2009; Hideg et al., 2013).

I mikromatriseanalysene utført av Kilian et al. (2007) ble det benyttet innstrålingstetthet tilsvarende $1,2 \text{ W m}^{-2}$ ved 310 nm, mens i forsøket i denne oppgaven ble innstrålingstettheten målt til $6,1 \text{ W m}^{-2}$ ved 302 nm. For å få et mål på om den benyttede stråledosen er en stor eller liten ble innstrålingstettheten sammenlignet med doser benyttet i et studium utført av Ries et al. (2000). De undersøkte langtidseffekten av kontinuerlig forhøyet spekter av UV-B stråling i *Arabidopsis*-planter. I studiet ble innstrålingstetthet ved 300 nm i størrelsene $0,31 \text{ W m}^{-2}$ og $2,1 \times 10^{-4} \text{ W m}^{-2}$ karakterisert som høye doser UV-B. Det betyr at strålingsdosen plantene i denne oppgaven ble utsatt for var unaturlig høy og kan ha induserte effekter som er utenfor det som karakteriseres som normale responser.

I oppgavens forsøk var responsen for målgenet *IRP9* i villtype oppregulert omtrent 3700 ganger relativt til ubehandlet villtype, mens genuttrykkene for henholdsvis *IRP1* og *IRP10* var rundt 200 og 60 ganger oppregulert relativt til ubehandlet villtype.

Ekspresjonsanalyser av plantene som var sprayet med IRP10-peptid (Avsnitt 4.2) antydte økt transkripsjon av gener som inngår i en respons til økt produksjon av ROS, eller ROS-signalisering. En tilsvarende genprofil kan også være gjeldende for *IRP9*, fordi genet ble så kraftig indusert ved UV-B stråling, og fordi det kan foreligge funksjonelle overlapp for disse peptidene.

Forsøket viste at *IRP1*, *IRP9* og *IRP10* ble indusert ved UV-B stråling med høy energi. Transkripsjonsfaktorene som inducerer *IRP1*, *IRP9* og *IRP10* blir trolig direkte eller indirekte

DISKUSJON

aktivert av den økte produksjonen av ROS. *IRP1*, *IRP9* og *IRP10* kan inngå i signalspor som medierer enzymer som katalyserer den økte produksjonen av ROS, eller de kan inngå i ROS-signalisering. Det er for lite informasjon i forsøket til å antyde om det skjer ved hjelp av JA-avhengige eller JA-uavhengige spor.

Bruken av *HY5* som positiv kontroll i forsøket

Den ukarakteristiske responsen *HY5*-genet viser (Figur 3.3.1 D) kan være forårsaket av at plantene ble utsatt for en mye høyere innstrålingstetthet enn det som normalt er nødvendig for å inducere *HY5*-aktivering. Et annet valg av positiv kontroll i dette forsøket som er knyttet opp mot økt ROS-produksjon, kunne vært enzymer som katalyserer peroksidase, for eksempel ASKORBAT PEROKSIDASE eller KATALASE.

4.4 To ulike tilnærminger til biotiske interaksjoner

Det ble utført to forsøk hvor det ble søkt etter spesifikke fenotyper etter biotiske stresspåvirkninger som omfattet signalspor nedstrøms for flagellin-FLS2-interaksjonen.

***IRP1* inngår trolig som signalpeptid for en negativ regulator i JA-signalisering**

I forsøket hvor *Pst* DC3000 inngikk ble veksten målt som CFU per spire, log₁₀-transformert. Veksten i CFU per spire ble målt i plantelinjer med redusert og økt genuttrykk av henholdsvis *IRP1* og *IRP9*. Variasjonene mellom de ulike linjenes gruppegjennomsnitt var for alle linjene, inkludert villtype, innenfor samme tierpotens og viste ingen klar trend for dette forsøket. Figur 3.4.2 A viser for dagene 1 og 3 likevel en mulig sammenheng ved at det er signifikant forskjell mellom én RNAi-linje og én OE-linje. RNAi-linjen har lavest gruppegjennomsnitt begge dagene, og viser med det en bedre motstand mot *Pst* DC3000 enn OE-linjene, hvor en større vekst av bakterier ble observert.

Økt vekst av *Pst* DC3000 kan skje dersom JA-signaliseringen fortsetter å være aktivert på bekostning av SA-signalisering (Uknes et al., 1992; Rowe et al., 2010). Reduserte SA-signalisering ved JA-aktivering (Laurie-Berry et al., 2006) blir trolig mediert av transkripsjonsfaktoren AtMYC2 (Dombrecht et al., 2007). JA-Ile eller bakterietoksinet coronatin, en potent agonist til JA-Ile, binder til SCF(COI1)-JAZ komplekset. JAZ-proteinene blir merket for destruksjon. AtMYC2 frigis og inducerer gentranskripsjon av JA-responsive gener og undertrykker trolig SA-signalisering (Feys et al., 1994; Chini et al., 2007; Dombrecht et al., 2007; Katsir et al., 2008b).

DISKUSJON

For linjen *IRP1*-RNAi 7.1 ble det antydnet en økt motstand mot vekst av *Pst* DC3000, mens OE-linjene for *IRP1* viste en redusert motstand mot patogenet. Det kan bety at *IRP1* har en funksjon som signalmolekyl for en negativ regulator av SA-signalisering.

Det ble ikke vist noen trend i forsøket som ble utført på knockout-mutant og OE-linjer for *IRP9*.

Resultatet viser at *IRP1* kan ha en funksjon som signalmolekyl for en negativ aktivator av SA-signalisering.

Linjer som har endret uttrykk av *IRP9* (*irp9*-mutant, OE) ledsages av identisk rotlengdereduksjon i media tilsatt Flg22-peptid

I forsøket der Flg22-peptidets effekt på rotlengden ble studert, ble to forhold undersøkt. Det ene var å gi et mål på endringen i rotveksten i vekstmedium tilsatt Flg22-peptid relativt til kontrollmedium. Det andre forholdet som ble undersøkt var om den målte endringen i rotlengde (kontrollmedium versus medium tilsatt Flg22) i de ulike linjene for *IRP9* (knockout, dobbelknockout og OE) var signifikant forskjellige fra den tilsvarende endringen i villtype.

Analyser av gruppegjennomsnittene (utført med IBM SPSS Statistics 20) med enveis ANOVA og Tukey HSD post hoc test, viste at rotlengden til spirene som vokste i media tilsatt Flg22-peptid var signifikant kortere enn rotlengdene til spirer av samme linje som vokste i kontrollmedia (Figur 3.5.2). Resultatet var i samsvar med den forventede rotreduksjonen som er beskrevet av Gomez-Gomez et al. (1999).

Det andre forholdet som ble undersøkt var om interaksjonen mellom de enkelte transgene linjene versus villtype, og vekstmedia med og uten tilsatt Flg22-peptid var signifikant. Forholdet ble belyst ved å anvende toveis ANOVA. Spørsmålet om interaksjoner besvares i figur 3.5.3. Parallelle grafer viser at differansen i rotlengdene mellom transgen linje og villtype ved vekst i kontrollmedia var omtrent lik med differansen i rotlengdene ved vekst i media tilsatt Flg22-peptid. Det betyr at interaksjonseffekt ble ikke påvist i dette forsøket.

Resultatene antyder at forskjellene i rotlengdene innad og mellom linjene, skyldes kun den forventede effekten av Flg22-peptid tilsatt vekstmedia.

Overuttrykk av *IRP9* ledsages av redusert rotvekst i planter dyrket i vanlig vekstmedium

Begge overuttrykkslinjene for *IRP9* viste redusert rotvekst relativt til villtype ved vekst i ½ MS (kontrollmedium).

DISKUSJON

Det er vist at JA-behandlede planter og planter som konstitutivt overuttrykker JA-responsive gener som følge av kontinuerlig forhøyet JA-nivå har redusert rotlengde. I motsetning til disse funnene er det i mutanter som er påvirket i komponentene som inngår i JA- og COI1-avhengig signaltransduksjon, som for eksempel transkripsjonsfaktoren MYC2, eller oppstrøms proteiner som JAI4 eller MPK4, vist en redusert effekt i rotveksthemmingen (Wasternack, 2007).

Mekanismene som leder til redusert rotvekst komplekse. Funnet av redusert rotlengde i linjer som overuttrykker *IRP9* gir for lite informasjon til at det kan trekkes slutninger.

4.5 De benyttede transgene linjene i oppgaven gav ulike resultater

I forsøket hvor det ble gjennomført ekspresjonsanalyser etter UV-B stråling (Avsnitt 3.3) viste genuttrykket av målgenene *IRP9* og *IRP10* i de to *IRP1*-RNAi-linjene et mønster hvor linje RNAi 11.2 hadde relativt høyere genuttrykk enn villtype, mens linje RNAi 7.1 hadde et lavere genuttrykk relativt til villtype (Figur 3.3.1). Lignende forskjeller forekomm også ved bruken av OE-linjer. Det var spesielt synlig i forsøket hvor genene i immunforsvaret ble transkribert (Avsnitt 3.2). Disse forholdene viser noen av utfordringene ved å benytte transformerte linjer i studiene, og synliggjør nødvendigheten av å ha minst to transformerte linjer for samme gen (Bolle et al., 2011).

4.6 Forslag til videre arbeid

Erfaringen fra hvor forskjellig de ulike knockout/knockdown linjene responderer på behandlinger gjør det nødvendig å gjenta kryssingen av *irp9*-mutanten og *IRP1*-RNAi linjene for med større sikkerhet kunne si at den observerte fenotypen skyldes genfunksjoner og ikke uspesifikke effekter fra planten etter å ha fått innsatt et transgen.

Funnene i oppgaven antyder en mulig overflødighet i funksjonen mellom IRP-peptidene. Å generere dobbelmutantene *irp1 irp10* og *irp9 irp10* og trippelmutanten *irp1 irp9 irp10* vil bidra til nærmere undersøkelser av dette.

I forsøket hvor Flg22-peptidets effekt på plantens rotvekst ble studert kom det fram at rotlengden til overuttrykslinjene for *IRP9* var signifikant kortere enn rotlengden til villtype. Det vil derfor være naturlig å undersøke utvikling og vekst fra frøspiring til høsting av frø for

DISKUSJON

knockout-mutanter og OE-linjer for *IRP9* dyrket på ½ MS og jord. Flg22-peptidets effekt på rotvekst i linjene *IRP1*-RNAi og 35S::*IRP1* bør også studeres.

Det foreligger linjer som er transformert med en reporterengenkonstruksjon som består av *PDF1.2*_{pro}:: β-glucuronidase (GUS) krysset med OE-linjer for henholdsvis *IRP1* og *IRP9*. Ved dyrking av de transgene linjene under normale betingelser vil det være mulig å studere det antatt konstitutive uttrykket av jasmonater i form av uttrykk av proteinet PDF1.2. Ved å UV-B bestråle plantene, vil det være mulig å studere om signalisering av IRP1 og IRP9 har ulike funksjoner ved ROS akkumulering.

Det foreligger også linjer som er transformert med en overuttrykkskonstruksjon som består av 35S-promoter og en hemagglutinin (HA)-tag bundet til C-terminal ende av *IRP1*. Ved hjelp av anti-HA-kolonner og todimensjonal gelelektroforese vil det være mulig å isolere peptidene fra en proteinløsning fra plantevevet. Peptidets aminosyresekvens vil bli bestemt med MALDI-TOF. For å identifisere reseptoren til peptidet kan samme metode benyttes på UV-B induerte planter. Det isolerte peptidet vil da være bundet til reseptoren, og reseptorens aminosyresekvens vil bli avdekket ved hjelp av MALDI-TOF.

5 KONKLUSJON

I mange genfamilier har familiemedlemmer høy likhet i sekvens, og følgelig overlappende funksjoner. Det ble testet for overflødigheitsfunksjoner i respons på UV-B stråling for målgenene *IRP1*, *IRP9* og *IRP10*. Det ble påvist en potensiell, men ikke signifikant, overflødigheitsrespons mellom *IRP1* og *IRP10*.

Ved transkripsjonsanalyser av planter som ble sprayet med *IRP1/IRP10*-peptid og OE-linjer for *IRP1/IRP10*, framkom en potensiell funksjon til *IRP1* som aktivator av JA-syntese eller JA-akkumulering i cytoplasma.

Vekst av *Pst* DC3000 i *Arabidopsis*-spirer ble undersøkt i knockout/knockdown- og overuttrykkslinjer for henholdsvis *IRP1* og *IRP9*. I én *IRP1*-RNAi linje ble det påvist økt motstand mot *Pst* DC3000. Det kan bety at *IRP1* er signalmolekyl for en negativ regulator i SA-signalisering. I linjene med endret genuttrykk av *IRP9* ble det ikke påvist forskjeller ved vekst av *Pst* DC3000.

I *Arabidopsis*-spirer som vokste i kontrollmedium ble det påvist reduksjon av rotlengde i linjer som overuttrykte *IRP9*.

Samlet betyr dette at *IRP1* og *IRP9* kan ha mulige funksjoner som aktivatorer av JA-syntese eller JA-akkumulering i cytoplasma. *IRP1* og *IRP9* kan ha funksjoner som signalmolekyler som modulerer responsen etter UV-B stråling enten via JA-avhengige eller JA-uavhengige spor, og *IRP1* kan inngå som signalmolekyl for et negativt regulerende protein i SA-signaliseringen.

REFERANSER

- ACOSTA, I. F. & FARMER, E. E. 2010. Jasmonates. *Arabidopsis Book* [Online] DOI: 10.1199/tab.0129.
- ALONSO, J. M., STEPANOVA, A. N., LEISSE, T. J., KIM, C. J., CHEN, H. M., SHINN, P., STEVENSON, D. K., ZIMMERMAN, J., BARAJAS, P., CHEUK, R., GADRINAB, C., HELLER, C., JESKE, A., KOESEMA, E., MEYERS, C. C., PARKER, H., PREDNIS, L., ANSARI, Y., CHOY, N., DEEN, H., GERALT, M., HAZARI, N., HOM, E., KARNES, M., MULHOLLAND, C., NDUBAKU, R., SCHMIDT, I., GUZMAN, P., AGUILAR-HENONIN, L., SCHMID, M., WEIGEL, D., CARTER, D. E., MARCHAND, T., RISSEEUW, E., BROGDEN, D., ZEKO, A., CROSBY, W. L., BERRY, C. C. & ECKER, J. R. 2003. Genome-wide Insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science*, 301(5633), 653-657.
- AYER, S. 2013. *Electromagnetic spectrum* [Online] Available: <http://jabberwockreptiles.com/demystifying-light-part-i-let-there-be-light> [Accessed 10.06.2013].
- BARTELS, S., GONZALEZ BESTEIRO, M. A., LANG, D. & ULM, R. 2010. Emerging functions for plant MAP kinase phosphatases. *Trends in Plant Science*, 15(6), 322-329.
- BOLLE, C., SCHNEIDER, A. & LEISTER, D. 2011. Perspectives on Systematic Analyses of Gene Function in *Arabidopsis thaliana*: New Tools, Topics and Trends. *Current Genomics*, 12(1), 1-14.
- BOLLER, T. & FELIX, G. 2009. A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors. *Annual Review of Plant Biology*, 60, 379-406.
- BONES, A. M. & ROSSITER, J. T. 2006. The enzymic and chemically induced decomposition of glucosinolates. *Phytochemistry*, 67(11), 1053-1067.
- BOYES, D. C., ZAYED, A. M., ASCENZI, R., MCCASKILL, A. J., HOFFMAN, N. E., DAVIS, K. R. & GORLACH, J. 2001. Growth stage-based phenotypic analysis of *Arabidopsis*: A model for high throughput functional genomics in plants. *Plant Cell*, 13(7), 1499-1510.
- BROWN, B. A. & JENKINS, G. I. 2008. UV-B signaling pathways with different fluence-rate response profiles are distinguished in mature *Arabidopsis* leaf tissue by requirement for UVR8, HY5, and HYH. *Plant Physiology*, 146(2), 576-588.
- BUSTIN, S. A., BENES, V., GARSON, J. A., HELLEMANS, J., HUGGETT, J., KUBISTA, M., MUELLER, R., NOLAN, T., PFAFFL, M. W., SHIPLEY, G. L., VANDESOMPELE, J. & WITWER, C. T. 2009. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4), 611-622.
- BUTENKO, M. A., PATTERSON, S. E., GRINI, P. E., STENVIK, G. E., AMUNDSEN, S. S., MANDAL, A. & AALEN, R. B. 2003. INFLORESCENCE DEFICIENT IN ABSCISSION controls floral organ abscission in *Arabidopsis* and identifies a novel family of putative ligands in plants. *Plant Cell*, 15(10), 2296-2307.
- BUTENKO, M. A., VIE, A. K., BREMBU, T., AALEN, R. B. & BONES, A. M. 2009. Plant peptides in signalling: looking for new partners. *Trends in Plant Science*, 14(5), 255-263.

