

1. Raziskovalna organizacija:

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta

2. Ime in priimek mentorja:

Jernej Jakše

3. Področje znanosti iz šifranta ARRS:

4.03 Rastlinska produkcija in predelava

4. Kontaktni e-naslov mentorja:

jerne.jakse@bf.uni-lj.si

5. Kratak opis programa usposabljanja:

VLOGA VIROIDNIH MALIH RNA NA IZRAŽANJE RASTLINSKIH GENOV

Kandidat bo opravljal delo v programski skupini P4-0077: Kmetijske rastline - genetika in sodobne tehnologije, kjer se bo vključil v tekoče raziskovalne aktivnosti. Predvidevamo vpis v enovit doktorski študijski program Biomedicina, smer Genetika.

Izhodišča:

S pomočjo NGS tehnologij smo že potrdili, da viroidne male RNA (viroid derived small RNA oz. vd-sRNA), ki v izjemno velikih količinah nastanejo pri okužbi z viroidoma HLVd ali CVd dejansko predstavljajo celoten viroidni genom. Ta kratka zaporedja (vd-sRNA), ki so dolga od 21, 22 ali 24 bp, se lahko vežejo na mRNA in sprožijo utišanje genov. Naš namen je odkriti ali se lahko na transkripte genov hmelja vežejo vd-sRNA viroidov HLVd ali HSVd. Spremembe v nivoju izražanja tarčnih genov pa lahko enostavno preverimo s tehniko reverzne transkripcije in PCR v realnem času (RT-qPCR).

Za študijo delovanja vd-sRNA potrebujemo sekvenčno informacijo o genih hmelja oz. njegov transkriptom. NGS tehnike se sedaj uporabljajo tudi za analizo transkriptomov s sekvenciranjem RNA (RNA-seq) kar je prispevalo k boljšemu razumevanju ekspresije ter regulacije genoma kot tudi vpliv patogenov na ekspresije genoma. S temi tehnologijami lahko rekonstruiramo celotni transkriptom rastline in s pokritostjo celo potrdimo prisotnost transkriptov, ki izvirajo iz alternativnega izreza intronov. Pridobljene sekvenčne informacije o transkriptih gredo skozi različne faze obdelave podatkov kot so čiščenje zaporedij, sestavljanje zaporedij za opredelitev domnevnih transkriptov in njihova anotacija. Ti koraki se izvajajo z zmogljivo strojno in programsko opremo.

V izvajanju naloge torej želimo rekonstruirati transkriptom hmelja in z njegovo pomočjo odkriti možne tarče delovanja vd-sRNA molekul.

Namen naloge:

Namena naloge sta 1) sestaviti podroben transkriptom hmelja in 2) analizirati in odkriti možne tarče delovanja malih viroidnih RNA.

Tip dela:

Naloga 1

V hmeljišču bomo vzorčili rastline sorte 'Celeia', poudarek bo na vzorcih različnih tkiv: listi, steblo, korenina, cvetovi in storžki. To nam bo omogočilo dobro pokritost izraženih genov hmelja in dobro rekonstrukcijo transkriptoma hmelja s pristopom določevanja nukleotidnega zaporedja naslednje generacije (NGS). Pri dobljenih zaporedjih bo potrebno preveriti prisotnost ostankov začetnih oligonukleotidov, ki jih je potrebno odstraniti pred nadaljnjo analizo. Očiščena zaporedja bomo s pomočjo programske opreme CLC Genomics Workbench v postopku denovo združevanja združili v soseske oz. kontige.

Naloga 2

Viroidna zaporedja HLVd in CBCVd/CVd-IV bomo razdelili na vse možne kombinacije 21, 22 in 24 bp dolgih molekul. Te bomo nato primerjali s transkriptomom hmelja, kjer bomo uporabili hiter algoritem primerjave, ki ga ponujata programa BLAST ali BLAT. V zadnjem delu poskusa želimo potrditi domnevno utišanje identificiranih transkriptov oz. tarč vd-sRNA. To bomo naredili s pomočjo RT-qPCR eksperimenta.