

Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity
v Českých Budějovicích



**Analýza exprese vybraných regulačních faktorů chmelu
v návaznosti na projevy viroidní patogeneze**

MAGISTERSKÁ DIPLOMOVÁ PRÁCE

VYPRACOVAL: Bc. Zoltán FÜSSY

VEDOUČÍ PRÁCE: RNDr. Jaroslav MATOUŠEK, CSc.

ESKÉ BUDĚJOVICE 2008

Füßy Z., 2008: Analýza exprese vybraných regulačních faktorů chmelu v návaznosti na projevy viroidní patogeneze [Expression analysis of selected regulation factors in hop with relation to symptoms of viroid pathogenesis]. – Master Thesis (in Czech), 70 p. Faculty of Sciences, University of South-Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation: The aim of this work was to determine whether there are besides morphogenetic and metabolomic changes in viroid-infected plants also some alterations in the expression of transcription factors (TFs) known from our previous work to be involved in the secondary metabolites production, namely *HIMyb1*, *HIMyb3*, *HlbHLH*, *HlbZIPA* and *HlbZIP2* TFs. Infectious vectors were prepared containing dimers of two closely related viroids- hop stunt viroid (HSVd) and cucumber pale fruit viroid (CPFVd). To achieve infection of hop (*Humulus lupulus* L.), biolistic inoculation of young shoots was performed. Hop cv. Admiral was chosen as a model for our experiments, because of its high flavonoid content in leaves. Infection of hop with both of these viroid species was proven by means of Northern hybridization and dot-blot techniques. Plants infected with HSVd showed serious symptoms such as stunted growth, epinasty and rugosity of leaves. Interestingly, decoloration of the petioles of the plants infected with HSVd was observed, maybe as a result of lower anthocyanins production. These symptoms were similar but milder in CPFVd-infected hops. On plants bearing symptoms, HPLC analyses were performed and compared to controls to detect changes in the levels of flavonol glycosides, phenolic acids, bitter acids and xanthohumol. In HSVd-infected hop leaves and petioles, significant decrease in the contents of flavonol glycosides and phenolic acids was observed. On the other hand, an increase in the amount of xanthohumol and bitter acids was detected in HSVd-infected tissues compared to healthy controls. Unlike to HSVd infection, the decrease of all analyzed secondary metabolites was observed in CPFVd-infected material. This difference suggests an alternative response of metabolome pathways to CPFVd-caused pathogenesis in comparison to HSVd. Semiquantitative RT PCR was performed to assay levels of TFs in healthy and infected hop tissues. Quantitative Real-time analyses of putative hop transcription factors *HlbZIPA* and *HlbZIP2* were carried out using RNA isolated from HSVd-infected petioles. Increased mRNA levels of bZIP TFs were detected in infected material, suggesting an involvement of these factors in the response of the host plants to HSVd infection. Using thermodynamic methods of TGGE and heteroduplex analysis, several sequence variants of *HlbZIP2* were identified. According to amino acid sequence alignment, this putative factor belongs to a group of bZIP proteins known for ABA/stress signalling in *A. thaliana*. This Master Thesis work is to be published in the following contributions:

Matoušek, J., **Füßy, Z.**, Orctová, L., Kocábek, T., Škopek, J., Ptáček, J., Stehlík, J., Heyerick, A. and Steger, G.: Pospiviroid pathogenesis as a developmental process involving and modulating the expression of transcription regulation factors. An international conference on Viroids and Viroid-Like RNAs, Berlin, Germany, July 26-27, 2008.

Matoušek, J., Škopek, J., Kocábek, T., **Füßy, Z.**, Orctová, L. and Patzak, J.: Cloning and functional analyses of hop transcription factors (TFs) to develop TF biotechnology of *H. lupulus*. 4th EPSO Conference: "Plants for Life", Toulon, France, 22 – 26 June 2008

KEY WORDS: transcription factors, flavonoids, viroid, HSVd, CPFVd, biolistic infection, TGGE

Tato práce je součástí řešení projektu financovaného granty GA R 521/08/0740 a AV R 1QS500510558, jehož ešitelem a spolu ešitelem je RNDr. Jaroslav MATOUŠEK, CSc. (ÚM BR BC AV R v.v.i.).

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma „Analýza exprese vybraných regulačních faktorů chmelu v návaznosti na projevy viroidní patogeneze“ vypracoval samostatně.

Použitou literaturu a podkladové materiály uvádím v přiloženém seznamu literatury.

V Brně 30. 4. 2008

podpis

POĎAKOVANIE

Rád by som na tomto mieste poďakoval svojej mame, sestre Edine, rodine a blízkym priateľom za podporu. V neposlednom rade by som chcel poďakovať Dr. Matouškovi za trpezlivý dohľad, Dr. Škopkovi a kolegom z Oddelenia molekulárnej genetiky ÚMBR za ochotu poradiť a za nezištnú pomoc, Dr. Didiovi, Dr. Ptáčkovi a kolektívu Oddelenia farmaceutík Univerzity v Gente za pomoc pri analýzach. Ďakujem.