REFERANSER

- CHINCHILLA, D., BAUER, Z., REGENASS, M., BOLLER, T. & FELIX, G. 2006. The Arabidopsis receptor kinase FLS2 binds flg22 and determines the specificity of flagellin perception. *Plant Cell*, 18(2), 465-476.
- CHINCHILLA, D., ZIPFEL, C., ROBATZEK, S., KEMMERLING, B., NURNBERGER, T., JONES, J. D. G., FELIX, G. & BOLLER, T. 2007. A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature*, 448(7152), 497-501.
- CHINI, A., FONSECA, S., FERNANDEZ, G., ADIE, B., CHICO, J. M., LORENZO, O., GARCIA-CASADO, G., LOPEZ-VIDRIERO, I., LOZANO, F. M., PONCE, M. R., MICOL, J. L. & SOLANO, R. 2007. The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature*, 448(7154), 666-671.
- CHO, S. K., LARUE, C. T., CHEVALIER, D., WANG, H. C., JINN, T. L., ZHANG, S. Q. & WALKER, J. C. 2008. Regulation of floral organ abscission in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(40), 15629-15634.
- CLAY, N. K., ADIO, A. M., DENOUEX, C., JANDER, G. & AUSUBEL, F. M. 2009. Glucosinolate Metabolites Required for an Arabidopsis Innate Immune Response. *Science*, 323(5910), 95-101.
- CLOUGH, S. J. & BENT, A. F. 1998. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 16(6), 735-743.
- CZECHOWSKI, T., STITT, M., ALTMANN, T., UDVARDI, M. K. & SCHEIBLE, W. R. 2005. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 139(1), 5-17.
- D'HALLUIN, K., DE BLOCK, M., DENECKE, J., JANSSENS, J., LEEMANS, J., REYNAERTS, A. & BOTTERMAN, J. 1992. The bar gene as selectable and screenable marker in plant engineering. *Methods Enzymol*, 216, 415-426.
- DODDS, P. N. & RATHJEN, J. P. 2010. Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics*, 11(8), 539-548.
- DOMBRECHT, B., XUE, G. P., SPRAGUE, S. J., KIRKEGAARD, J. A., ROSS, J. J., REID, J. B., FITT, G. P., SEWELAM, N., SCHENK, P. M., MANNERS, J. M. & KAZAN, K. 2007. MYC2 differentially modulates diverse jasmonate-dependent functions in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 19(7), 2225-2245.
- EARLEY, K. W., HAAG, J. R., PONTES, O., OPPER, K., JUEHNE, T., SONG, K. M. & PIKAARD, C. S. 2006. Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. *Plant Journal*, 45(4), 616-629.
- ELLIS, C., KARAFYLLIDIS, I., WASTERNAK, C. & TURNER, J. G. 2002. The Arabidopsis mutant *cev1* links cell wall signaling to jasmonate and ethylene responses. *Plant Cell*, 14(7), 1557-1566.
- FAIRBANKS, D. J. & RYTTING, B. 2001. Mendelian controversies: a botanical and historical review. *American Journal of Botany*, 88(5), 737-752.
- FARBER, K., SCHUMANN, B., MIERSCH, O. & ROOS, W. 2003. Selective desensitization of jasmonate- and pH-dependent signaling in the induction of benzophenanthridine biosynthesis in cells of *Eschscholzia californica*. *Phytochemistry*, 62(3), 491-500.
- FELDMANN, K. A., COURY, D. A. & CHRISTIANSON, M. L. 1997. Exceptional segregation of a selectable marker (Kan(R)) in *Arabidopsis* identifies genes important for gametophytic growth and development. *Genetics*, 147(3), 1411-1422.
- FEYS, B., BENEDETTI, C. E., PENFOLD, C. N. & TURNER, J. G. 1994. Arabidopsis Mutants Selected for Resistance to the Phytotoxin Coronatine Are Male Sterile, Insensitive to Methyl Jasmonate, and Resistant to a Bacterial Pathogen. *Plant Cell*, 6(5), 751-759.

REFERANSER

- FOLEY, R. C., SAPPL, P. G., PERL-TREVES, R., MILLAR, A. H. & SINGH, K. B. 2006. Desensitization of GSTF8 induction by a prior chemical treatment is long lasting and operates in a tissue-dependent manner. *Plant Physiology*, 142(1), 245-253.
- FRANCIS, K. E. & SPIKER, S. 2005. Identification of *Arabidopsis thaliana* transformants without selection reveals a high occurrence of silenced T-DNA integrations. *Plant Journal*, 41(3), 464-477.
- GIGOLASHVILI, T., BERGER, B., MOCK, H. P., MULLER, C., WEISSHAAR, B. & FLUEGGE, U. I. 2007. The transcription factor HIG1/MYB51 regulates indolic glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 50(5), 886-901.
- GOMEZ-GOMEZ, L. & BOLLER, T. 2000. FLS2: An LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Molecular Cell*, 5(6), 1003-1011.
- GOMEZ-GOMEZ, L. & BOLLER, T. 2002. Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. *Trends in Plant Science*, 7(6), 251-256.
- GOMEZ-GOMEZ, L., FELIX, G. & BOLLER, T. 1999. A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 18(3), 277-284.
- GRUBB, C. D. & ABEL, S. 2006. Glucosinolate metabolism and its control. *Trends in Plant Science*, 11(2), 89-100.
- HEIJDE, M. & ULM, R. 2012. UV-B photoreceptor-mediated signalling in plants. *Trends in Plant Science*, 17(4), 230-237.
- HELLEMANS, J. 2013. qBase+ manual.
- HIDEG, E., JANSEN, M. A. K. & STRID, A. 2013. UV-B exposure, ROS, and stress: inseparable companions or loosely linked associates? *Trends in Plant Science*, 18(2), 107-115.
- JENKINS, G. I. 2009. Signal Transduction in Responses to UV-B Radiation. *Annual Review of Plant Biology*, 60, 407-431.
- JONES, J. D. G. & DANGL, J. L. 2006. The plant immune system. *Nature*, 444(7117), 323-329.
- KATAGIRI, F., THILMONY, R. & HE, S. Y. 2002. The *Arabidopsis thaliana*-*Pseudomonas syringae* interaction. *Arabidopsis Book* [Online] DOI: 10.1199/tab.0039.
- KATSIR, L., CHUNG, H. S., KOO, A. J. K. & HOWE, G. A. 2008a. Jasmonate signaling: a conserved mechanism of hormone sensing. *Current Opinion in Plant Biology*, 11(4), 428-435.
- KATSIR, L., SCHILMILLER, A. L., STASWICK, P. E., HE, S. Y. & HOWE, G. A. 2008b. COI1 is a critical component of a receptor for jasmonate and the bacterial virulence factor coronatine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(19), 7100-7105.
- KILIAN, J., WHITEHEAD, D., HORAK, J., WANKE, D., WEINL, S., BATISTIC, O., D'ANGELO, C., BORNBERG-BAUER, E., KUDLA, J. & HARTEK, K. 2007. The AtGenExpress global stress expression data set: protocols, evaluation and model data analysis of UV-B light, drought and cold stress responses. *The Plant Journal*, 50(2), 347-363.
- LAURIE-BERRY, N., JOARDAR, V., STREET, I. H. & KUNKEL, B. N. 2006. The *Arabidopsis thaliana* JASMONATE INSENSITIVE 1 gene is required for suppression of salicylic acid-dependent defenses during infection by *Pseudomonas syringae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(7), 789-800.
- LEASE, K. A. & WALKER, J. C. 2006. The *Arabidopsis* unannotated secreted peptide database, a resource for plant peptidomics. *Plant Physiology*, 142(3), 831-838.
- MATSUBAYASHI, Y. 2012. Recent progress in research on small post-translationally modified peptide signals in plants. *Genes to Cells*, 17(1), 1-10.

REFERANSER

- MATSUBAYASHI, Y. & SAKAGAMI, Y. 2006. Peptide hormones in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 57, 649-674.
- MOREL, J. B. & DANGL, J. L. 1997. The hypersensitive response and the induction of cell death in plants. *Cell Death and Differentiation*, 4(8), 671-683.
- NONIS, A., SCORTEGAGNA, M., NONIS, A. & RUPERTI, B. 2011. PRaTo: A web-tool to select optimal primer pairs for qPCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 415(4), 707-708.
- OMEGA BIO-TEK. 2012. *E.Z.N.A® SP Plant DNA Kit* [Online] Available: <http://s458392232.onlinehome.us/files/resource/Handbook/17096600.pdf> [Accessed 14.03.2013].
- PALLANT, J. 2010. *SPSS Survival Manual. 4th ed.* Berkshire: Mc Graw Hill
- PAUWELS, L. & GOOSSENS, A. 2011. The JAZ Proteins: A Crucial Interface in the Jasmonate Signaling Cascade. *Plant Cell*, 23(9), 3089-3100.
- QUIAGEN. 2009. *QuantiTect® Reverse Transcription Handbook* [Online] Available: <http://www.qiagen.com/Knowledge-and-Support/Resource-Center/> [Accessed 09.04.2013].
- REECE, R. J. R. 2004. *Analysis of genes and genomes.* Chichester: Wiley
- RIES, G., HELLER, W., PUCHTA, H., SANDERMANN, H., SEIDLITZ, H. K. & HOHN, B. 2000. Elevated UV-B radiation reduces genome stability in plants. *Nature*, 406(6791), 98-101.
- RIZZINI, L., FAVORY, J. J., CLOIX, C., FAGGIONATO, D., O'HARA, A., KAISERLI, E., BAUMEISTER, R., SCHAFER, E., NAGY, F., JENKINS, G. I. & ULM, R. 2011. Perception of UV-B by the Arabidopsis UVR8 Protein. *Science*, 332(6025), 103-106.
- ROCHE APPLIED SCIENCE. 2008a. *LightCycler® 480 Instrument Operator's Manual. Software Version 1.5*
- ROCHE APPLIED SCIENCE. 2008b. *LightCycler® 480 Real-Time PCR System - High Resolution Melting: Optimization Strategies* [Online] [Accessed 10.04.2013].
- RODRIGUEZ, M. C. S., PETERSEN, M. & MUNDY, J. 2010. Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling in Plants. *Annual Review of Plant Biology*, 61, 621-649.
- ROJO, E. & DENECKE, J. 2008. What is moving in the secretory pathway of plants? *Plant Physiology*, 147(4), 1493-1503.
- ROWE, H. C., WALLEY, J. W., CORWIN, J., CHAN, E. K. F., DEHESH, K. & KLIEBENSTEIN, D. J. 2010. Deficiencies in Jasmonate-Mediated Plant Defense Reveal Quantitative Variation in Botrytis cinerea Pathogenesis. *Plos Pathogens*, 6(4), 1-18.
- SAMAJOVA, O., PLIHAL, O., AL-YOUSIF, M., HIRT, H. & SAMAJ, J. 2013. Improvement of stress tolerance in plants by genetic manipulation of mitogen-activated protein kinases. *Biotechnology Advances*, 31(1), 118-28.
- SHI, C. L., STENVIK, G. E., VIE, A. K., BONES, A. M., PAUTOT, V., PROVENIERS, M., AALEN, R. B. & BUTENKO, M. A. 2011. Arabidopsis Class I KNOTTED-Like Homeobox Proteins Act Downstream in the IDA-HAE/HSL2 Floral Abscission Signaling Pathway. *Plant Cell*, 23(7), 2553-2567.
- STAPLETON, A. E. 1992. Ultraviolet-Radiation and Plants - Burning Questions. *Plant Cell*, 4(11), 1353-1358.
- STASWICK, P. E. 2008. JAZing up jasmonate signaling. *Trends in Plant Science*, 13(2), 66-71.
- STASWICK, P. E., SU, W. & HOWELL, S. H. 1992. Methyl jasmonate inhibition of root growth and induction of a leaf protein are decreased in an Arabidopsis thaliana mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(15), 6837-6840.

REFERANSER

- STENVIK, G. E., TANDSTAD, N. M., GUO, Y., SHI, C. L., KRISTIANSSEN, W., HOLMGREN, A., CLARK, S. E., AALEN, R. B. & BUTENKO, M. A. 2008. The EPIP peptide of INFLORESCENCE DEFICIENT IN ABSCISSION is sufficient to induce abscission in Arabidopsis through the receptor-like kinases HAESA and HAESA-LIKE2. *Plant Cell*, 20(7), 1805-1817.
- TAIZ, L. & ZEIGER, E. 2010. *Plant physiology*. 5th ed. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates
- TAJ, G., AGARWAL, P., GRANT, M. & KUMAR, A. 2010. MAPK machinery in plants: recognition and response to different stresses through multiple signal transduction pathways. *Plant Signaling and Behavior*, 5(11), 1370-1378.
- TAYLOR, S., WAKEM, M., DIJKMAN, G., ALSARRAJ, M. & NGUYEN, M. 2010. A practical approach to RT-qPCR-Publishing data that conform to the MIQE guidelines. *Methods* [Online] DOI: 10.1016/j.ymeth.2010.01.005.
- THALER, J. S., HUMPHREY, P. T. & WHITEMAN, N. K. 2012. Evolution of jasmonate and salicylate signal crosstalk. *Trends in Plant Science*, 17(5), 260-270.
- THERMO FISHER SCIENTIFIC. 2008. *NanoDrop 1000 Spectrophotometer v3.7 User's Manual* [Online] Available: www.nanodrop.com [Accessed 08.06.2013].
- UKNES, S., MAUCHMANI, B., MOYER, M., POTTER, S., WILLIAMS, S., DINCHER, S., CHANDLER, D., SLUSARENKO, A., WARD, E. & RYALS, J. 1992. Acquired-Resistance in Arabidopsis. *Plant Cell*, 4(6), 645-656.
- ULM, R., BAUMANN, A., ORAVECZ, A., MATE, Z., ADAM, E., OAKELEY, E. J., SCHAFER, E. & NAGY, F. 2004. Genome-wide analysis of gene expression reveals function of the bZIP transcription factor HY5 in the UV-B response of Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(5), 1397-1402.
- ULM, R. & NAGY, F. 2005. Signalling and gene regulation in response to ultraviolet light. *Current Opinion in Plant Biology*, 8(5), 477-482.
- VERBURG, J. G. & HUYNH, Q. K. 1991. Purification and Characterization of an Antifungal Chitinase from Arabidopsis-Thaliana. *Plant Physiology*, 95(2), 450-455.
- VERHAGE, A., VAN WEES, S. C. M. & PIETERSE, C. M. J. 2010. Plant Immunity: It's the Hormones Talking, But What Do They Say? *Plant Physiology*, 154(2), 536-540.
- WASTERNAACK, C. 2007. Jasmonates: An update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Annals of Botany*, 100(4), 681-697.
- WEI, C. F., KVITKO, B. H., SHIMIZU, R., CRABILL, E., ALFANO, J. R., LIN, N. C., MARTIN, G. B., HUANG, H. C. & COLLMER, A. 2007. A Pseudomonas syringae pv. tomato DC3000 mutant lacking the type III effector HopQ1-1 is able to cause disease in the model plant Nicotiana benthamiana. *Plant Journal*, 51(1), 32-46.
- WEIGEL, D. & GLAZEBROOK, J. 2002. *Arabidopsis : A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press
- WONG, M. L. & MEDRANO, J. F. 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*, 39(1), 75-85.
- YAMAGAMI, T., TSUCHISAKA, A., YAMADA, K., HADDON, W. F., HARDEN, L. A. & THEOLOGIS, A. 2003. Biochemical diversity among the 1-amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase isozymes encoded by the Arabidopsis gene family. *Journal of Biological Chemistry*, 278(49), 49102-49112.
- ZHOU, N., TOOTLE, T. L. & GLAZEBROOK, J. 1999. Arabidopsis PAD3, a gene required for camalexin biosynthesis, encodes a putative cytochrome P450 monooxygenase. *Plant Cell*, 11(12), 2419-2428.

VEDLEGG

A1	VEKSTMEDIUM OG KJØREBUFFERE	75
	A1.1 Vekstmedium for planter og bakterier	75
	A1.2 Gel og kjørebuffer for elektroforese	76
A2	PRIMERE	79
	A2.1 Primere for RT-qPCR	79
	A2.2 Primere for PCR	80
A3	RESULTATER FRA SEGRESJONSANALYSER	81
A4	RESULTATER FRA LINREG-ANALYSER	82
	A4.1 LINREG-analyser fra irp9 IRP1-RNAi 11.2	82
	A4.2 LINREG-analyser fra linjer transformert med 35S-promoter	82
	A4.3 LINREG-analyser fra transkripsjonsanalyser av målgener i immunforsvaret	87
	A4.4 LINREG-analyser for transkripsjonsanalyser av målgener etter UV-B stråling	94
A5	RESULTATER FRA REST2009-ANALYSER	100
	A5.1 REST2009-analyser for dobbelmutanten irp9 IRP1-RNAi 11.2	100
	A5.2 REST2009-analyser for verifisering av 35S-promoter i transformerte linjer	100
	A5.3 REST2009-analyser for transkripsjonsanalyser av målgener i immunforsvaret	101
A6	RESULTATER FRA qBASEPLUS-ANALYSER	103
A7	RESULTATER FRA FORSØK MED <i>Pseudomonas syringae</i> pv. tomato DC3000	106
A8	RESULTATER FRA FORSØK MED FLG22-PEPTID TILSATT VEKSTMEDIET	107
A9	OMREGNING FRA INNSTRÅLINGSTETTHET TIL FLUKSTETTHET	109
A10	AMINOSYRESEKVENNS FOR IDA, IRP1, IRP9 OG IRP10	110

A1 VEKSTMEDIUM OG KJØREBUFFERE

A1.1 Vekstmedium for planter og bakterier

½ Murashige og Skoog (MS) medium

For dyrking av spirer i petriskåler ble det benyttet ½ MS tilsatt 2% sukker. Ved tilbereding av flytende ½ MS medium ble samme oppskrift, uten tilsetning av Phyto Agar/Bacto™ Agar, benyttet. Følgende komponenter inngår:

2,15 g Murashige og Skoog medium (Sigma-Aldrich)

20,0 g Sucrose (Merck)

6,0 g Phyto Agar (Duchefa Biochemie)/Bacto™ Agar (BD) 2:1

Komponentene ble tilsatt 1 liter Milli-Q vann og rørt til alt pulveret var oppløst. Deretter ble pH justert til 5,8, og mediet sterilisert i autoklav ved 121 °C i 20 minutt.

Jord

For planter som ble dyrket i jord ble det benyttet en blanding som bestod av jord og perlite i forholdet 3:1. Jorden ble autoklavert før bruk ved 121 °C i 40 minutt.

Lysogeny broth (LB) medium

Medium benyttet for vekst av *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC 3000.

10,0 g Bacto™ Tryptone (BD)

5,0 g Bacto™ Yeast Extract (BD)

5,0 g NaCl (Merck)

Komponentene ble tilsatt 1 liter Milli-Q vann og rørt til alt pulveret var oppløst. Mediet ble sterilisert i autoklav ved 121 °C i 20 minutt. Ved tilbereding av vekstmedium til bruk i petriskåler, ble det i tillegg tilsatt 14,0 g Bacto™ Agar (BD).

Kings B medium

Kings B medium ble benyttet for å fremme *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC 3000 virulens. Følgende komponenter inngår:

10,0 g Proteose pepton (Fluka)

1,5 g KH_2PO_4 (Merck)

7,5 ml 85 % (volum/volum) Glycerol (Apotekproduksjon AS)

10,0 ml 1,0 M MgSO_4 (Sigma Cellekulturer)

Proteose pepton, kaliumdihydrogenfosfat og glycerol ble tilsatt 1 liter Milli-Q vann og rørt til alle ingrediensene var løst. pH ble regulert til 7,0 og mediet autoklavert ved 121 °C i 20 minutt. Deretter ble magnesiumsulfat tilsatt til en sluttkonsentrasjon på 10 mM.

A1.2 Gel og kjørebuffer for elektroforese

50x TRIS base/eddiksyre/EDTA (TAE) kjørebuffer

Tilbereding av 50x TAE buffer:

242 g Trizma[®] base (Sigma-Aldrich)

57,1 ml iseddiksyre (Merck)

100 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0 (Sigma-Aldrich)

Ingrediensene ble tilsatt 1 liter Milli-Q vann og rørt til alt var løst. Løsningen ble fortynnet med Milli-Q vann til 1x TAE bruksløsning og oppbevart ved romtemperatur.

Agarosegel til standard elektroforese

I dette arbeidet ble agarosekonsentrasjoner tilsvarende 1,1-1,3% (vekt/volum) benyttet.

100 ml 1x TAE buffer

1,1/1,3 g agarose for rutine laboratoriearbeid (Sigma-Aldrich).

Løsningen ble varmet i mikrobølgeovn til all agarosen var løst. 5 µl 1X GelRed[™] nukleinsyrefarge for gel ble tilsatt, og løsningen ble helt i støpeform.

10x FA-gel buffer

Tilberedning av 10x FA-gel buffer:

200 mM MOPS (Sigma-Aldrich)

50 mM natrium acetat (Merck)

10 mM EDTA (Sigma-Aldrich)

Komponentene ble blandet i Milli-Q vann til sluttvolum 1 liter. PH ble justert til 7,0 med NaOH, og løsningen ble sterilisert i autoklaver ved 121 °C i 20 minutt. Løsningen ble lagret ved romtemperatur

1x FA-gel kjørebuffer (1000 ml)

Tilberedning av 1x FA-gel kjørebuffer:

100 ml 10x FA-gel kjørebuffer

20 ml 37% (12,3 M) formaldehyd (Sigma-Aldrich)

Komponentene ble tilsatt 880 ml Milli-Q vann og helt i elektroforesekar. FA-gel ble ekvilibrert i FA-kjørebuffer i minst 30 minutter før elektroforese ble startet.

FA-gel til elektroforese

I dette arbeidet ble 1,2% (vekt/volum) FA-gel benyttet.

1,2 g agarose for rutine laboratoriearbeid (Sigma-Aldrich)

10 ml 10x FA-gel kjørebuffer

Komponentene ble tilsatt 90 ml Milli-Q vann. Løsningen ble varmet i mikrobølgeovn til agarosen var oppløst. Etter avkjøling til 65°C ble 0,9 ml 37% (12,3 M) formaldehyd (Sigma-Aldrich) og 0,5 µl [10 mg/ml] Ethidium Bromide (Bio Rad Life Science) tilsatt og løsningen ble helt i støpeform.

5x RNA loading buffer

Tilberedning av 5x loading buffer

16 µl mettet vandig bromofenolblå

80 µl 500 mM EDTA, pH 8,0

VEDLEGG

720 μ l 37% (12,3 M) formaldehyd

2 ml 85% (volum/volum) glycerol

3,084 ml formamid

4 ml 10x FA-gel buffer

Komponentene ble blandet. Det ble tilsatt RNase fritt vann til sluttvolumet 10 ml.

A2 PRIMERE

A2.1 Primere for RT-qPCR

Tabell A2.1.1. Primerpar benyttet ved RT-qPCR-analyser

Gen	At-ID	Primer	Primersekvens
<i>IRP1</i>	At4g28460	qIRP1-f	5'-CGATGAGAAGAGTTAGTTGGT
		qIRP1-r	5'-GGAACCACCACGTGTTCTACG
<i>IRP9</i>	At2g23270	qIRP9-f	5'-TTTGGGTTTAACGAAGGCTGAA
		qIRP9-r	5'-TACCATATTCAAGCGTCTCAGT
<i>IRP9-2</i>	At2g23270	qIRP9-2f	5'-GACTGAGACGCTTGAATATGGT
		qIRP9-2r	5'-AAGCAGCCACATTAAGTGGTTC
<i>IRP10</i>	At4g37290	qIRP10-f	5'-TTGTTAAGCACTCAGGTCCAA
		qIRP10-r	5'-TTTCTCGACCTAGATGGGTATG
<i>CYP71A13</i>	At2G30770	qCyp71A13-f	5'-TAAAGAGGTGCTTCGGTTGC
		qCyp71A13-r	5'-TATCGCAGTGTCTCGTTGGA
<i>TIP41-LIKE</i>	At4g34270	qTIP41-like-f	5'-GTGAAAAGTGTGGAGAGA AGCAA
		qTIP41-like-r	5'-TCAACTGGATACCCTTTCGCA
<i>HY5</i>	At5g11260	qHY5-f	5'-AAGGCTTGCATCAGCATTAG
		qHY5-r	5'-TCTGAACTTGAAGAGCGACT
<i>PR1</i>	At2G14610	qPR1-f	5'-TGGGCCTTACGGGGAAAAGT
		qPR1-r	5'-CCTCACTTTGGCACATCCGA
<i>PDF1.2</i>	At5G44420	qPDF1.2-f	5'-CCCTTATCTTCGCTGCTCTT
		qPDF1.2-r	5'-TGCTGGGAAGACATAGTTGC
<i>JAZ7</i>	At2G34600	qJAZ7-f	5'-AACTGCGACAAGCCTTACTCA
		qJAZ7-r	5'-TTGATTCGTCCAACGAGCTATG
<i>JAZ8</i>	At1G30135	qJAZ8-f	5'-CAGATGTTACCCATCTTCAGGC
		qJAZ8-r	5'-ACCCGTTTGAGGATGACTTGGT
<i>JAZ10</i>	At5g13220	qJAZ10-f	5'-CCGATTCATCGGCTAAATCTCG
		qJAZ10-r	5'-CGAAACGAGTTCGGTACTAGAC
<i>CYP83B1</i>	At4g31500	qCyp83B1-f	5'-ACCCTAACCGCCCTAAACAA
		qCyp83B1-r	5'-CAGTTCCCGGCACAACAATA
<i>CHITINASE</i>	At1g02360	qChitinase-f	5'-TCTTACAAAGGAAGAGGTCCCA
		qChitinase-r	5'-TAAACCGTTCGAAACCCAATGCT
<i>PAD3</i>	At3g26830	qPAD3-f	5'-TGCTCCCAAGACAGACAATG
		qPAD3-r	5'-GTTTTGGATCACGACCCATC
<i>ACS4</i>	At2g22810.1	qACC4-f	5'-TCCAGGGTTTGATAGGGATCTA
		qACC4-r	5'-TAGGCTTCTTCGAGTGCAAGTT
<i>MYB51</i>	At1G18570	qMYB51-f	5'-AACAAATGGTCTGCTATAGCTC
		qMYB51-r	5'-GATATGAGTGTTCCAGTAGTTC

A2.2 Primere for PCR

Tabell A2.1. Primerpar benyttet ved PCR-analyser

PCR Primer	Spesifikasjon	Primerekvens
35S-f	Forover primer, verifisering av 35S-promoter	5'-TCCCAACCACGTCTTCAAAGCA
<i>IRP9</i> SM-LP	Forover primer for <i>IRP9</i>	5'-GAAGGAAGGTGAGGACATTAG
<i>IRP9</i> SM-RP	Revers primer for <i>IRP9</i>	5'-GTCGCTTCTTTTTGCTTTGTG
dSPM-1	Forover primer for verifisering av En/Spm transposon	5'-CTTATTTTCAGTAAGAGTGTGGGGTTTT GG
Ko_232	Forover primer for <i>IRP9</i>	5'-AGCAGCCACATTAAGTGGTTCG
Agri51	Forover primer for å verifisere Agrikola RNAi-insert	5'-CAA CCA CGT CTT CAA AGC AA
Agri56	Revers primer for å verifisere Agrikola RNAi-insert	5'-CTG GGG TAC CGA ATT CCT C

A3 RESULTATER FRA SEGRESJONSANALYSER

Tabell A3.1. Segresjon av BAR-gen for flere linjer transformert med konstruksjonen 35S::IRP10. Linjene er T₁ generasjon, dyrket på selektivt medium (basta). Observert frekvens for BAR^r:BAR^s, forventet frekvens, og resulterende Chi-kvadrattest for nullhypotesen H₀: Frekvens for BAR^r:BAR^s ≠ 3:1. Testobservatorens verdi: $X^2_{0,05, 1 \text{ df}} = 3,84$. For alle linjene var andelen ikke spirte frø < 5%.

Linje	Observert BAR ^r	Observert BAR ^s	Forventet BAR ^r	Forventet BAR ^s	X ²
35S::IRP10 10	76	19	71	24	1,3
35S::IRP10 11	74	20	71	24	0,7
35S::IRP10 12	69	19	66	22	0,5
35S::IRP10 13	87	9	72	24	12,5
35S::IRP10 14	1	66	50	17	193,1
35S::IRP10 15	85	8	70	23	13,3
35S::IRP10 16	84	2	65	22	23,6
35S::IRP10 17	66	18	63	21	0,6
35S::IRP10 18	64	20	63	21	0,1

Tabell A3.2. Segresjon av BAR-gen for linjer transformert med konstruksjonen 35S::IRP10. Linjene er T₂ generasjon, dyrket på selektivt medium. Observert frekvens for BAR^r:BAR^s, forventet frekvens, og resulterende Chi-kvadrattest for nullhypotesen H₀: Frekvens for BAR^r:BAR^s ≠ 1:0. Testobservatorens verdi: $X^2_{0,05, 1 \text{ df}} = 3,841$. For alle linjene var andelen ikke spirte frø < 5%.

Linje	Observert BAR ^r	Observert BAR ^s	Forventet BAR ^r	Forventet BAR ^s	X ²
35S::IRP10 10.2	55	16	73	0	229
35S::IRP10 10.3	62	12	74	0	123
35S::IRP10 10.5	66	16	82	0	228
35S::IRP10 11.1	79	0	79	0	0
35S::IRP10 11.2	63	23	87	0	491
35S::IRP10 11.3	83	0	83	0	0
35S::IRP10 12.3	67	14	81	0	171
35S::IRP10 12.4	71	3	74	0	4,12
35S::IRP10 12.5	55	18	73	0	293
35S::IRP10 17.1	55	17	73	0	260
35S::IRP10 17.3	50	25	75	0	584
35S::IRP10 17.5	79	0	79	0	0
35S::IRP10 18.2	78	0	78	0	0
35S::IRP10 18.3	54	19	73	0	329

A4 RESULTATER FRA LINREG-ANALYSER

A4.1 LINREG-analyser fra *irp9 IRP1*-RNAi 11.2

Tabell A.4.1.1. Cq-verdier, individuell- og gjennomsnittlig primereffektivitet for dobbel-knockout mutanten *irp9 IRP1*-RNAi 11.2. Genet *TIP41*-like er benyttet som referanseggen.

Målgen	Linje	Individuell PCR effektivitet	Gjennomsnitts PCR effektivitet	Cq-verdi
<i>IRP1</i>	vt_ctr1	1,841	1,854	34,137
<i>IRP1</i>	vt_ctr2	1,832	1,854	33,362
<i>IRP1</i>	vt_ctr3	1,846	1,854	33,882
<i>IRP1</i>	<i>Irp9 IRP1</i> -RNAi 11.2	1,867	1,854	36,536
<i>IRP1</i>	NTC	1,871	0,000	44,808
<i>IRP9</i>	vt_ctr1	1,870	1,876	35,046
<i>IRP9</i>	vt_ctr2	1,918	1,876	34,515
<i>IRP9</i>	vt_ctr3	1,890	1,876	33,893
<i>IRP9</i>	<i>Irp9 IRP1</i> -RNAi 11.2	1,000	0,000	0,000
<i>IRP9</i>	NTC	1,000	0,000	0,000
<i>TIP41</i> -like	vt_ctr1	1,898	1,901	24,422
<i>TIP41</i> -like	vt_ctr2	1,895	1,901	24,215
<i>TIP41</i> -like	vt_ctr3	1,919	1,901	24,516
<i>TIP41</i> -like	<i>Irp9 IRP1</i> -RNAi 11.2	1,886	1,901	24,240
<i>TIP41</i> -like	NTC	1,000	0,000	0,000

A4.2 LINREG-analyser fra linjer transformert med 35S-promoter

Tabell A.4.2.1. Cq-verdier, individuell- og gjennomsnittlig primereffektivitet for linjer transformert med konstruksjonen 35S::*IRP1*. Linjene i denne tabellen viser oppregulert genuttrykk av *IRP1*. Genet *TIP41*-like er benyttet som referanseggen.