Veselých Budjoviciach dne 30. 4. 2008

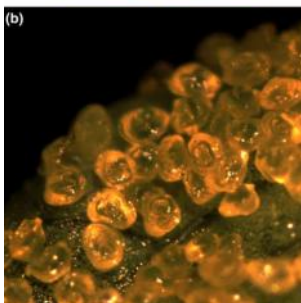
OBSAH:

1. ÚVOD	5
1.1. „OZDRAVNÝ“ CHMEL A METABOLICKÉ INŽENÝRSTVÍ.....	5
1.2. REGULAČNÍ FAKTORY.....	7
1.2.1. <i>Transkripční faktory s vazebnými místy typu bZIP</i>	10
1.2.2. <i>Myb-p íbužné faktory</i>	11
1.3. VIROIDNÍ PATOGENY U CHMELU.....	13
1.4. MECHANIZMY PATOGENEZE VIROID.....	15
2. CÍLE PRÁCE	21
3. MATERIÁL A METODY	22
3.1. MATERIÁL.....	22
3.1.1. <i>BIOLOGICKÝ MATERIÁL</i>	22
3.1.2. <i>ŽIVNÁ MÉDIA A CHEMIKÁLIE</i>	22
3.1.3. <i>ROZTOKY</i>	22
3.1.4. <i>POUŽITÉ KOMERČNÍ ENZYMY</i>	27
3.1.5. <i>PRIMERY A DALŠÍ MATERIÁL</i>	27
3.2. METODICKÉ POSTUPY.....	28
3.2.1. <i>METODY AMPLIFIKACE A PŘÍPRAVY VZORKŮ PRO SEKVENČI</i>	28
3.2.2. <i>METODY IZOLACE NUKLEOVÝCH KYSELIN</i>	31
3.2.3. <i>METODY POUŽITÉ KE KONSTRUKCI INFEKČNÍHO VEKTORU</i>	34
3.2.4. <i>BIOLISTICKÁ INOKULACE</i>	36
3.2.5. <i>METODY MOLEKULÁRNÍ HYBRIDIZACE, „NORTHERN“ BLOT A DOT BLOT</i>	36
3.2.6. <i>METODY SEPARACE A ANALÝZY NUKLEOVÝCH KYSELIN V GELECH</i>	41
3.2.7. <i>SEKVENACE</i>	43
3.2.8. <i>EXTRAKCE SEKUNDÁRNÍCH METABOLITŮ PRO HPLC ANALÝZU A HODNOCENÍ OBSAHU PIGMENTŮ A SEKUNDÁRNÍCH METABOLITŮ</i>	43
3.2.9. <i>FENOLOGICKÉ HODNOCENÍ SYMPTOMŮ</i>	44
4. VÝSLEDKY	45
4.1. KONSTRUKCE INFEKČNÍHO VIROIDNÍHO VEKTORU, INFEKCE <i>HUMULUS LUPULUS</i> A HODNOCENÍ PATOGENEZE.....	45
4.2. OPTIMALIZACE PODMÍNEK PRO RT-PCR A REALTIME RT-PCR SEKVENČÍ CHMELOVÝCH TRANSKRIPČNÍCH FAKTORŮ.....	50
4.3. HODNOCENÍ EXPRESE VYBRANÝCH TRANSKRIPČNÍCH FAKTORŮ V INFIKOVANÉM A KONTROLNÍM CHMELU.....	51
4.4. HODNOCENÍ SEKVENČNÍ VARIABILITY FRAGMENTŮ TRANSKRIPČNÍCH FAKTORŮ POMOCÍ TERMODYNAMICKÝCH METOD.....	53
5. DISKUSE	56
6. ZÁVĚRY	60
7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	61
7.1. V DEKÉ LÁNKY A PUBLIKACE.....	61
7.2. SEKUNDÁRNÍ CITACE.....	70
8. POUŽITÉ ZKRATKY	71

1. ÚVOD

1.1. „Ozdravný“ chmel a metabolické inženýrství

Chmel obecný (*Humulus lupulus* L.) je dvoudomá trvalka mající pravotočivou révu patřící do čeledi Cannabaceae. Jako kulturní plodina má dlouhou historii využití. První písemné zprávy o pěstování chmele pocházejí z 8. století z oblasti dnešního Německa. V zemědělství se využívají samičí rostliny, které v době kvetení vytvářejí květenství připomínající šišky. Tyto šištice, neboli chmelové hlávky, vznikají ztvrdnutím listů při dozrání květenství. Na vnitřní straně listů se zakládají tzv. lupulinové žlázy, přeměněné žláznaté trichomy, produkující směs sekundárních metabolitů (zejména hořkých kyselin, silic a flavonoidů), lupulin. V jednotlivých kultivarech je biochemické složení lupulinu relativně stabilní (De Keukeleire *et al.*, 2003). Díky těmto látkám je chmel využíván nejen jako aromatická rostlina



Obr.1: Lupulinové žlázy na samičích květech chmelu *H.lupulus* (převzato, Stevens a Page, 2004).

k produkci piva, ale také pro své uklidňující a protizánětlivé účinky a pozitivní účinky na činnost trávicí soustavy také v lidovém léčitelství. Pro pivovarnictví má význam zejména obsah hořkých kyselin (rozsah od 2 do 18%). Podle tohoto obsahu se chmelové kultivary dělí na aromatické a „hořké“, s preferencí „hořkých“ kultivarů, což nastalo se změnou procesu vaření piva (použití chmelových granulí apod.). V nedávné době však došlo k objevu látek vznikajících z prekursorů květních barviv, fenylypropanoidů, specificky syntetizovaných v lupulinových žlázkách chmele, jež mají protirakovinnou, respektive fytoestrogenní aktivitu. Tyto látky se nazývají prenylované flavonoidy, zastoupené zejména xanthohumolem, chemopreventivním agens s inhibičními účinky na všechna stádia kancerogeneze (Gerhäuser *et al.*, 2002; Miranda *et al.*, 1999), a 8-prenylnaringeninem, dnes nejsilnějším známým fytoestrogenem (Milligan *et al.*, 1999; přehledná práce viz Gerhäuser, 2005; Stevens a Page, 2004).

Problémem zůstává nízký obsah těchto metabolitů

s pozitivním úinkem na lidské zdraví jak v chmelových hlávkách, tak i v chmelových produktech. Předchozí výzkum Matouška *et al.* (Matoušek *et al.*, 2002a, b) se soustředil na skríníng chmelových chalkonsyntáz (CHS), které hrají klíovou úlohu v produkci sekundárních metabolitů, nebo jejich produktem je chalkon, který ve sledu dalších biochemických reakcí dává vznik velké skupině flavonoidů zahrnujících taniny, flavonoly a anthokyany. CHS katalyzuje kondenzaci 4 molekul malonyl-CoA s p-kumaroyl-CoA v nkolikastupové reakci za vzniku jediné molekuly chalkonu. Mezi další produkty enzym nadrodiny chalkonsyntáz patří také homogénní kyseliny chmelu.

V krátké době po identifikaci kódující sekvence valerofenonsyntázy *vps* (o které se předpokládalo, že je odpovědná právě za produkci homogénních kyselin; Okada a Ito, 2001) byl identifikován gen, jehož produkt jeví dle enzymatického rozboru krom tzv. "pravé" chalkonsyntázové aktivity také afinitu k prekurzorům homogénních kyselin a má expresi ve zrajících hlávkách 1000-krát vyšší než v somatických pletivech (Novák *et al.*, 2006). Tento gen byl nazván *chs_H1* (Matoušek *et al.*, 2002a; GeneBank AC: AJ304877). *chs_H1* tvoří s dalšími členy své oligorodiny soubor identických enzymů (co se týká stavby aktivního centra; Matoušek *et al.*, 2006). U dalších identifikovaných homologů, *chs 4* (Novák *et al.*, 2003), *chs 2* (AB061020) a *chs 3* (AB061022), jsou genetické a enzymatické aktivity předmetem výzkumu, ale *chs_H1* se jeví jako hlavní producent chalkonu (Novák *et al.*, 2006). Kvůli odpovědnosti *chs_H1* za syntézu chalkonu se očekávala silná korelace mezi hladinou mRNA *chs_H1* a obsahem xanthohumolu u různých kultivarů kulturního chmelu. Výsledky tento předpoklad nepotvrdily, proto je pravděpodobné, že je obsah prenylflavonoidů v chmelových hlávkách závislý i na aktivitách enzymů následujících kroků biosyntézy flavonoidů (Novák *et al.*, 2006). Nicméně, matematická korelace aktivity CHS a akumulace flavonoidů spíše ukazuje, že je to právě CHS, která omezuje rychlost biochemické dráhy (Knogge *et al.*, 1986), což má za následek kompetici o chalkon. Do dnešního dne neexistuje záznam o regulaci CHS zpětnou vazbou, nebo podobnými mechanismy modulujícími enzymatickou aktivitu.

Pokud je cílem zvýšení obsahu nějakého metabolitu, existuje několik cest, jak toho dosáhnout. Tradiční přístup vede k pozmenění nejpomalejších kroků určité biochemické dráhy. Tento přístup samozřejmě může být úspěšný, ale také může být náročné identifikovat „hrdlo lahve“ dané dráhy, navíc může být hladina konečného produktu regulována několika enzymy. Tato „hrdla lahví“ mohou být také druhově specifická. Pokud u geneticky modifikované epky bylo potřeba ke zvýšení produkce beta-karotenu transformovat rostlinu

pouze jediným genem (Shewmaker *et al.*, 1999), u tzv. „zlaté rýže“ bylo potěba poznamenat expresi až tří genů z důvodu nízké exprese enzymů na začátku této biosyntetické dráhy (Ye *et al.*, 2000). V obdobných případech může být alternativou modifikace patřících transkripčních regulátorů, spíše než úprava exprese enzymů účastnících se této dráhy.