Målgen	Linje	Individuell PCR effektivitet	Gjennomsnitts PCR effektivitet	Cq-verdi
<i>IRP1</i>	vt_ctr1	1,940	1,929	32,602
<i>IRP1</i>	vt_ctr2	1,943	1,929	32,756
<i>IRP1</i>	vt_ctr3	1,912	1,929	32,203
<i>IRP1</i>	35S:: <i>IRP1</i> 1.3.1	1,934	1,929	16,329
<i>IRP1</i>	35S:: <i>IRP1</i> 1.3.2	1,914	1,929	17,156
<i>IRP1</i>	35S:: <i>IRP1</i> 1.3.3	1,948	1,929	15,932
<i>IRP1</i>	NTC	1,000	0,000	0,000
<i>TIP41</i> -like	vt_ctr1	1,921	1,923	23,559

VEDLEGG

<i>TIP41</i> -like	vt_ctr2	1,902	1,923	23,826
<i>TIP41</i> -like	vt_ctr3	1,930	1,923	23,655
<i>TIP41</i> -like	35S:: <i>IRP1</i> 1.3.1	1,938	1,923	23,777
<i>TIP41</i> -like	35S:: <i>IRP1</i> 1.3.2	1,893	1,923	24,046
<i>TIP41</i> -like	35S:: <i>IRP1</i> 1.3.3	1,947	1,923	23,687
<i>TIP41</i> -like	NTC	1,000	0,000	0,000
<i>IRP1</i>	vt_ctr1	1,895	1,909	32,409
<i>IRP1</i>	vt_ctr2	1,865	1,909	31,151
<i>IRP1</i>	vt_ctr3	1,884	1,909	31,807
<i>IRP1</i>	35S:: <i>IRP1</i> 3.2.1	1,918	1,909	15,310
<i>IRP1</i>	35S:: <i>IRP1</i> 3.2.2	1,947	1,909	17,642
<i>IRP1</i>	35S:: <i>IRP1</i> 3.2.3	1,946	1,909	15,204
<i>IRP1</i>	NTC	1,916	1,916	38,345
<i>TIP41</i> -like	vt_ctr1	1,847	1,857	24,903
<i>TIP41</i> -like	vt_ctr2	1,842	1,857	24,761
<i>TIP41</i> -like	vt_ctr3	1,843	1,857	25,253
<i>TIP41</i> -like	35S:: <i>IRP1</i> 3.2.1	1,877	1,857	24,549
<i>TIP41</i> -like	35S:: <i>IRP1</i> 3.2.2	1,849	1,857	24,983
<i>TIP41</i> -like	35S:: <i>IRP1</i> 3.2.3	1,886	1,857	24,601
<i>TIP41</i> -like	NTC	1,000	1,916	0,000

Tabell A4.2.2. Cq-verdier, individuell- og gjennomsnittlig primereffektivitet for linjer transformert med konstruksjonen 35S::*IRP1*. Genet *TIP41*-like er benyttet som referanseggen.

Målgen	Linje	Individuell PCR effektivitet	Gjennomsnitts PCR effektivitet	Cq-verdi
<i>IRP1</i>	vt_ctr1	1,940	1,929	32,602
<i>IRP1</i>	vt_ctr2	1,943	1,929	32,756
<i>IRP1</i>	vt_ctr3	1,912	1,929	32,203
<i>IRP1</i>	35S:: <i>IRP1</i> 6.3.1	1,956	1,929	29,181
<i>IRP1</i>	35S:: <i>IRP1</i> 6.3.2	1,900	1,929	32,080
<i>IRP1</i>	35S:: <i>IRP1</i> 6.3.3	1,926	1,929	32,257
<i>IRP1</i>	NTC	1,000	0,000	0,000
<i>TIP41</i> -like	vt_ctr1	1,921	1,911	23,559
<i>TIP41</i> -like	vt_ctr2	1,902	1,911	23,826
<i>TIP41</i> -like	vt_ctr3	1,930	1,911	23,655
<i>TIP41</i> -like	35S:: <i>IRP1</i> 6.3.1	1,914	1,911	24,205
<i>TIP41</i> -like	35S:: <i>IRP1</i> 6.3.2	1,903	1,911	24,024
<i>TIP41</i> -like	35S:: <i>IRP1</i> 6.3.3	1,911	1,911	24,036
<i>TIP41</i> -like	NTC	1,000	0,000	0,000

VEDLEGG

Tabell A4.2.3. Cq-verdier, individuell- og gjennomsnittlig primereffektivitet for linjer transformert med konstruksjonen 35S::*IRP9*. Linjene i denne tabellen viser oppregulert genuttrykk for *IRP9*. Genet *TIP41*-like er benyttet som referanseggen.

Målgen	Linje	Individuell PCR effektivitet	Gjennomsnitts PCR effektivitet	Cq-verdi
<i>IRP9</i>	vt_ctr1	1,852	1,826	30,441
<i>IRP9</i>	vt_ctr2	1,867	1,826	30,984
<i>IRP9</i>	vt_ctr3	1,861	1,826	32,764
<i>IRP9</i>	35S:: <i>IRP9</i> 6.4.1	1,838	1,826	15,808
<i>IRP9</i>	35S:: <i>IRP9</i> 6.4.2	1,837	1,826	17,337
<i>IRP9</i>	35S:: <i>IRP9</i> 6.4.3	1,859	1,826	17,828
<i>IRP9</i>	35S:: <i>IRP9</i> 7.1.1	1,843	1,826	14,808
<i>IRP9</i>	35S:: <i>IRP9</i> 7.1.2	1,846	1,852	16,337
<i>IRP9</i>	35S:: <i>IRP9</i> 7.1.3	1,856	1,852	16,828
<i>IRP9</i>	NTC	1,000	0,000	0,000
<i>TIP41</i> -like	vt_ctr1	1,896	1,879	24,701
<i>TIP41</i> -like	vt_ctr2	1,903	1,879	24,762
<i>TIP41</i> -like	vt_ctr3	1,867	1,879	25,787
<i>TIP41</i> -like	35S:: <i>IRP9</i> 6.4.1	1,874	1,879	25,805
<i>TIP41</i> -like	35S:: <i>IRP9</i> 6.4.2	1,871	1,879	26,159
<i>TIP41</i> -like	35S:: <i>IRP9</i> 6.4.3	1,867	1,879	25,754
<i>TIP41</i> -like	35S:: <i>IRP9</i> 7.1.1	1,884	1,879	25,676
<i>TIP41</i> -like	35S:: <i>IRP9</i> 7.1.2	1,879	1,879	25,488
<i>TIP41</i> -like	35S:: <i>IRP9</i> 7.1.3	1,852	1,879	25,229
<i>TIP41</i> -like	NTC	1,000	0,000	0,000

Tabell A4.2.4. Cq-verdier, individuell- og gjennomsnittlig primereffektivitet for linjer transformert med konstruksjonen 35S::*IRP9*. Genet *TIP41*-like er benyttet som referanseggen.

Målgen	Linje	Individuell PCR effektivitet	Gjennomsnitts PCR effektivitet	Cq-verdi
<i>IRP9</i>	vt_ctr1	1,823	1,830	34,590
<i>IRP9</i>	vt_ctr2	1,841	1,830	33,597
<i>IRP9</i>	vt_ctr3	1,825	1,830	34,043
<i>IRP9</i>	35S:: <i>IRP9</i> 8.1.1	1,824	1,830	32,966
<i>IRP9</i>	35S:: <i>IRP9</i> 8.1.2	1,851	1,830	34,586
<i>IRP9</i>	35S:: <i>IRP9</i> 8.1.3	1,814	1,830	33,332
<i>IRP9</i>	NTC	1,000	0,000	0,000
<i>TIP41</i> -like	vt_ctr1	1,921	1,911	23,559
<i>TIP41</i> -like	vt_ctr2	1,902	1,911	23,826
<i>TIP41</i> -like	vt_ctr3	1,930	1,911	23,655

VEDLEGG

<i>TIP41</i> -like	35S:: <i>IRP9</i> 8.1.1	1,904	1,911	23,935
<i>TIP41</i> -like	35S:: <i>IRP9</i> 8.1.2	1,903	1,911	23,976
<i>TIP41</i> -like	35S:: <i>IRP9</i> 8.1.3	1,892	1,911	23,915
<i>TIP41</i> -like	NTC	1,000	0,000	0,000

Tabell A4.2.5. Cq-verdier, individuell- og gjennomsnittlig primereffektivitet for linjer transformert med konstruksjonen 35S::*IRP10*. Genet *TIP41*-like er benyttet som referansegen.

Målgen	Linje	Individuell PCR effektivitet	Gjennomsnitts PCR effektivitet	Cq-verdi
<i>IRP10</i>	vt_ctr1	1,828	1,826	35,369
<i>IRP10</i>	vt_ctr2	1,814	1,826	33,841
<i>IRP10</i>	vt_ctr3	1,836	1,826	34,092
<i>IRP10</i>	35S:: <i>IRP10</i> 7.3.1	1,828	1,826	34,116
<i>IRP10</i>	35S:: <i>IRP10</i> 7.3.2	1,799	1,826	33,612
<i>IRP10</i>	35S:: <i>IRP10</i> 7.3.3	1,849	1,826	34,726
<i>IRP10</i>	NTC	1,000	0,000	0,000
<i>TIP41</i> -like	vt_ctr1	1,921	1,911	23,559
<i>TIP41</i> -like	vt_ctr2	1,902	1,911	23,826
<i>TIP41</i> -like	vt_ctr3	1,930	1,911	23,655
<i>TIP41</i> -like	35S:: <i>IRP10</i> 7.3.1	1,899	1,911	23,947
<i>TIP41</i> -like	35S:: <i>IRP10</i> 7.3.2	1,897	1,911	24,337
<i>TIP41</i> -like	35S:: <i>IRP10</i> 7.3.3	1,912	1,911	23,547
<i>TIP41</i> -like	NTC	1,000	0,000	0,000
<i>IRP10</i>	vt_ctr1	1,762	1,769	34,342
<i>IRP10</i>	vt_ctr2	1,745	1,769	32,279
<i>IRP10</i>	vt_ctr3	1,759	1,769	32,672
<i>IRP10</i>	vt_ctr4	1,780	1,769	34,114
<i>IRP10</i>	35S:: <i>IRP10</i> 11.1.1	1,787	1,769	37,051
<i>IRP10</i>	35S:: <i>IRP10</i> 11.1.2	1,776	1,769	36,231
<i>IRP10</i>	35S:: <i>IRP10</i> 11.1.3	1,772	1,769	38,730
<i>IRP10</i>	35S:: <i>IRP10</i> 11.1.4	1,771	1,769	37,151
<i>IRP10</i>	35S:: <i>IRP10</i> 12.4.1	1,787	1,769	36,103
<i>IRP10</i>	35S:: <i>IRP10</i> 12.4.2	1,758	1,769	37,484
<i>IRP10</i>	35S:: <i>IRP10</i> 12.4.3	1,779	1,769	38,577
<i>IRP10</i>	35S:: <i>IRP10</i> 12.4.4	1,741	1,769	36,868
<i>IRP10</i>	35S:: <i>IRP10</i> 17.5.1	1,783	1,769	37,743
<i>IRP10</i>	35S:: <i>IRP10</i> 17.5.2	1,773	1,769	35,793
<i>IRP10</i>	35S:: <i>IRP10</i> 17.5.3	1,768	1,769	37,190
<i>IRP10</i>	35S:: <i>IRP10</i> 17.5.4	1,767	1,769	38,890
<i>IRP10</i>	NTC	1,000	0,000	0,000
<i>TIP41</i> -like	vt_ctr1	1,896	1,899	24,185

VEDLEGG

<i>TIP41-like</i>	vt_ctr2	1,915	1,899	24,362
<i>TIP41-like</i>	vt_ctr3	1,887	1,899	23,959
<i>TIP41-like</i>	vt_ctr4	1,900	1,899	24,104
<i>TIP41-like</i>	35S:: <i>IRP10</i> 11.1.1	1,915	1,899	24,858
<i>TIP41-like</i>	35S:: <i>IRP10</i> 11.1.2	1,906	1,899	25,250
<i>TIP41-like</i>	35S:: <i>IRP10</i> 11.1.3	1,895	1,899	25,073
<i>TIP41-like</i>	35S:: <i>IRP10</i> 11.1.4	1,886	1,899	24,857
<i>TIP41-like</i>	35S:: <i>IRP10</i> 12.4.1	1,896	1,899	25,038
<i>TIP41-like</i>	35S:: <i>IRP10</i> 12.4.2	1,902	1,899	25,310
<i>TIP41-like</i>	35S:: <i>IRP10</i> 12.4.3	1,892	1,899	25,295
<i>TIP41-like</i>	35S:: <i>IRP10</i> 12.4.4	1,905	1,899	25,340
<i>TIP41-like</i>	35S:: <i>IRP10</i> 17.5.1	1,903	1,899	24,920
<i>TIP41-like</i>	35S:: <i>IRP10</i> 17.5.2	1,893	1,899	25,120
<i>TIP41-like</i>	35S:: <i>IRP10</i> 17.5.3	1,899	1,899	25,039
<i>TIP41-like</i>	35S:: <i>IRP10</i> 17.5.4	1,895	1,899	24,824
<i>TIP41-like</i>	NTC	1,000	0,000	0,000
<i>IRP10</i>	vt_ctr1	1,861	1,834	36,673
<i>IRP10</i>	vt_ctr2	1,832	1,834	35,868
<i>IRP10</i>	vt_ctr3	1,823	1,834	36,223
<i>IRP10</i>	35S:: <i>IRP10</i> 18.2.1	1,845	1,834	43,171
<i>IRP10</i>	35S:: <i>IRP10</i> 18.2.2	1,824	1,834	34,201
<i>IRP10</i>	35S:: <i>IRP10</i> 18.2.3	1,843	1,834	39,439
<i>IRP10</i>	NTC	1,000	0,000	0,000
<i>TIP41-like</i>	vt_ctr1	1,899	1,915	25,947
<i>TIP41-like</i>	vt_ctr2	1,935	1,915	25,866
<i>TIP41-like</i>	vt_ctr3	1,923	1,915	25,601
<i>TIP41-like</i>	35S:: <i>IRP10</i> 18.2.1	1,902	1,905	26,002
<i>TIP41-like</i>	35S:: <i>IRP10</i> 18.2.2	1,913	1,905	26,033
<i>TIP41-like</i>	35S:: <i>IRP10</i> 18.2.3	1,876	1,905	26,645
<i>TIP41-like</i>	NTC	1,000	0,000	0,000

A4.3 LINREG-analyser fra transkripsjonsanalyser av målgener i immunforsvaret

Tabell A4.3.1. Transkripsjonsanalyse for målgener i immunforsvaret utført på linjene villtype, 35S::*IRP1* 1.3.1 og 35S::*IRP9* 7.1.1. Tabellen viser Cq-verdier, individuell- og gjennomsnittlig primereffektivitet. Genet *TIP41*-like er benyttet som referanseggen.

Målgen	Linje	Individuell PCR effektivitet	Gjennomsnittlig PCR effektivitet	Cq-verdi
JAZ7	vt_ctr1	1,866	1,889	25,280
JAZ7	vt_ctr2	1,880	1,889	24,342
JAZ7	vt_ctr3	1,903	1,889	25,616
JAZ7	vt_ctr4	1,891	1,889	25,339
JAZ7	35S:: <i>IRP1</i> 1.3.1	1,877	1,889	28,876
JAZ7	35S:: <i>IRP1</i> 1.3.2	1,912	1,889	28,522
JAZ7	35S:: <i>IRP1</i> 1.3.3	1,890	1,889	29,228
JAZ7	35S:: <i>IRP1</i> 1.3.4	1,883	1,889	27,935
JAZ7	35S:: <i>IRP9</i> 7.1.1	1,895	1,889	25,661
JAZ7	35S:: <i>IRP9</i> 7.1.2	1,888	1,889	26,277
JAZ7	35S:: <i>IRP9</i> 7.1.3	1,876	1,889	25,973
JAZ7	35S:: <i>IRP9</i> 7.1.4	1,909	1,889	27,388
JAZ7	NTC	1,000	0,000	0,000
JAZ8	vt_ctr1	1,914	1,907	25,542
JAZ8	vt_ctr2	1,912	1,907	24,386
JAZ8	vt_ctr3	1,904	1,907	25,235
JAZ8	vt_ctr4	1,895	1,907	25,096
JAZ8	35S:: <i>IRP1</i> 1.3.1	1,899	1,907	27,906
JAZ8	35S:: <i>IRP1</i> 1.3.2	1,915	1,907	27,960
JAZ8	35S:: <i>IRP1</i> 1.3.3	1,908	1,907	27,141
JAZ8	35S:: <i>IRP1</i> 1.3.4	1,908	1,907	26,266
JAZ8	35S:: <i>IRP9</i> 7.1.1	1,917	1,907	25,784
JAZ8	35S:: <i>IRP9</i> 7.1.2	1,910	1,907	25,405
JAZ8	35S:: <i>IRP9</i> 7.1.3	1,899	1,907	25,684
JAZ8	35S:: <i>IRP9</i> 7.1.4	1,901	1,907	25,797
JAZ8	NTC	1,000	0,000	0,000
JAZ10	vt_ctr1	1,945	2,050	24,771
JAZ10	vt_ctr2	2,016	2,050	23,229
JAZ10	vt_ctr3	2,066	2,050	24,756
JAZ10	vt_ctr4	2,085	2,050	24,230
JAZ10	35S:: <i>IRP1</i> 1.3.1	2,165	2,050	26,269
JAZ10	35S:: <i>IRP1</i> 1.3.2	2,050	2,050	26,033
JAZ10	35S:: <i>IRP1</i> 1.3.3	2,080	2,050	25,729

VEDLEGG

<i>JAZ10</i>	35S:: <i>IRP1</i> 1.3.4	2,039	2,050	24,964
<i>JAZ10</i>	35S:: <i>IRP9</i> 7.1.1	2,012	2,050	24,106
<i>JAZ10</i>	35S:: <i>IRP9</i> 7.1.2	2,089	2,050	24,330
<i>JAZ10</i>	35S:: <i>IRP9</i> 7.1.3	2,029	2,050	24,152
<i>JAZ10</i>	35S:: <i>IRP9</i> 7.1.4	2,031	2,050	26,182
<i>AZ10</i>	NTC	1,000	0,000	0,000
<i>PDF1.2</i>	vt_ctr1	1,862	1,852	23,315
<i>PDF1.2</i>	vt_ctr2	1,870	1,852	22,687
<i>PDF1.2</i>	vt_ctr3	1,860	1,852	22,767
<i>PDF1.2</i>	vt_ctr4	1,853	1,852	23,088
<i>PDF1.2</i>	35S:: <i>IRP1</i> 1.3.1	1,849	1,852	23,722
<i>PDF1.2</i>	35S:: <i>IRP1</i> 1.3.2	1,855	1,852	22,742
<i>PDF1.2</i>	35S:: <i>IRP1</i> 1.3.3	1,849	1,852	22,709
<i>PDF1.2</i>	35S:: <i>IRP1</i> 1.3.4	1,845	1,852	22,775
<i>PDF1.2</i>	35S:: <i>IRP9</i> 7.1.1	1,861	1,852	25,145
<i>PDF1.2</i>	35S:: <i>IRP9</i> 7.1.2	1,831	1,852	24,538
<i>PDF1.2</i>	35S:: <i>IRP9</i> 7.1.3	1,845	1,852	23,911
<i>PDF1.2</i>	35S:: <i>IRP9</i> 7.1.4	1,844	1,852	23,886
<i>PDF1.2</i>	NTC	1,000	0,000	0,000
<i>PR1</i>	vt_ctr1	1,707	1,712	25,938
<i>PR1</i>	vt_ctr2	1,711	1,712	25,678
<i>PR1</i>	vt_ctr3	1,718	1,712	24,722
<i>PR1</i>	vt_ctr4	1,726	1,712	25,254
<i>PR1</i>	35S:: <i>IRP1</i> 1.3.1	1,716	1,712	25,603
<i>PR1</i>	35S:: <i>IRP1</i> 1.3.2	1,703	1,712	25,701
<i>PR1</i>	35S:: <i>IRP1</i> 1.3.3	1,710	1,712	26,136
<i>PR1</i>	35S:: <i>IRP1</i> 1.3.4	1,725	1,712	25,435
<i>PR1</i>	35S:: <i>IRP9</i> 7.1.1	1,702	1,712	25,697
<i>PR1</i>	35S:: <i>IRP9</i> 7.1.2	1,639	1,712	26,274
<i>PR1</i>	35S:: <i>IRP9</i> 7.1.3	1,689	1,712	24,668
<i>PR1</i>	35S:: <i>IRP9</i> 7.1.4	1,728	1,712	25,371
<i>PR1</i>	NTC	1,000	0,000	0,000
<i>CYP71A13</i>	vt_ctr1	1,921	1,921	26,661
<i>CYP71A13</i>	vt_ctr2	1,904	1,921	26,985
<i>CYP71A13</i>	vt_ctr3	1,935	1,921	26,590
<i>CYP71A13</i>	vt_ctr4	1,941	1,921	26,351
<i>CYP71A13</i>	35S:: <i>IRP1</i> 1.3.1	1,911	1,921	29,351
<i>CYP71A13</i>	35S:: <i>IRP1</i> 1.3.2	1,923	1,921	28,790
<i>CYP71A13</i>	35S:: <i>IRP1</i> 1.3.3	1,920	1,921	25,428
<i>CYP71A13</i>	35S:: <i>IRP1</i> 1.3.4	1,939	1,921	27,644
<i>CYP71A13</i>	35S:: <i>IRP9</i> 7.1.1	1,920	1,921	26,564
<i>CYP71A13</i>	35S:: <i>IRP9</i> 7.1.2	1,907	1,921	25,539

VEDLEGG

<i>CYP71A13</i>	35S:: <i>IRP9</i> 7.1.3	1,906	1,921	26,294
<i>CYP71A13</i>	35S:: <i>IRP9</i> 7.1.4	1,925	1,921	26,388
<i>CYP71A13</i>	NTC	1,000	0,000	0,000
<i>CYP83B1</i>	vt_ctr1	1,864	1,852	21,880
<i>CYP83B1</i>	vt_ctr2	1,862	1,852	21,680
<i>CYP83B1</i>	vt_ctr3	1,851	1,852	22,157
<i>CYP83B1</i>	vt_ctr4	1,856	1,852	22,021
<i>CYP83B1</i>	35S:: <i>IRP1</i> 1.3.1	1,852	1,852	22,442
<i>CYP83B1</i>	35S:: <i>IRP1</i> 1.3.2	1,839	1,852	22,243
<i>CYP83B1</i>	35S:: <i>IRP1</i> 1.3.3	1,845	1,852	22,518
<i>CYP83B1</i>	35S:: <i>IRP1</i> 1.3.4	1,837	1,852	21,880
<i>CYP83B1</i>	35S:: <i>IRP9</i> 7.1.1	1,854	1,852	22,696
<i>CYP83B1</i>	35S:: <i>IRP9</i> 7.1.2	1,857	1,852	22,546
<i>CYP83B1</i>	35S:: <i>IRP9</i> 7.1.3	1,851	1,852	22,758
<i>CYP83B1</i>	35S:: <i>IRP9</i> 7.1.4	1,854	1,852	22,155
<i>CYP83B1</i>	NTC	1,000	0,000	0,000
<i>CHITINASE</i>	vt_ctr1	1,863	1,881	25,895
<i>CHITINASE</i>	vt_ctr2	1,872	1,881	25,093
<i>CHITINASE</i>	vt_ctr3	1,908	1,881	24,766
<i>CHITINASE</i>	vt_ctr4	1,873	1,881	25,020
<i>CHITINASE</i>	35S:: <i>IRP1</i> 1.3.1	1,895	1,881	26,319
<i>CHITINASE</i>	35S:: <i>IRP1</i> 1.3.2	1,874	1,881	26,045
<i>CHITINASE</i>	35S:: <i>IRP1</i> 1.3.3	1,883	1,881	25,385
<i>CHITINASE</i>	35S:: <i>IRP1</i> 1.3.4	1,892	1,881	25,443
<i>CHITINASE</i>	35S:: <i>IRP9</i> 7.1.1	1,910	1,881	25,709
<i>CHITINASE</i>	35S:: <i>IRP9</i> 7.1.2	1,876	1,881	25,357
<i>CHITINASE</i>	35S:: <i>IRP9</i> 7.1.3	1,860	1,881	24,982
<i>CHITINASE</i>	35S:: <i>IRP9</i> 7.1.4	1,868	1,881	25,902
<i>CHITINASE</i>	NTC	1,000	0,000	0,000
<i>PAD3</i>	vt_ctr1	1,850	1,838	25,684
<i>PAD3</i>	vt_ctr2	1,842	1,838	25,948
<i>PAD3</i>	vt_ctr3	1,843	1,838	26,439
<i>PAD3</i>	vt_ctr4	1,826	1,838	26,083
<i>PAD3</i>	35S:: <i>IRP1</i> 1.3.1	1,835	1,838	26,490
<i>PAD3</i>	35S:: <i>IRP1</i> 1.3.2	1,852	1,838	26,458
<i>PAD3</i>	35S:: <i>IRP1</i> 1.3.3	1,832	1,838	24,858
<i>PAD3</i>	35S:: <i>IRP1</i> 1.3.4	1,855	1,838	25,601
<i>PAD3</i>	35S:: <i>IRP9</i> 7.1.1	1,834	1,838	25,888
<i>PAD3</i>	35S:: <i>IRP9</i> 7.1.2	1,825	1,838	25,057
<i>PAD3</i>	35S:: <i>IRP9</i> 7.1.3	1,824	1,838	25,818
<i>PAD3</i>	35S:: <i>IRP9</i> 7.1.4	1,836	1,838	25,134
<i>PAD3</i>	NTC	1,000	0,000	0,000

VEDLEGG

<i>ACS4</i>	vt_ctr1	1,895	1,893	31,411
<i>ACS4</i>	vt_ctr2	1,906	1,893	30,492
<i>ACS4</i>	vt_ctr3	1,889	1,893	30,397
<i>ACS4</i>	vt_ctr4	1,889	1,893	29,585
<i>ACS4</i>	35S:: <i>IRP1</i> 1.3.1	1,880	1,893	30,951
<i>ACS4</i>	35S:: <i>IRP1</i> 1.3.2	1,877	1,893	32,225
<i>ACS4</i>	35S:: <i>IRP1</i> 1.3.3	1,907	1,893	29,684
<i>ACS4</i>	35S:: <i>IRP1</i> 1.3.4	1,893	1,893	31,087
<i>ACS4</i>	35S:: <i>IRP9</i> 7.1.1	1,905	1,893	30,195
<i>ACS4</i>	35S:: <i>IRP9</i> 7.1.2	1,859	1,893	29,928
<i>ACS4</i>	35S:: <i>IRP9</i> 7.1.3	1,894	1,893	28,706
<i>ACS4</i>	35S:: <i>IRP9</i> 7.1.4	1,923	1,893	33,241
<i>ACS4</i>	NTC	1,000	0,000	0,000
<i>MYB51</i>	vt_ctr1	1,862	1,868	26,904
<i>MYB51</i>	vt_ctr2	1,856	1,868	26,518
<i>MYB51</i>	vt_ctr3	1,862	1,868	26,919
<i>MYB51</i>	vt_ctr4	1,000	1,868	0,000
<i>MYB51</i>	35S:: <i>IRP1</i> 1.3.1	1,877	1,868	27,640
<i>MYB51</i>	35S:: <i>IRP1</i> 1.3.2	1,876	1,868	27,589
<i>MYB51</i>	35S:: <i>IRP1</i> 1.3.3	1,864	1,868	26,194
<i>MYB51</i>	35S:: <i>IRP1</i> 1.3.4	1,870	1,868	26,413
<i>MYB51</i>	35S:: <i>IRP9</i> 7.1.1	1,857	1,868	26,084
<i>MYB51</i>	35S:: <i>IRP9</i> 7.1.2	1,877	1,868	25,731
<i>MYB51</i>	35S:: <i>IRP9</i> 7.1.3	1,846	1,868	26,059
<i>MYB51</i>	35S:: <i>IRP9</i> 7.1.4	1,906	1,868	28,475
<i>MYB51</i>	NTC	1,000	0,000	0,000
<i>TIP41-like</i>	vt_ctr1	1,895	1,887	24,604
<i>TIP41-like</i>	vt_ctr2	1,874	1,887	24,301
<i>TIP41-like</i>	vt_ctr3	1,892	1,887	24,461
<i>TIP41-like</i>	vt_ctr4	1,891	1,887	24,408
<i>TIP41-like</i>	35S:: <i>IRP1</i> 1.3.1	1,896	1,887	24,555
<i>TIP41-like</i>	35S:: <i>IRP1</i> 1.3.2	1,893	1,887	24,440
<i>TIP41-like</i>	35S:: <i>IRP1</i> 1.3.3	1,868	1,887	24,589
<i>TIP41-like</i>	35S:: <i>IRP1</i> 1.3.4	1,891	1,887	24,405
<i>TIP41-like</i>	35S:: <i>IRP9</i> 7.1.1	1,875	1,887	24,656
<i>TIP41-like</i>	35S:: <i>IRP9</i> 7.1.2	1,892	1,887	24,487
<i>TIP41-like</i>	35S:: <i>IRP9</i> 7.1.3	1,893	1,887	24,718
<i>TIP41-like</i>	35S:: <i>IRP9</i> 7.1.4	1,886	1,887	24,831
<i>TIP41-like</i>	NTC	1,000	0,000	0,000

VEDLEGG

Tabell A4.3.2. Transkripsjonsanalyse for målgener i immunforsvaret utført på linjene villtype, 35S::*IRP1* 3.2.1 og 35S::*IRP9* 6.4.1. Tabellen viser Cq-verdier, individuell- og gjennomsnittlig primereffektivitet. Genet *TIP41*-like er benyttet som referanseggen.

Målgen	Linje	Individuell PCR effektivitet	Gjennomsnittlig PCR effektivitet	Cq-verdi
JAZ7	vt_ctr1	1,874	1,866	25,434
JAZ7	vt_ctr2	1,883	1,866	23,363
JAZ7	vt_ctr3	1,867	1,866	25,057
JAZ7	vt_ctr4	1,862	1,866	24,296
JAZ7	35S:: <i>IRP1</i> 3.2.1	1,858	1,866	26,282
JAZ7	35S:: <i>IRP1</i> 3.2.2	1,854	1,866	26,220
JAZ7	35S:: <i>IRP1</i> 3.2.3	1,857	1,866	25,941
JAZ7	35S:: <i>IRP1</i> 3.2.4	1,861	1,866	25,890
JAZ7	35S:: <i>IRP9</i> 6.4.1	1,865	1,866	26,622
JAZ7	35S:: <i>IRP9</i> 6.4.2	1,870	1,866	27,541
JAZ7	35S:: <i>IRP9</i> 6.4.3	1,847	1,866	26,020
JAZ7	35S:: <i>IRP9</i> 6.4.4	1,897	1,866	25,767
JAZ7	NTC	1,000	0,000	0,000
JAZ8	vt_ctr1	1,902	1,898	25,795
JAZ8	vt_ctr2	1,901	1,898	23,905
JAZ8	vt_ctr3	1,878	1,898	24,937
JAZ8	vt_ctr4	1,912	1,898	24,426
JAZ8	35S:: <i>IRP1</i> 3.2.1	1,904	1,898	26,176
JAZ8	35S:: <i>IRP1</i> 3.2.2	1,902	1,898	25,940
JAZ8	35S:: <i>IRP1</i> 3.2.3	1,904	1,898	26,207
JAZ8	35S:: <i>IRP1</i> 3.2.4	1,887	1,898	26,109
JAZ8	35S:: <i>IRP9</i> 6.4.1	1,891	1,898	26,367
JAZ8	35S:: <i>IRP9</i> 6.4.2	1,901	1,898	26,832
JAZ8	35S:: <i>IRP9</i> 6.4.3	1,874	1,898	26,235
JAZ8	35S:: <i>IRP9</i> 6.4.4	1,915	1,898	25,751
JAZ8	NTC	1,000	0,000	0,000
JAZ10	vt_ctr1	1,854	1,881	24,946
JAZ10	vt_ctr2	1,867	1,881	22,269
JAZ10	vt_ctr3	1,864	1,881	24,076
JAZ10	vt_ctr4	1,888	1,881	23,543
JAZ10	35S:: <i>IRP1</i> 3.2.1	1,855	1,881	25,058
JAZ10	35S:: <i>IRP1</i> 3.2.2	1,894	1,881	25,390
JAZ10	35S:: <i>IRP1</i> 3.2.3	1,896	1,881	24,606
JAZ10	35S:: <i>IRP1</i> 3.2.4	1,851	1,881	24,931
JAZ10	35S:: <i>IRP9</i> 6.4.1	1,890	1,881	25,282
JAZ10	35S:: <i>IRP9</i> 6.4.2	1,920	1,881	25,603
JAZ10	35S:: <i>IRP9</i> 6.4.3	1,910	1,881	24,800