1.2. Regulační faktory

Transkripční regulátory, nebo transkripční faktory (TF), se v rostlinách i živočišných ústředních regulace mnoha metabolických drah, reagují na vývojové, hormonální, i environmentální signály a vytvářejí buněnou odpověď na úrovni exprese jím podřízených genů. Jejich význam ve vývoji organismů spočívá v jejich roli v epigenetické regulační kaskádě, dokonce se uvažuje, že hlavním zdrojem diverzity a změn, které jsou základem pro evoluci je právě regulace transkripce. Transkripční faktory modulují expresi specifických skupin proteinů pomocí sekvencí specifických protein-DNA a protein-proteinových interakcí. Interagují zejména s transkripčním aparátem, proteiny remodelace chromatinu a/nebo dalšími transkripčními faktory. Mohou fungovat jako aktivátory i jako represory transkripce, a tedy způsobují hromadění nebo naopak snížení hladiny mRNA.

Co do struktury, transkripční faktory obsahují několik domén, které určují jejich schopnost interagovat (Liu *et al.*, 1999):

a) DNA-vazebné domény obsahují několik aminokyselinových (aa) zbytků, které se vážou na DNA v místech *cis*-elementů. Tyto aa určují vazebnou specifitu proteinu. Další rezidua zlepšují vazbu TF díky interakcím s fosfátem nebo cukernatým zbytkem DNA. Domény rozpoznávající vazebné místo jsou často vysoce konzervované a mimo jiné podle DNA-vazebných domén jsou TF členy do několika rodin.

b) oligomerizační domény slouží k vytváření hetero- a/nebo homooligomerů TF, což ovlivňuje specifitu vazby na DNA, afinitu TF k promotorovým elementům a lokalizaci TF do jádra. Oligomery jsou stabilizovány hydrofobními, nebo hydrofilními interakcemi aa reziduí.

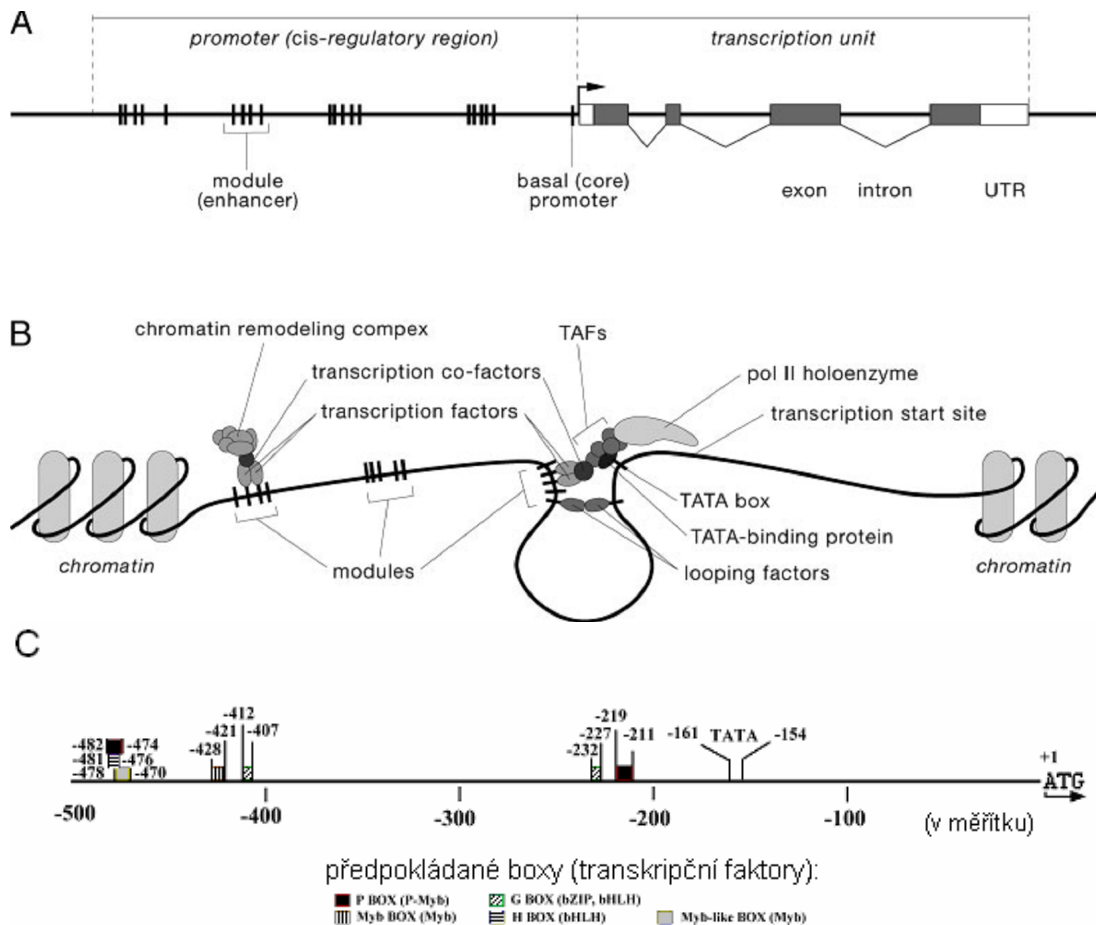
c) transkripční -modulační domény, aktivní nebo represivní.