VEDLEGG

<i>JAZ10</i>	35S:: <i>IRP9</i> 6.4.4	1,884	1,881	24,650
<i>JAZ10</i>	NTC	1,000	0,000	0,000
<i>PDF1.2</i>	vt_ctr1	1,908	1,902	20,262
<i>PDF1.2</i>	vt_ctr2	1,874	1,902	18,964
<i>PDF1.2</i>	vt_ctr3	1,907	1,902	18,688
<i>PDF1.2</i>	vt_ctr4	1,907	1,902	19,688
<i>PDF1.2</i>	35S:: <i>IRP1</i> 3.2.1	1,897	1,902	18,241
<i>PDF1.2</i>	35S:: <i>IRP1</i> 3.2.2	1,922	1,902	17,685
<i>PDF1.2</i>	35S:: <i>IRP1</i> 3.2.3	1,882	1,902	17,907
<i>PDF1.2</i>	35S:: <i>IRP1</i> 3.2.4	1,912	1,902	17,942
<i>PDF1.2</i>	35S:: <i>IRP9</i> 6.4.1	1,923	1,902	18,531
<i>PDF1.2</i>	35S:: <i>IRP9</i> 6.4.2	1,943	1,902	18,205
<i>PDF1.2</i>	35S:: <i>IRP9</i> 6.4.3	1,862	1,902	18,453
<i>PDF1.2</i>	35S:: <i>IRP9</i> 6.4.4	1,886	1,902	19,027
<i>PDF1.2</i>	NTC	1,938	0,000	39,258
<i>PR1</i>	vt_ctr1	1,816	1,818	23,473
<i>PR1</i>	vt_ctr2	1,834	1,818	22,519
<i>PR1</i>	vt_ctr3	1,817	1,818	21,555
<i>PR1</i>	vt_ctr4	1,824	1,818	22,073
<i>PR1</i>	35S:: <i>IRP1</i> 3.2.1	1,811	1,818	23,278
<i>PR1</i>	35S:: <i>IRP1</i> 3.2.2	1,802	1,818	21,365
<i>PR1</i>	35S:: <i>IRP1</i> 3.2.3	1,831	1,818	21,783
<i>PR1</i>	35S:: <i>IRP1</i> 3.2.4	1,809	1,818	21,710
<i>PR1</i>	35S:: <i>IRP9</i> 6.4.1	1,804	1,818	21,624
<i>PR1</i>	35S:: <i>IRP9</i> 6.4.2	1,833	1,818	21,224
<i>PR1</i>	35S:: <i>IRP9</i> 6.4.3	1,802	1,818	22,121
<i>PR1</i>	35S:: <i>IRP9</i> 6.4.4	1,828	1,818	22,509
<i>PR1</i>	NTC	1,000	0,000	0,000
<i>CYP71A13</i>	vt_ctr1	1,903	1,888	27,779
<i>CYP71A13</i>	vt_ctr2	1,879	1,888	27,396
<i>CYP71A13</i>	vt_ctr3	1,898	1,888	27,274
<i>CYP71A13</i>	vt_ctr4	1,883	1,888	26,665
<i>CYP71A13</i>	35S:: <i>IRP1</i> 3.2.1	1,917	1,888	24,706
<i>CYP71A13</i>	35S:: <i>IRP1</i> 3.2.2	1,888	1,888	27,006
<i>CYP71A13</i>	35S:: <i>IRP1</i> 3.2.3	1,881	1,888	28,194
<i>CYP71A13</i>	35S:: <i>IRP1</i> 3.2.4	1,866	1,888	25,936
<i>CYP71A13</i>	35S:: <i>IRP9</i> 6.4.1	1,873	1,888	25,434
<i>CYP71A13</i>	35S:: <i>IRP9</i> 6.4.2	1,878	1,888	27,227
<i>CYP71A13</i>	35S:: <i>IRP9</i> 6.4.3	1,894	1,888	27,302
<i>CYP71A13</i>	35S:: <i>IRP9</i> 6.4.4	1,901	1,888	26,649
<i>CYP71A13</i>	NTC	1,000	0,000	0,000
<i>CHITINASE</i>	vt_ctr1	1,861	1,866	26,611

VEDLEGG

<i>CHITINASE</i>	vt_ctr2	1,810	1,866	25,166
<i>CHITINASE</i>	vt_ctr3	1,849	1,866	25,003
<i>CHITINASE</i>	vt_ctr4	1,884	1,866	25,220
<i>CHITINASE</i>	35S:: <i>IRP1</i> 3.2.1	1,879	1,866	24,772
<i>CHITINASE</i>	35S:: <i>IRP1</i> 3.2.2	1,895	1,866	25,326
<i>CHITINASE</i>	35S:: <i>IRP1</i> 3.2.3	1,870	1,866	24,804
<i>CHITINASE</i>	35S:: <i>IRP1</i> 3.2.4	1,866	1,866	24,549
<i>CHITINASE</i>	35S:: <i>IRP9</i> 6.4.1	1,838	1,866	24,967
<i>CHITINASE</i>	35S:: <i>IRP9</i> 6.4.2	1,865	1,866	25,725
<i>CHITINASE</i>	35S:: <i>IRP9</i> 6.4.3	1,814	1,866	25,453
<i>CHITINASE</i>	35S:: <i>IRP9</i> 6.4.4	1,851	1,866	25,517
<i>CHITINASE</i>	NTC	1,000	0,000	0,000
<i>PAD3</i>	vt_ctr1	1,829	1,837	25,951
<i>PAD3</i>	vt_ctr2	1,833	1,837	24,921
<i>PAD3</i>	vt_ctr3	1,853	1,837	25,739
<i>PAD3</i>	vt_ctr4	1,828	1,837	24,916
<i>PAD3</i>	35S:: <i>IRP1</i> 3.2.1	1,842	1,837	23,707
<i>PAD3</i>	35S:: <i>IRP1</i> 3.2.2	1,856	1,837	24,499
<i>PAD3</i>	35S:: <i>IRP1</i> 3.2.3	1,832	1,837	25,092
<i>PAD3</i>	35S:: <i>IRP1</i> 3.2.4	1,832	1,837	23,981
<i>PAD3</i>	35S:: <i>IRP9</i> 6.4.1	1,830	1,837	24,145
<i>PAD3</i>	35S:: <i>IRP9</i> 6.4.2	1,834	1,837	25,115
<i>PAD3</i>	35S:: <i>IRP9</i> 6.4.3	1,837	1,837	24,287
<i>PAD3</i>	35S:: <i>IRP9</i> 6.4.4	1,840	1,837	24,676
<i>PAD3</i>	NTC	1,000	0,000	0,000
<i>ACS4</i>	vt_ctr1	1,867	1,849	31,502
<i>ACS4</i>	vt_ctr2	1,848	1,849	30,439
<i>ACS4</i>	vt_ctr3	1,833	1,849	30,767
<i>ACS4</i>	vt_ctr4	1,829	1,849	30,224
<i>ACS4</i>	35S:: <i>IRP1</i> 3.2.1	1,854	1,849	29,216
<i>ACS4</i>	35S:: <i>IRP1</i> 3.2.2	1,847	1,849	32,453
<i>ACS4</i>	35S:: <i>IRP1</i> 3.2.3	1,832	1,849	29,876
<i>ACS4</i>	35S:: <i>IRP1</i> 3.2.4	1,855	1,849	30,338
<i>ACS4</i>	35S:: <i>IRP9</i> 6.4.1	1,852	1,849	30,938
<i>ACS4</i>	35S:: <i>IRP9</i> 6.4.2	1,870	1,849	31,235
<i>ACS4</i>	35S:: <i>IRP9</i> 6.4.3	1,830	1,849	29,962
<i>ACS4</i>	35S:: <i>IRP9</i> 6.4.4	1,868	1,849	30,494
<i>ACS4</i>	NTC	1,000	0,000	0,000
<i>MYB51</i>	vt_ctr1	1,828	1,843	27,328
<i>MYB51</i>	vt_ctr2	1,849	1,843	25,863
<i>MYB51</i>	vt_ctr3	1,827	1,843	26,653
<i>MYB51</i>	vt_ctr4	1,835	1,843	25,846

VEDLEGG

<i>MYB51</i>	35S:: <i>IRP1</i> 3.2.1	1,854	1,843	25,636
<i>MYB51</i>	35S:: <i>IRP1</i> 3.2.2	1,871	1,843	26,794
<i>MYB51</i>	35S:: <i>IRP1</i> 3.2.3	1,817	1,843	26,023
<i>MYB51</i>	35S:: <i>IRP1</i> 3.2.4	1,855	1,843	25,712
<i>MYB51</i>	35S:: <i>IRP9</i> 6.4.1	1,835	1,843	25,907
<i>MYB51</i>	35S:: <i>IRP9</i> 6.4.2	1,842	1,843	26,361
<i>MYB51</i>	35S:: <i>IRP9</i> 6.4.3	1,841	1,843	25,338
<i>MYB51</i>	35S:: <i>IRP9</i> 6.4.4	1,862	1,843	25,355
<i>MYB51</i>	NTC	1,000	0,000	0,000
<i>TIP41-like</i>	vt_ctr1	1,880	1,870	24,106
<i>TIP41-like</i>	vt_ctr2	1,852	1,870	24,169
<i>TIP41-like</i>	vt_ctr3	1,871	1,870	24,073
<i>TIP41-like</i>	vt_ctr4	1,859	1,870	24,075
<i>TIP41-like</i>	35S:: <i>IRP1</i> 3.2.1	1,858	1,870	24,337
<i>TIP41-like</i>	35S:: <i>IRP1</i> 3.2.2	1,874	1,870	24,040
<i>TIP41-like</i>	35S:: <i>IRP1</i> 3.2.3	1,905	1,870	23,509
<i>TIP41-like</i>	35S:: <i>IRP1</i> 3.2.4	1,870	1,870	23,811
<i>TIP41-like</i>	35S:: <i>IRP9</i> 6.4.1	1,875	1,870	24,081
<i>TIP41-like</i>	35S:: <i>IRP9</i> 6.4.2	1,870	1,870	24,169
<i>TIP41-like</i>	35S:: <i>IRP9</i> 6.4.3	1,865	1,870	23,929
<i>TIP41-like</i>	35S:: <i>IRP9</i> 6.4.4	1,865	1,870	23,901
<i>TIP41-like</i>	NTC	1,000	0,000	0,000

A4.4 LINREG-analyser for transkripsjonsanalyser av målgener etter UV-B stråling

Tabell A4.4.1. Transkripsjonsanalyser gjennomført for linjene villtype, *IRP1*-RNAi 7.1, *IRP1*-RNAi 11.2, *irp9* og *irp9 IRP1*-RNAi 11.2 for målgenet *IRP1* tre timer etter UV-B stråling. Tabellen viser Cq-verdier, individuell- og gjennomsnittlig primereffektivitet. Genet *TIP41-like* er benyttet som referanseggen.

Målgen	Linje	Individuell PCR effektivitet	Gjennomsnittlig PCR effektivitet	Cq-verdi
<i>IRP1</i>	vt_ctr1	1,867	1,859	25,478
<i>IRP1</i>	vt_ctr2	1,868	1,859	28,527
<i>IRP1</i>	vt_ctr3	1,873	1,859	28,630
<i>IRP1</i>	vt_UV1	1,859	1,859	23,375
<i>IRP1</i>	vt_UV2	1,853	1,859	23,240
<i>IRP1</i>	vt_UV3	1,858	1,859	23,120
<i>IRP1</i>	<i>IRP1</i> -RNAi7.1_ctr1	1,856	1,859	33,912
<i>IRP1</i>	<i>IRP1</i> -RNAi7.1_ctr2	1,881	1,859	35,443
<i>IRP1</i>	<i>IRP1</i> -RNAi7.1_ctr3	1,858	1,859	33,121
<i>IRP1</i>	<i>IRP1</i> -RNAi7.1_UV1	1,866	1,859	25,724

VEDLEGG

<i>IRP1</i>	<i>IRP1</i> -RNAi7.1_UV2	1,832	1,859	25,871
<i>IRP1</i>	<i>IRP1</i> -RNAi7.1_UV3	1,854	1,859	26,188
<i>IRP1</i>	<i>IRP1</i> -RNAi11.2_ctr1	1,859	1,859	33,142
<i>IRP1</i>	<i>IRP1</i> -RNAi11.2_ctr2	1,874	1,859	34,489
<i>IRP1</i>	<i>IRP1</i> -RNAi11.2_ctr3	1,853	1,859	33,029
<i>IRP1</i>	<i>IRP1</i> -RNAi11.2_UV1	1,874	1,859	24,726
<i>IRP1</i>	<i>IRP1</i> -RNAi11.2_UV2	1,873	1,859	25,403
<i>IRP1</i>	<i>IRP1</i> -RNAi11.2_UV3	1,870	1,859	25,118
<i>IRP1</i>	<i>irp9</i> _ctr1	1,880	1,859	31,323
<i>IRP1</i>	<i>irp9</i> _ctr2	1,860	1,859	33,131
<i>IRP1</i>	<i>irp9</i> _ctr3	1,869	1,859	33,151
<i>IRP1</i>	<i>irp9</i> _UV1	1,854	1,859	23,458
<i>IRP1</i>	<i>irp9</i> _UV2	1,000	1,859	23,010
<i>IRP1</i>	<i>irp9</i> _UV3	1,827	1,859	22,562
<i>IRP1</i>	<i>irp9</i> <i>IRP1</i> -RNAi 11.2_ctr1	1,832	1,859	32,165
<i>IRP1</i>	<i>irp9</i> <i>IRP1</i> -RNAi 11.2_ctr2	1,829	1,859	31,337
<i>IRP1</i>	<i>irp9</i> <i>IRP1</i> -RNAi 11.2_ctr1	1,830	1,859	32,159
<i>IRP1</i>	<i>irp9</i> <i>IRP1</i> -RNAi 11.2_UV1	1,863	1,859	24,310
<i>IRP1</i>	<i>irp9</i> <i>IRP1</i> -RNAi 11.2_UV2	1,856	1,859	24,874
<i>IRP1</i>	<i>irp9</i> <i>IRP1</i> -RNAi 11.2_UV1	1,852	1,859	24,212
<i>IRP1</i>	NTC	1,881	0,000	40,360

Tabell A4.4.2. Transkripsjonsanalyser gjennomført for linjene villtype, *IRP1*-RNAi 7.1, *IRP1*-RNAi 11.2, *irp9* og *irp9* *IRP1*-RNAi 11.2 for målgenet *IRP9* tre timer etter UV-B stråling. Genet *TIP41*-like er benyttet som referansegen.

Målgen	Linje	Individuell PCR effektivitet	Gjennomsnittlig PCR effektivitet	Cq-verdi
<i>IRP9</i>	vt_ctr1	1,850	1,852	32,194
<i>IRP9</i>	vt_ctr2	1,862	1,852	31,741
<i>IRP9</i>	vt_ctr3	1,833	1,852	30,883
<i>IRP9</i>	vt_UV1	1,856	1,852	23,629
<i>IRP9</i>	vt_UV2	1,830	1,852	22,850
<i>IRP9</i>	vt_UV3	1,854	1,852	22,326
<i>IRP9</i>	<i>IRP1</i> -RNAi7.1_ctr1	1,845	1,852	31,594
<i>IRP9</i>	<i>IRP1</i> -RNAi7.1_ctr2	1,856	1,852	34,121
<i>IRP9</i>	<i>IRP1</i> -RNAi7.1_ctr3	1,848	1,852	31,445
<i>IRP9</i>	<i>IRP1</i> -RNAi7.1_UV1	1,833	1,852	23,254
<i>IRP9</i>	<i>IRP1</i> -RNAi7.1_UV2	1,837	1,852	24,072
<i>IRP9</i>	<i>IRP1</i> -RNAi7.1_UV3	1,844	1,852	24,067

VEDLEGG

<i>IRP9</i>	<i>IRP1</i> -RNAi11.2_ctr1	1,852	1,852	30,174
<i>IRP9</i>	<i>IRP1</i> -RNAi11.2_ctr2	1,845	1,852	32,915
<i>IRP9</i>	<i>IRP1</i> -RNAi11.2_ctr3	1,847	1,852	31,662
<i>IRP9</i>	<i>IRP1</i> -RNAi11.2_UV1	1,858	1,852	21,426
<i>IRP9</i>	<i>IRP1</i> -RNAi11.2_UV2	1,853	1,852	22,292
<i>IRP9</i>	<i>IRP1</i> -RNAi11.2_UV3	1,854	1,852	21,309
<i>IRP9</i>	<i>irp9</i> _ctr1	1,000	1,852	0,000
<i>IRP9</i>	<i>irp9</i> _ctr2	1,000	1,852	0,000
<i>IRP9</i>	<i>irp9</i> _ctr3	1,000	1,852	0,000
<i>IRP9</i>	<i>irp9</i> _UV1	1,851	1,852	38,511
<i>IRP9</i>	<i>irp9</i> _UV2	1,000	1,852	0,000
<i>IRP9</i>	<i>irp9</i> _UV3	1,000	1,852	0,000
<i>IRP9</i>	<i>irp9</i> <i>IRP1</i> -RNAi 11.2_ctr1	1,000	1,852	0,000
<i>IRP9</i>	<i>irp9</i> <i>IRP1</i> -RNAi 11.2_ctr2	1,000	1,852	0,000
<i>IRP9</i>	<i>irp9</i> <i>IRP1</i> -RNAi 11.2_ctr1	1,850	1,852	39,739
<i>IRP9</i>	<i>irp9</i> <i>IRP1</i> -RNAi 11.2_UV1	1,868	1,852	34,480
<i>IRP9</i>	<i>irp9</i> <i>IRP1</i> -RNAi 11.2_UV2	1,887	1,852	35,607
<i>IRP9</i>	<i>irp9</i> <i>IRP1</i> -RNAi 11.2_UV1	1,868	1,852	35,125
<i>IRP9</i>	NTC	1,000	0,000	0,000

Tabell A4.4.3. Transkripsjonsanalyser gjennomført for linjene villtype, *IRP1*-RNAi 7.1, *IRP1*-RNAi 11.2, *irp9* og *irp9* *IRP1*-RNAi 11.2 for målgenet *IRP10* tre timer etter UV-B stråling. Genet *TIP41*-like er benyttet som referansegene.