d) NLS („nuclear localization signal“) – úsek se zvýšeným počtem argininových (R) a/nebo lyzinových (K) zbytků směřující protein do jádra. (Liu *et al.*, 1999)

Dle Riechmanna *et al.* (Riechmann *et al.*, 2000) genom *Arabidopsis thaliana* kóduje nejmén 1533 transkripčních regulátorů, což odpovídá asi 5,9% všech jejích genů. Tato čísla se zdají být podhodnocená, neboť u 40 až 50% proteinů nebyla na základě sekvencí nalezena žádná funkční analogie k již známým proteinům. Pokud lze na základě porovnání a rozlišení transkripčních faktorů odhadovat regulační komplexitu organismu, je *Arabidopsis* srovnatelně komplexní jako *Drosophila*. Ve výzkumu je prostor a dlouhodobý zájem o studium transkripčních faktorů, jakožto o jeden z nejdůležitějších mechanismů kontroly biochemických drah.

První práce s objevenými transkripčními faktory účastnícími se biochemických drah u rostlin – regulátory flavonoidní dráhy u kukuřice COLORLESS1 (C1) a RED (R) (Goff *et al.*, 1990), odhalily obrovský potenciál transkripčních faktorů při manipulaci komplexních metabolických drah. Jako příklad mohou uvést dva pokusy s diametrálně odlišnými výsledky. Muir *et al.* (2001) se pokoušeli zvýšit obsah zdravějších flavonoidů v rajčeti pomocí zvýšené exprese jednoho z prvních enzymů této biosyntetické dráhy, chalkonizomerázy (CHI), která se exprimuje v plodech pouze v malých množstvích. Expese CHI nicméně způsobila zvýšení obsahu flavonoidů pouze ve slupce plodu, neboť v dužině nedochází k expresi dalších enzymů výše a níže CHI ve sledu této biosyntetické dráhy. O podobné zvýšení sekundárních metabolitů se pokoušeli také Bovy *et al.* (2002), nicméně nepostoupili k souhlasnému zvýšení dvou regulátorů anthokyanů, *Leaf colour (Lc)* a *Colorless (Cl)* – tedy páru TF ze skupin MYB a bHLH, které spolu při regulaci transkripce interagují, viz níže, při změně jejich zvýšenou expresí cílili do plodu. Dle očekávání došlo ke zvýšení produkce flavonoidů, a spíše překvapivě došlo ke hromadění flavonoidů plodu, nikoli anthokyanů. Na rozdíl od předchozí skupiny se docílilo zvýšení produkce v celém plodu kukuřice. Manipulace metabolomu ovlivněním regulátorů tedy může být úspěšná i v takovém pletivu, kde je relevantní enzymatická aktivita nedostatečná. Navíc se ukázalo, že zvýšení exprese regulátorů může ovlivnit daleko více buněčných změn, než pouhou expresí enzymů určité dráhy. Bruce *et al.* (2000) poukázali na změnu exprese několika set genů, při změně pouze zlomek těchto genů kódoval známé enzymy biosyntézy flavonoidů. Podařilo se jim také identifikovat dva předpokládané transportní proteiny, které pomáhají vznikat metabolitům do jejich definitivních cílů – rozličných buněčných oddílů – kompartmentů.

Pokud se rozhodneme pro manipulaci cestou transkripčních regulátorů, není bezdůvodně při hledání regulačních systémů chmelových *chs* zkoumat již známé regulační systémy biosyntézy fenyylpropanoidů, například geny regulačních faktorů řídící pigmentaci



Obr.2: Schéma struktury promotorové sekvence a jeho funkce. (A) Organizace obecného eukaryotního genu, ukazující relativní pozici transkribované jednotky, bazálního promotoru a míst nasedání TF (TFBS). Pozice jednotlivých TFBS se mezi promotory rozdílných genů diametrálně odlišují. (B) Idealizovaný promotor při aktivaci. Inicie transkripce vyžaduje specifickou spolupráci několika desítek proteinů, včetně holoenzymového komplexu RNA polymerázy II, TATA-binding proteinu (TBP), TAF (TBP-asociované faktory, nebo též obecné transkripční faktory), transkripční faktory a kofaktory a komplexu remodelace chromatinu. Pevzato z práce Wraye *et al.* (Wraye *et al.*, 2003). (C) Schematické znázornění promotorové sekvence *chs_H1* a předpokládané regulační cis-elementy (v závorce rozpoznávající transkripční faktory). Pevzato z práce Matouška *et al.* (Matoušek *et al.*, 2005).