Målgen	Linje	Individuell PCR effektivitet	Gjennomsnittlig PCR effektivitet	Cq-verdi
<i>IRP10</i>	vt_ctr1	1,802	1,768	33,532
<i>IRP10</i>	vt_ctr2	1,787	1,768	32,449
<i>IRP10</i>	vt_ctr3	1,790	1,768	33,223
<i>IRP10</i>	vt_UV1	1,790	1,768	28,520
<i>IRP10</i>	vt_UV2	1,763	1,768	27,000
<i>IRP10</i>	vt_UV3	1,759	1,768	26,996
<i>IRP10</i>	<i>IRP1</i> -RNAi7.1_ctr1	1,757	1,768	34,758
<i>IRP10</i>	<i>IRP1</i> -RNAi7.1_ctr2	1,794	1,768	35,288
<i>IRP10</i>	<i>IRP1</i> -RNAi7.1_ctr3	1,762	1,768	33,909
<i>IRP10</i>	<i>IRP1</i> -RNAi7.1_UV1	1,761	1,768	27,299
<i>IRP10</i>	<i>IRP1</i> -RNAi7.1_UV2	1,785	1,768	28,623
<i>IRP10</i>	<i>IRP1</i> -RNAi7.1_UV3	1,750	1,768	28,798
<i>IRP10</i>	<i>IRP1</i> -RNAi11.2_ctr1	1,782	1,768	33,170
<i>IRP10</i>	<i>IRP1</i> -RNAi11.2_ctr2	1,766	1,768	34,801
<i>IRP10</i>	<i>IRP1</i> -RNAi11.2_ctr3	1,766	1,768	33,829
<i>IRP10</i>	<i>IRP1</i> -RNAi11.2_UV1	1,762	1,768	25,108

VEDLEGG

<i>IRP10</i>	<i>IRP1</i> -RNAi11.2_UV2	1,763	1,768	26,083
<i>IRP10</i>	<i>IRP1</i> -RNAi11.2_UV3	1,786	1,768	25,288
<i>IRP10</i>	<i>irp9</i> _ctr1	1,786	1,786	33,622
<i>IRP10</i>	<i>irp9</i> _ctr2	1,772	1,768	35,777
<i>IRP10</i>	<i>irp9</i> _ctr3	1,780	1,768	36,022
<i>IRP10</i>	<i>irp9</i> _UV1	1,754	1,768	28,289
<i>IRP10</i>	<i>irp9</i> _UV2	1,769	1,768	26,100
<i>IRP10</i>	<i>irp9</i> _UV3	1,765	1,768	26,225
<i>IRP10</i>	<i>irp9</i> <i>IRP1</i> -RNAi 11.2_ctr1	1,757	1,768	33,862
<i>IRP10</i>	<i>irp9</i> <i>IRP1</i> -RNAi 11.2_ctr2	1,762	1,768	33,912
<i>IRP10</i>	<i>irp9</i> <i>IRP1</i> -RNAi 11.2_ctr1	1,742	1,768	34,945
<i>IRP10</i>	<i>irp9</i> <i>IRP1</i> -RNAi 11.2_UV1	1,763	1,768	25,382
<i>IRP10</i>	<i>irp9</i> <i>IRP1</i> -RNAi 11.2_UV2	1,761	1,768	25,112
<i>IRP10</i>	<i>irp9</i> <i>IRP1</i> -RNAi 11.2_UV1	1,763	1,768	25,173
<i>IRP10</i>	NTC	1,000	0,000	0,000

Tabell A4.4.4. Transkripsjonsanalyser gjennomført for linjene villtype, *IRP1*-RNAi 7.1, *IRP1*-RNAi 11.2, *irp9* og *irp9* *IRP1*-RNAi 11.2 for målgenet *HY5* tre timer etter UV-B stråling. Genet *TIP41*-like er benyttet som referansegene.

Målgen	Linje	Individuell PCR effektivitet	Gjennomsnittlig PCR Effektivitet	Cq-verdi
<i>HY5</i>	vt_ctr1	1,851	1,856	26,143
<i>HY5</i>	vt_ctr2	1,863	1,856	25,100
<i>HY5</i>	vt_ctr3	1,851	1,856	24,928
<i>HY5</i>	vt_UV1	1,847	1,856	23,050
<i>HY5</i>	vt_UV2	1,867	1,856	23,353
<i>HY5</i>	vt_UV3	1,862	1,856	23,688
<i>HY5</i>	<i>IRP1</i> -RNAi7.1_ctr1	1,858	1,856	23,101
<i>HY5</i>	<i>IRP1</i> -RNAi7.1_ctr2	1,848	1,856	26,228
<i>HY5</i>	<i>IRP1</i> -RNAi7.1_ctr3	1,870	1,856	26,497
<i>HY5</i>	<i>IRP1</i> -RNAi7.1_UV1	1,866	1,856	25,481
<i>HY5</i>	<i>IRP1</i> -RNAi7.1_UV2	1,844	1,856	23,142
<i>HY5</i>	<i>IRP1</i> -RNAi7.1_UV3	1,876	1,856	23,672
<i>HY5</i>	<i>IRP1</i> -RNAi11.2_ctr1	1,834	1,856	26,014
<i>HY5</i>	<i>IRP1</i> -RNAi11.2_ctr2	1,862	1,856	26,125
<i>HY5</i>	<i>IRP1</i> -RNAi11.2_ctr3	1,865	1,856	25,110
<i>HY5</i>	<i>IRP1</i> -RNAi11.2_UV1	1,836	1,856	23,016
<i>HY5</i>	<i>IRP1</i> -RNAi11.2_UV2	1,826	1,856	22,903
<i>HY5</i>	<i>IRP1</i> -RNAi11.2_UV3	1,867	1,856	23,287
<i>HY5</i>	<i>irp9</i> _ctr1	1,867	1,856	26,451
<i>HY5</i>	<i>irp9</i> _ctr2	1,863	1,856	26,347
<i>HY5</i>	<i>irp9</i> _ctr3	1,776	1,856	24,507
<i>HY5</i>	<i>irp9</i> _UV1	1,871	1,856	25,247

VEDLEGG

<i>HY5</i>	<i>irp9_UV2</i>	1,841	1,856	22,878
<i>HY5</i>	<i>irp9_UV3</i>	1,856	1,856	23,198
<i>HY5</i>	<i>irp9 IRP1-RNAi 11.2_ctr1</i>	1,886	1,856	24,686
<i>HY5</i>	<i>irp9 IRP1-RNAi 11.2_ctr2</i>	1,857	1,856	24,629
<i>HY5</i>	<i>irp9 IRP1-RNAi 11.2_ctr1</i>	1,833	1,856	24,901
<i>HY5</i>	<i>irp9 IRP1-RNAi 11.2_UV1</i>	1,861	1,856	25,311
<i>HY5</i>	<i>irp9 IRP1-RNAi 11.2_UV2</i>	1,861	1,856	24,827
<i>HY5</i>	<i>irp9 IRP1-RNAi 11.2_UV1</i>	1,878	1,856	24,510
<i>HY5</i>	NTC	1,957	0,000	42,763

Tabell A4.4.5. Transkripsjonsanalyser gjennomført for linjene villtype, *IRP1*-RNAi 7.1, *IRP1*-RNAi 11.2, *irp9* og *irp9 IRP1*-RNAi 11.2 for referansegnet *TIP41*-like tre timer etter UV-B stråling.

Målgen	Linje	Individuell PCR effektivitet	Gjennomsnittlig PCR effektivitet	Cq-verdi
<i>TIP41</i> -like	vt_ctr1	1,888	1,893	24,193
<i>TIP41</i> -like	vt_ctr2	1,898	1,893	24,283
<i>TIP41</i> -like	vt_ctr3	1,895	1,893	24,157
<i>TIP41</i> -like	vt_UV1	1,885	1,893	24,862
<i>TIP41</i> -like	vt_UV2	1,884	1,893	24,373
<i>TIP41</i> -like	vt_UV3	1,892	1,893	24,348
<i>TIP41</i> -like	<i>IRP1</i> -RNAi7.1_ctr1	1,880	1,893	24,274
<i>TIP41</i> -like	<i>IRP1</i> -RNAi7.1_ctr2	1,898	1,893	24,321
<i>TIP41</i> -like	<i>IRP1</i> -RNAi7.1_ctr3	1,885	1,893	24,178
<i>TIP41</i> -like	<i>IRP1</i> -RNAi7.1_UV1	1,908	1,893	24,723
<i>TIP41</i> -like	<i>IRP1</i> -RNAi7.1_UV2	1,896	1,893	24,559
<i>TIP41</i> -like	<i>IRP1</i> -RNAi7.1_UV3	1,893	1,893	24,574
<i>TIP41</i> -like	<i>IRP1</i> -RNAi11.2_ctr1	1,892	1,893	24,466
<i>TIP41</i> -like	<i>IRP1</i> -RNAi11.2_ctr2	1,905	1,893	23,916
<i>TIP41</i> -like	<i>IRP1</i> -RNAi11.2_ctr3	1,884	1,893	24,059
<i>TIP41</i> -like	<i>IRP1</i> -RNAi11.2_UV1	1,893	1,893	24,693
<i>TIP41</i> -like	<i>IRP1</i> -RNAi11.2_UV2	1,903	1,893	24,921
<i>TIP41</i> -like	<i>IRP1</i> -RNAi11.2_UV3	1,893	1,893	25,016
<i>TIP41</i> -like	<i>irp9_ctr1</i>	1,885	1,893	24,693
<i>TIP41</i> -like	<i>irp9_ctr2</i>	1,898	1,893	24,369
<i>TIP41</i> -like	<i>irp9_ctr3</i>	1,910	1,893	24,435
<i>TIP41</i> -like	<i>irp9_UV1</i>	1,888	1,893	25,047
<i>TIP41</i> -like	<i>irp9_UV2</i>	1,889	1,893	24,797
<i>TIP41</i> -like	<i>irp9_UV3</i>	1,875	1,893	25,048
<i>TIP41</i> -like	<i>irp9 IRP1</i> -RNAi 11.2_ctr1	1,889	1,893	24,261
<i>TIP41</i> -like	<i>irp9 IRP1</i> -RNAi	1,886	1,893	24,437

VEDLEGG

	11.2_ctr2			
<i>TIP41</i> -like	<i>irp9 IRP1</i> -RNAi 11.2_ctr1	1,898	1,893	24,723
<i>TIP41</i> -like	<i>irp9 IRP1</i> -RNAi 11.2_UV1	1,896	1,893	25,065
<i>TIP41</i> -like	<i>irp9 IRP1</i> -RNAi 11.2_UV2	1,891	1,893	24,531
<i>TIP41</i> -like	<i>irp9 IRP1</i> -RNAi 11.2_UV1	1,898	1,893	24,604
<i>TIP41</i> -like	NTC	1,000	0,000	0,000

A5 RESULTATER FRA REST2009-ANALYSER

A5.1 REST2009-analyser for dobbelmutanten *irp9 IRP1*-RNAi 11.2

Tabell A5.1.1. Resultater fra REST2009-analyser for dobbelmutanten *irp9 IRP1*-RNAi 11.2

Linje	Målgen	Relativt genuttrykk	Signifikant (p≤0,05)	Resultat
<i>irp9 IRP1</i> -RNAi 11.2	IRP1	0,114	Ja	NED
<i>irp9 IRP1</i> -RNAi 11.2	IRP9	0,000	Ja	NED

A5.2 REST2009-analyser for verifisering av 35S-promoter i transformerte linjer

Tabell A5.2.1. Resultater fra REST2009-analyser for linjer transformert med konstruksjonene 35S::*IRP1*, 35S::*IRP9* og 35S::*IRP10*

Linje	Målgen	Relativt genuttrykk	95% konfidensintervall	Signifikant (p≤0,05)	Resultat
35S:: <i>IRP1</i> 1.3	IRP1	47 971	26177-59603	Ja	OPP
35S:: <i>IRP1</i> 3.1	IRP1	22325	7311-55167	Ja	OPP
35S:: <i>IRP9</i> 6.4	IRP9	12057	4933-40597	Ja	OPP
35S:: <i>IRP9</i> 7.1	IRP9	16901	6561-49242	Ja	OPP
35S:: <i>IRP1</i> 6.3	IRP1	3,207	1,479-13,20	Nei	
35S:: <i>IRP9</i> 8.1	IRP1	1,554	0,662-3,262	Nei	
35S:: <i>IRP10</i> 7.3	IRP1	1,406	0,519-4,361	Nei	
35S:: <i>IRP10</i> 11.1	IRP1	0,163	0,049-0,655	Ja	NED
35S:: <i>IRP10</i> 12.4	IRP1	0,217	0,062-0,615	Ja	NED
35S:: <i>IRP10</i> 17.5	IRP1	0,168	0,038-0,774	Ja	NED
35S:: <i>IRP10</i> 18.2	IRP1	0,259	0,019-4,119	Nei	NED
35S:: <i>IRP1</i> 1.3	IRP1	47 971	26177-59603	Ja	OPP

A5.3 REST2009-analyser for transkripsjonsanalyser av målgener i immunforsvaret

Tabell A5.3.1. Resultater fra REST2009-analyser for målgener i immunforsvaret utført på linjen 35S::IRP1 1.3.1

Målgen	Relativt genuttrykk	95% konfidensintervall	Signifikant (p≤0,05)	Resultat
<i>JAZ7</i>	0,112	0,058-0,210	Ja	NED
<i>JAZ8</i>	0,242	0,113-0,531	Ja	NED
<i>JAZ10</i>	0,323	0,130-0,725	Ja	NED
<i>PDF1.2</i>	1,020	0,601-1,431	Nei	
<i>PR1</i>	0,871	0,536-1,221	Nei	
<i>ACS4</i>	0,658	0,213-2,373	Nei	
<i>MYB51</i>	0,818	0,504-1,418	Nei	
<i>CYP71A13</i>	0,430	0,136-2,501	Nei	
<i>CYP83B1</i>	0,841	0,675-1,124	Nei	
<i>PAD3</i>	1,024	0,576-1,782	Nei	
<i>CHITINASE</i>	0,624	0,352-1,226	Nei	

Tabell A5.3.2. Resultater fra REST2009-analyser målgener i immunforsvaret utført på linjen 35S::IRP1 3.2.1

Målgen	Relativt genuttrykk	95% konfidensintervall	Signifikant (p≤0,05)	Resultat
<i>JAZ7</i>	0,340	0,141-0,660	Ja	NED
<i>JAZ8</i>	0,324	0,204-0,456	Ja	NED
<i>JAZ10</i>	0,396	0,136-0,993	Ja	NED
<i>PDF1.2</i>	2,277	1,215-4,733	Ja	OPP
<i>PR1</i>	0,948	,386-1,753	Nei	
<i>ACS4</i>	0,901	0,245-2,300	Nei	
<i>MYB51</i>	1,127	0,532-2,869	Nei	
<i>CYP71A13</i>	1,291	0,326-5,106	Nei	
<i>PAD3</i>	1,458	0,741-2,994	Nei	
<i>CHITINASE</i>	1,118	0,886-1,334	Nei	

Tabell A5.3.3. Resultater fra REST2009-analyser for målgener i immunforsvaret utført på linjen 35S::IRP9 6.4.1

Målgen	Relativt genuttrykk	95% konfidensintervall	Signifikant (p≤0,05)	Resultat
<i>JAZ7</i>	0,281	0,093-0,680	Ja	NED
<i>JAZ8</i>	0,369	0,229-0,541	Ja	NED
<i>JAZ10</i>	0,397	0,129-1,031	Ja	NED
<i>PDF1.2</i>	1,633	0,756-3,563	Nei	

VEDLEGG

<i>PR1</i>	1,351	0,804-3,441	Nei	
<i>ACS4</i>	1,032	0,782-1,277	Nei	
<i>MYB51</i>	1,438	0,751-2,991	Nei	
<i>CYP71A13</i>	1,463	0,675-3,901	Nei	
<i>PAD3</i>	1,622	1,094-2,757	Ja	OPP
<i>CHITINASE</i>	1,027	0,701-1,573	Nei	

Tabell A5.3.4. Resultater fra REST2009-analyser for målgener i immunforsvaret utført på linjen 35S::*IRP9* 7.1.1

Målgen	Relativt genuttrykk	95% konfidens-intervall	Signifikant (p≤0,05)	Resultat
<i>JAZ7</i>	0,546	0,239-1,045	Ja	NED
<i>JAZ8</i>	0,784	0,529-1,002	Ja	NED
<i>JAZ10</i>	0,711	0,187-1,535	Nei	
<i>PDF1.2</i>	0,486	0,267-0,808	Ja	NED
<i>PR1</i>	1,094	0,504-2,200	Nei	
<i>ACS4</i>	0,941	0,120-4,757	Nei	
<i>MYB51</i>	1,093	0,334-1,809	Nei	
<i>CYP71A13</i>	1,300	0,876-2,222	Nei	
<i>CYP83B1</i>	0,797	0,619-1,243	Nei	
<i>PAD3</i>	1,366	0,880-2,042	Nei	
<i>CHITINASE</i>	0,805	0,479-1,575	Nei	

A6 RESULTATER FRA qBASE^{PLUS}-ANALYSER

Tabell A6.1. Resultater fra transkripsjonsanalyser av målgenene *IRP1*, *IRP9*, *IRP10* og *HY5* tre timer etter UV-B stråling. Resultatene er beregnet med programvaren qBASE^{PLUS} og viser gjennomsnittlig genuttrykk relativt til villtype kontroll, som er gitt verdien 1,000.