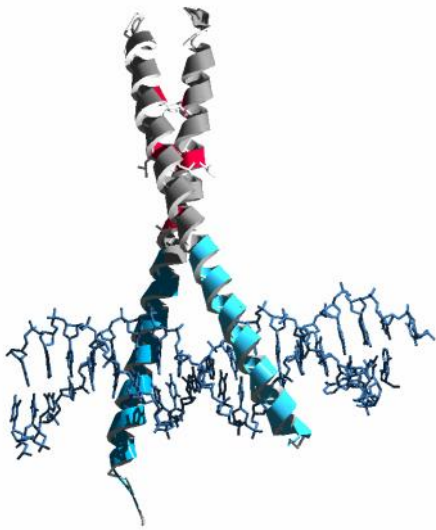
anthokyany, které jsou u vyšších rostlin funkčně konzervované. Klíčovou úlohu v kontrole biosyntézy flavonoidů a v reakcích na stresové podmínky hrají MYB proteiny. Dva jejich zástupci se podařilo izolovat z hlávek chmelu skríningem cDNA knihovny (Matoušek *et al.*, 2005; Matoušek *et al.*, 2007a). Další proteiny potenciálně se účastní regulace flavonoidní dráhy jsou transkripční faktory z rodin bHLH a bZIP. Samozřejmě je možné najít také cis-sekvence v promotoru, na které *trans*-proteiny nasedají. V promotorovém úseku *chs_H1* se doposud našlo několik cis-regulačních elementů; mezi nimi G- a H- boxy (známe především z promotorů genů indukovaných světlem, stresem, případně patogenem), CHS-podobný box, tkáňově specifický box (TACPyAT) a nakonec MYB-homologní box (Matoušek *et al.*, 2005). V souladu s tímto bylo zjištěno, že aktivace genu *chs_H1* obecným heterologním

aktivátorem anthokyanové biosyntézy, AtMyb75/PAP1 ze skupiny R2R3 MYB (Matoušek *et al.*, 2006). Naproti tomu v promotorové sekvenci *vps* se nenašly H- a G- boxy, i když H-podobné sekvence a jádro G-boxu se v sekvenci najít podařilo. Okada *et al.* (2003) dále zjistili, že je promotor *vps* aktivní nejen v lupulinových žlázkách, ale též v listech a stonku. Díky těmto indiciím a kvůli nedostatku informací o enzýmech a regulacích dalších kroků biosyntézy prenylflavonoid (O-methyltransferáza a prenyltransferáza) bylo tedy pro možnost zkoumání a následné manipulace s metabolomem chmelových hlávek výhodnější soustředění výzkumu právě na transkripční faktory interagující s promotorem *chs_H1*. Z rozlišených dat získaných během studia *A. thaliana* a dalších rostlinných druhů se dá předpokládat možnost zapojení ve vývoji a produktivitě chmelových hlávek zejména transkripčních faktorů ze skupin R2R3 MYB, bHLH („basic helix-loop-helix“), bZIP („basic leucine zipper“), C2H2 zinkových prstů, MADS (Mcm1, Agamous, Deficiens, Serum response factor) a WRKY zinkových prstů.

1.2.1. Transkripční faktory s vazebnými místy typu bZIP

Transkripční faktory typu bZIP se vyskytují ve všech doposud zkoumaných organizmech, u kterých z nich byly intenzivně studovány (Jun/Fos nebo CREB; přečtěte si práci viz Jakoby *et al.*, 2002) a slouží jako modely studia TF:DNA interakcí a posttranslačních mechanismů TF. bZIP doména je charakteristická dvěma strukturálními motivy sousedícími na jednom -helixu: bázeický („basic“) region 16 aa zbytek, obsahující NLS následovaný nemenným N-x₇-R/K motivem, který se dotýká velkého žlábků DNA dvoušroubovice; dále pak leucinový zip, neboli heptádové opakování několika leucinů nebo jiných objemných nepolárních aminokyselin, umístěné od R/K přesně 9 aa směrem k C-konci, vytvářející amfipatickou šroubovici (obr.3). Aby došlo k interakci s DNA, musejí dvě podjednotky poplnout díky interakcím mezi nepolárními stranami jejich šroubovic. Schopnost dvou podjednotek vytvořit spolu homodimer, (nebo méně často heterodimer), je podmíněna elektrostatickými interakcemi mezi rezidui polárních aa obklopujících hydrofobní povrch sloužící k interakci podjednotek. Rostlinné bZIP proteiny se vážou především na DNA sekvence s ACGT jádrem, vazebná specifita pak může být dále ovlivněna okolními nukleotidy, jedná se pak o A-boxy (TACGTA), C-boxy (GACGTC), nebo G-boxy (CACGTG). Vazebnou může specifitu dále ovlivnit i širší okolí ACTG jádra (Jakoby *et al.*,

2002; Menkens *et al.*, 1995), existují však i zprávy o nepalindromických vazebných místech (Choi *et al.*, 2000). Mnoho bZIP TF obsahuje na N-konci také region bohatý na proliny – transkripční aktivní doménu (Menkens *et al.*, 1995).



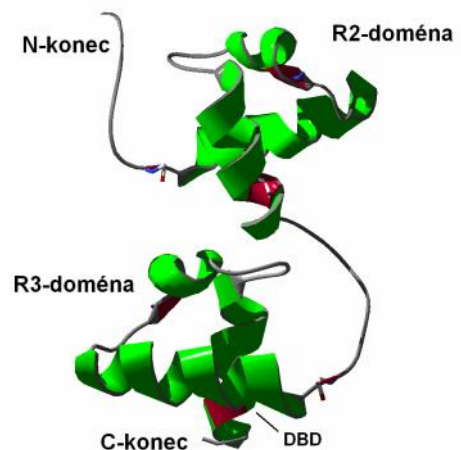
Obr.3: Částečný model dimeru proteinu GCN4 (PDB: 1YSA) ze skupiny bZIP. Modrou barvou jsou naznačeny DNA-vazebné domény, červenou barvou polohy tří párů leucinových tvořících amfipatickou šroubovici – leucinový zip (šedý). Zpracováno programy Swiss-PDBViewer v3.7 a POV-Ray v3.6.

odrážet funkční podobnost jednotlivých TF, což by mohlo napomoci při hledání specifické funkce pro již popsané i nově nalezené transkripční faktory bZIP (Jakoby *et al.*, 2002).

1.2.2. Myb-přibuzné faktory

Faktory MYB představují skupinu proteinů obsahujících konzervovanou MYB DNA-vazebnou doménu. První MYB faktory jsou malou skupinou zapojenou pravděpodobně do kontroly buněčného cyklu vyšších eukaryot, jak o tom svědčí výzkum na prvních objevených živočišných MYB-proteinech (Weston, 1998). DNA-vazebná doména se skládá ze tří ne zcela stejných

U *Arabidopsis* bylo nalezeno 4-krát více bZIP genů než u kvasinek i živočichů (Riechmann *et al.*, 2000), výzkum ukázal jejich zapojení v signalizaci světla i stresu, regulaci obrany vůči patogenům a zapojení ve zrání semen a vývoji květu. Uvažuje se, že by díky této diverzitě funkcí mohlo být jejich využití již u evolučně nejprimitivnějších rostlin. bZIP proteiny *A. thaliana* byly dle podobnosti bazického regionu a dalších konzervovaných motivů rozděleny do 10 skupin, které by dle představy autorů mohly



Obr.4: Model proteinu c-Myb (PDB: 1GV2). Naznačeny polohy domén R2 a R3, v rámci kterých se nachází také DNA-vazebná doména (DBD). Červenou barvou jsou naznačeny polohy tří konzervovaných tryptofanů. Zpracováno programy Swiss-PDBViewer v3.7 a POV-Ray v3.6.

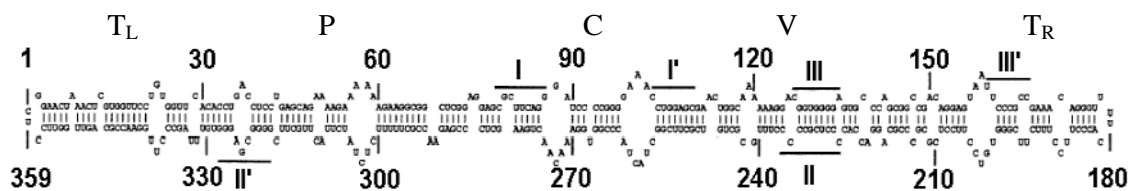
opakování, z nichž každé tvoří strukturu helix-smyčka-helix z přibližně 53 aa. Pro tato opakování jsou charakteristické tři tryptofanové zbytky, které jsou od sebe pravidelně odděleny méně konzervovanými aa a tvoří v 3D struktuře domény tryptofanových klastrů. Tato tři opakování se nazývají R1, R2, a R3, opakování dalších MYB proteinů jsou pak nazývána dle homologie s R1, R2 nebo R3.