Målgen og linje	Kontroll			UV-B behandlet		
	Relativt uttrykk	95% konfidensintervall		Relativt uttrykk	95% konfidensintervall	
Målgen: <i>IRP1</i>						
Villtype	1,000	0,459	2,177	222,4	148,2	519,0
<i>IRP1</i> -RNAi 7.1	0,186	0,034	1,000	38,50	23,92	62,00
<i>IRP1</i> -RNAi 11.2	0,252	0,052	1,200	76,70	52,90	111,0
<i>irp9</i>	0,593	0,090	3,900	309,1	9,10	10534
<i>irp9 IRP1</i> -RNAi 11.2	0,872	0,401	1,900	102,6	42,90	245,5
Målgen: <i>IRP9</i>						
Villtype	1,000	0,563	1,770	3793	2381	6041
<i>IRP1</i> -RNAi 7.1	4,200	0,461	38,50	1056	445,0	2506
<i>IRP1</i> -RNAi 11.2	6,400	0,506	82,00	4605	2004	10578
<i>irp9</i>	0,000	0,000	0,000	0,160	0,000	0,00
<i>irp9 IRP1</i> -RNAi 11.2	0,061	0,000	0,000	1,090	0,300	4,05
Målgen: <i>IRP10</i>						
Villtype	1,000	0,416	2,406	58,08	7,53	448,3
<i>IRP1</i> -RNAi 7.1	0,418	0,175	0,997	20,31	5,53	74,65
<i>IRP1</i> -RNAi 11.2	0,586	0,119	2,878	114,6	58,37	225,0
<i>irp9</i>	0,369	0,044	3,109	55,24	10,87	281,0
<i>irp9 IRP1</i> -RNAi 11.2	0,607	0,356	1,030	122,0	94,00	158,0
Målgen: <i>HY5</i>						
Villtype	1,000	0,707	1,410	3,527	1,829	6,802
<i>IRP1</i> -RNAi 7.1	0,504	0,388	0,655	3,985	2,169	7,320
<i>IRP1</i> -RNAi 11.2	0,713	0,506	1,000	5,125	4,450	5,900
<i>irp9</i>	0,564	0,451	0,707	5,744	0,451	9,058
<i>irp9 IRP1</i> -RNAi 11.2	1,293	1,105	1,514	1,874	1,560	2,251

VEDLEGG

Tabell A6.2. Resultater fra transkripsjonsanalyser av målgenene *IRP1*, *IRP9*, *IRP10* og *HY5* tre timer etter UV-B stråling. Resultatene er enveis ANOVA-analyser med Tukey HSD post-hoc test, utført med programvaren qBASE^{PLUS}. I tabellen inngår resultatet fra testene for de individuelle linjene relativt til villtype. 95% konfidensintervall og signifikans av forskjellen. Analysen ble utført på log10-transformerte data.

Målgen og behandling		Linje	Uttrykk relativt til villtype	95% konfidensintervall		Signifikant (p≤0,05)
<i>IRP1</i>	kontroll	<i>IRP1</i> -RNAi 7.1	0,186	0,049	0,7	Ja
<i>IRP1</i>	UV-B	<i>IRP1</i> -RNAi 7.1	0,139	0,037	0,523	Ja
<i>IRP1</i>	kontroll	<i>IRP1</i> -RNAi 11.2	0,252	0,067	0,949	Ja
<i>IRP1</i>	UV-B	<i>IRP1</i> -RNAi 11.2	0,276	0,073	1,041	Nei
<i>IRP1</i>	kontroll	<i>irp9</i>	0,593	0,158	2,234	Nei
<i>IRP1</i>	UV-B	<i>irp9</i>	1,114	0,204	3,953	Nei
<i>IRP1</i>	kontroll	<i>irp9 IRP1</i> -RNAi 11.2	0,872	0,232	3,285	Nei
<i>IRP1</i>	UV-B	<i>irp9 IRP1</i> -RNAi 11.2	0,370	0,718	10,182	Nei
<i>IRP9</i>	kontroll	<i>IRP1</i> -RNAi 7.1	4,215	0,703	25,261	Nei
<i>IRP9</i>	UV-B	<i>IRP1</i> -RNAi 7.1	0,278	0,046	1,669	Nei
<i>IRP9</i>	kontroll	<i>IRP1</i> -RNAi 11.2	6,444	1,075	38,617	Ja
<i>IRP9</i>	UV-B	<i>IRP1</i> -RNAi 11.2	1,214	0,203	7,275	Nei
<i>IRP9</i>	kontroll	<i>irp9</i>	NaN	NaN	NaN	Ja
<i>IRP9</i>	UV-B	<i>irp9</i>	0,000	1 881	297 969	Ja
<i>IRP9</i>	kontroll	<i>irp9 IRP1</i> -RNAi 11.2	0,061	0,005	0,769	Ja
<i>IRP9</i>	UV-B	<i>irp9 IRP1</i> -RNAi 11.2	0,000	579	20 813	Ja
<i>IRP10</i>	kontroll	<i>IRP1</i> -RNAi 7.1	0,418	0,088	1,984	Nei
<i>IRP10</i>	UV-B	<i>IRP1</i> -RNAi 7.1	0,350	0,074	1,661	Nei
<i>IRP10</i>	kontroll	<i>IRP1</i> -RNAi 11.2	0,586	0,123	2,785	Nei
<i>IRP10</i>	UV-B	<i>IRP1</i> -RNAi 11.2	1,973	0,415	9,371	Nei
<i>IRP10</i>	kontroll	<i>irp9</i>	0,369	0,078	1,752	Nei
<i>IRP10</i>	UV-B	<i>irp9</i>	0,951	0,221	4,993	Nei
<i>IRP10</i>	kontroll	<i>irp9 IRP1</i> -RNAi 11.2	0,607	0,128	2,881	Nei
<i>IRP10</i>	UV-B	<i>irp9 IRP1</i> -RNAi 11.2	2,101	0,100	2,261	Nei
<i>HY5</i>	kontroll	<i>IRP1</i> -RNAi7.1	0,504	0,324	0,785	Ja
<i>HY5</i>	UV-B	<i>IRP1</i> -RNAi 7.1	1,130	0,726	1,758	Nei
<i>HY5</i>	kontroll	<i>IRP1</i> -RNAi 11.2	0,713	0,458	1,110	Nei
<i>HY5</i>	UV-B	<i>IRP1</i> -RNAi 11.2	1,453	0,934	2,262	Nei

VEDLEGG

<i>HY5</i>	kontroll	<i>irp9</i>	0,564	0,363	0,878	Ja
<i>HY5</i>	UV-B	<i>irp9</i>	1,629	0,395	0,955	Ja
<i>HY5</i>	kontroll	<i>irp9 IRP1-RNAi</i> 11.2	1,293	0,831	2,012	Nei
<i>HY5</i>	UV-B	<i>irp9 IRP1-RNAi</i> 11.2	0,531	0,726	1,758	Ja

A7 RESULTATER FRA FORSØK MED *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000

Tabell A.7.1. Undersøkelse av bakteriell vekst i villtype, *IRP1*-RNAi 7.1, *IRP1*-RNAi 11.2, 35S::*IRP1* 1.3.3 og 35S::*IRP1* 3.2.1 linjer. Syv dager gamle spirer ble inokulert med *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. Tre påfølgende dager ble bakterieveksten målt ved å telle bakteriedannende kolonier. For hver linje er det benyttet fire biologiske paralleller, og hver parallell er gjennomsnittet av tre spirer. Tabellen viser Log10-transformerte verdiene for de fire parallellene (r1-r4), μ betegner gjennomsnittet og SD er standardavviket.

Dag 1

	Villtype	<i>IRP1</i> -RNAi 7.1	<i>IRP1</i> -RNAi 11.2	35S:: <i>IRP1</i> 1.3.3	35S:: <i>IRP1</i> 3.2.1
r1	4,76	4,32	4,64	4,66	4,58
r2	4,77	4,07	4,72	4,45	4,97
r3	4,61	4,37	4,51	4,40	5,06
r4	4,75	4,29	4,19	3,90	4,61
μ	4,72	4,27	4,55	4,42	4,85
SD	0,08	0,13	0,23	0,38	0,24

Dag 2

	Villtype	<i>IRP1</i> -RNAi 7.1	<i>IRP1</i> -RNAi 11.2	35S:: <i>IRP1</i> 1.3.3	35S:: <i>IRP1</i> 3.2.1
r1	5,58	5,96	5,34	5,84	6,20
r2	5,55	5,44	5,64	5,63	5,85
r3	5,72	5,79	5,97	5,78	5,41
r4	5,14	5,70	5,75	5,00	5,97
μ	5,54	5,76	5,73	5,66	5,94
SD	0,25	0,22	0,26	0,38	0,33

Dag 3

	Villtype	<i>IRP1</i> -RNAi 7.1	<i>IRP1</i> -RNAi 11.2	35S:: <i>IRP1</i> 1.3.3	35S:: <i>IRP1</i> 3.2.1
r1	7,06	6,61	6,74	7,35	7,26
r2	7,13	6,68	6,78	7,27	6,95
r3	6,26	6,15	6,45	7,17	7,05
r4	6,88	6,58	6,71	6,74	6,89
μ	6,94	6,54	6,68	7,18	7,07
SD	0,40	0,24	0,15	0,27	0,16

A8 RESULTATER FRA FORSØK MED FLG22-PEPTID TILSATT VEKSTMEDIET

Tabell A8.1. Undersøkelse av rotvekst til spirer vokst i kontrollmedium (1/2 MS) og i medium tilsatt Flg22-peptid, for linjer med endret funksjon av *IRP9* (ko, dobbelmutant og OE-linjer). Etter seks, elleve og femten dager ble platene fotografert. Rotlengdene ble målt med programvaren ImageJ. Gjennomsnittslengden μ ble beregnet fra n spirer. SD er standardavvik.

Dag 6	Kontroll medium			Flg22-peptid medium		
	n	μ	SD	n	μ	SD
Villtype	36	16,7	3,2	36	16,4	2,8
<i>irp9</i>	36	14,4	1,9	35	14,8	2,2
<i>irp9</i> x <i>IRP1</i> -RNAi 11.2	37	15,6	1,9	33	14,6	1,8
35S:: <i>IRP9</i> 6.4.1	36	15,4	2,3	35	14,9	1,8
35S:: <i>IRP9</i> 7.1.1	30	15,8	1,9	28	14,2	2,4

Dag 11	Kontroll medium			Flg22-peptid medium		
	n	μ	SD	n	μ	SD
Villtype	34	44,3	6,0	36	36,6	4,8
<i>irp9</i>	36	36,0	4,2	35	30,9	3,9
<i>irp9</i> x <i>IRP1</i> -RNAi 11.2	37	39,6	5,5	33	30,5	2,8
35S:: <i>IRP9</i> 6.4.1	35	37,3	5,2	35	30,2	2,9
35S:: <i>IRP9</i> 7.1.1	30	37,6	4,8	28	28,8	5,2

Dag 15	Kontroll medium			Flg22-peptid medium		
	n	μ	SD	n	μ	SD
Villtype	34	64,8	9,1	36	48,9	6,4
<i>irp9</i>	36	55,5	7,6	35	42,9	5,7
<i>irp9</i> x <i>IRP1</i> -RNAi 11.2	37	59,0	8,3	33	41,9	5,6
35S:: <i>IRP9</i> 6.4.1	36	53,5	10,4	35	43,3	4,2
35S:: <i>IRP9</i> 7.1.1	30	52,9	9,8	30	36,2	9,4

VEDLEGG

Tabell A8.2. Undersøkelse av rotvekst ved Flg22-peptid tilsatt vekstmedia, for linjer med endret funksjon av *IRP9* (ko, dobbelmutant og OE-linjer). Enveis ANOVA med post hoc testene Tukey HSD og Games-Howell ble benyttet for å teste for ulikheter mellom gruppene. Resultatene angir signifikante forskjeller fra villtype (kontroll og Flg22).

Dag 6	Kontroll medium		Flg22-peptid medium	
	Signifikant p < 0,05	95 % konfidens- intervall	Signifikant p < 0,05	95 % konfidens- intervall
<i>irp9</i>	Ja	0,52 4,09	Nei	0,16 3,09
<i>irp9</i> x <i>IRP1</i> -RNAi 11.2	Nei	-0,62 2,96	Nei	0,31 3,28
35S:: <i>IRP9</i> 6.4.1	Nei	-0,55 3,19	Nei	0,03 2,96
35S:: <i>IRP9</i> 7.1.1	Nei	-0,87 2,78	Nei	0,59 3,70

Dag 11	Kontroll medium		Flg22-peptid medium	
	Signifikant p < 0,05	95 % konfidens- intervall	Signifikant p < 0,05	95 % konfidens- intervall
<i>irp9</i>	Nei	5,04 11,89	Nei	2,45 8,28
<i>irp9</i> x <i>IRP1</i> -RNAi 11.2	Nei	1,47 8,27	Nei	3,12 8,44
35S:: <i>IRP9</i> 6.4.1	Ja	3,65 10,54	Ja	3,46 8,77
35S:: <i>IRP9</i> 7.1.1	Ja	3,21 10,39	Nei	3,92 11,06

Dag 15	Kontroll medium		Flg22-peptid medium	
	Signifikant p < 0,05	95 % konfidens- intervall	Signifikant p < 0,05	95 % konfidens- intervall
<i>irp9</i>	Nei	3,42 15,16	Nei	2,25 9,77
<i>irp9</i> x <i>IRP1</i> -RNAi 11.2	Nei	-0,01 11,66	Nei	3,18 10,81
35S:: <i>IRP9</i> 6.4.1	Ja	5,42 17,17	Nei	1,89 9,40
35S:: <i>IRP9</i> 7.1.1	Ja	5,01 17,31	Ja	4,42 12,39

Tabell A8.3. Toveis ANOVA ble benyttet for å undersøke om interaksjonen mellom villtype versus linjer med endret uttrykk av *IRP9* (*irp9*-mutant, *irp9* x *IRP1*-RNAi 11.2, 35S::*IRP9* 6.4.1 og 35S::*IRP9* 7.1.1) og effekten av Flg22-peptid tilsatt vekstmedia var signifikant. Testen ble utført for målinger av rotlengde utført etter dag femten.

Dag 15	F	Signifikant (p < 0,05)
Villtype vs. <i>irp9</i>	0,280	Nei
Villtype vs. <i>irp9</i> x <i>IRP1</i> -RNAi 11.2	2,299	Nei
Villtype vs. 35S:: <i>IRP9</i> 6.4.1	0,729	Nei
Villtype vs. 35S:: <i>IRP9</i> 7.1.1	1,087	Nei

A9 OMBREGNING FRA INNSTRÅLINGSTETTHET TIL FLUKSTETTHET

Innstrålingstetthet oppgitt med energienheten W m^{-2} kan omregnes til foton-flukstetthet som er en kvanteenhet for antall fotoner i strålingen. Flukstetthet har enheten $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$:

$$x = I \times \lambda \times (h \times c \times d)^{-1}$$

I ligningen inngår x , foton-flukstetthet; I , innstrålingstetthet ; λ , bølgelengde; h , Plancks konstant; c , lysets hastighet i vakum; d , avogadros tall.

Innstrålingstettheten I er med spektrofotometer målt til $6,1 \text{ W m}^{-2}$

$$d = \text{avogadros tall} = 6,02 \times 10^{23} \text{ kvanter mol}^{-1}$$

$$h = \text{Plancks konstant} = 6,63 \times 10^{-34} \text{ Js}$$

$$c = \text{lysets hastighet} = 3 \times 10^8 \text{ m s}^{-1}$$

$$\lambda = \text{bølgelengde UV-B stråling} = 302 \times 10^{-9} \text{ m}$$

$$x = 6,1 \text{ W m}^{-2} \times 302 \times 10^{-9} \text{ m} \times (6,63 \times 10^{-34} \text{ Js} \times 3 \times 10^8 \text{ m s}^{-1} \times 6,02 \times 10^{23} \text{ kvanter mol}^{-1})$$

$$= 1,54 \times 10^{-5} \text{ mol W J}^{-1} \text{ m}^{-2}$$

$$= 15,4 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$$

Innstrålingstetthet målt til $6,1 \text{ W m}^{-2}$ omregnet til flukstetthet er likt med $15,4 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$