U rostlin jsou MYB-proteiny jednou z nejvýznamnějších skupin TF (Riechmann *et al.*, 2000), v níž převládají proteiny charakteristické R2R3-MYB doménou (Obr. 4). MYB-faktory s jediným opakováním (nebo pouze dvěma) mají velice různé funkce a zahrnují faktory vázající se na telomerickou DNA. Systematická mutagenese MYB proteinů odhaluje zapojení R2R3-MYB genů zejména v mnoha rostlinně-specifických procesech produkce sekundárních metabolitů (např. *AtMyb75/PAP1* nebo *AtMYB90/PAP2*, regulující metabolismus fenylpropanoidů, Borevitz *et al.*, 2000), ale i v určení identity a osudu rostlinných buněk. MYB proteiny jsou často aktivní v heterodimerech s proteiny bHLH, pro příklad uvádím *AtbHLH/GL3*, vytvářející homo- a heterodimery s *GL1* a *TTG1*, což představuje obecně rozšířený model interakce TF v regulaci vývoje trichomů a akumulaci sekundárních metabolitů (Payne *et al.*, 2000). Společná regulace biosyntézy fenylpropanoidů MYB a bHLH proteiny byla první popsána regulace ovlivňující metabolom (přehledná práce viz Marles *et al.*, 2003; Broun, 2004). Ze souasných výzkumů vyplývá, že některé TF vytvářejí složité komplexy, jako např. komplex MYB-bHLH-WD40 zprostředkující různé dráhy diferenciaci buněk (Ramsay a Glover, 2005) nebo aktivaci biochemických drah (Yamazaki *et al.*, 2003).

R2R3 MYB faktory rovněž fungují v odpovědi rostlin na podněty prostředí a ve zprostředkování hormonálních signálů (přehledná práce viz Jin a Martin, 1999). Žádný známý R2R3 MYB gen však zatím nebyl spojen se silným fenotypem, který by se dal okeávat v případě esenciálního regulátoru. Je potřeba dalšího výzkumu pro zjištění, zda-li jsou efekty mutantů v klíčových proteinech maskovány funkcí redundancí a zda-li existují nezbytné R2R3 MYB geny. Na druhou stranu nebyl mezi 125 R2R3 MYB geny identifikován žádný, který by jevil známky pseudogenu, z čehož se soudí, že selekce udržuje tyto geny intaktní. Při hledání redundantních faktorů je potřeba brát na zřetel dvě základní hlediska: funkční podobnost těchto faktorů, ale také charakteristiku jejich exprese v časové a/nebo prostoru (Stracke *et al.*, 2001).

1.3. Viroidní patogeny u chmelu

Viroidy představují nejmenší cirkulární patogenní ssRNA replikony s velikostí 246-401 bazí, tedy až 10-krát menší než nejmenší známý RNA virus. Jejich sekvence je vysoce komplementární, tvořící pevnou strukturu, nekóduje žádný protein a jsou tedy plně závislé na transkripčním aparátu hostitelské rostliny (přehledná práce viz Flores, 2001; Flores *et al.*, 2005). Některé viroidy však „kódují“ strukturu RNA fungující jako ribozym, jež katalyzuje sestih vlastní multimerní RNA vznikající mechanismem valivé kružnice (*Avsunviroidae*). Jejich malá velikost, cirkulární struktura, vysoký obsah G/C a katalytická aktivita některých z nich, to všechno jsou náznaky, že by se mohlo jednat o pozůstatky života před vznikem buněk (Diener, 1989, 1995). Po objevu prvních buněčných forem života se mohly vyvinout v parazity prvních sinic (zejména předchůdců chloroplastů) a později také prvních eukaryot v procesu spojeném s mutagenezí a kombinacemi viroidních domén (Keese a Symons, 1985). Viroidy se ve svém hostiteli množí jako populace blízce příbuzných variant („quasi-species“) s jedním nebo několika málo dominantními variantami. Mezi příznaky onemocnění patří chloróza, epinastie, tvrdost a nekróza listů, zkrácení internodií, trpaslivý vzrůst, zmenšení květů, odbarvení plodů, malformace zásobních orgánů a další, a kolikrát viroidy vykazují pouze slabé, nebo žádné symptomy. Absence symptomů je také v případě planostoukavých rostlin, které tak fungují jako rezervoár viroidů. Symptomy se zesilují vlivem silného oslavení denním světlem, či zejména vlivem zvýšené teploty (Gruner *et al.*, 1995; Matoušek *et al.*, 2001).



Obr. 5: Primární a sekundární struktura PSTVd s naznačenými polohami domén a smyček (viz níže).

První izolovaný viroid byl PSTVd („potato spindle-tuber viroid“) identifikovaný při hledání domnělého viru způsobujícího vřetenovitost hlíz bramboru (Diener a Raymer, 1967; přehledná práce viz Owens, 2007). Další pokusy odhalily patogena stejného charakteru také u jiných rostlin. Doposud je známo téměř 30 druhů viroidů, většina patří do skupiny *Pospiviroidae* s typickým zástupcem PSTVd. Vytvářejí sekundární strukturu typu inkovitého

tvaru s minimální volnou energií. Bylo identifikováno 5 strukturálních domén: C (centrální) doména nacházející se kolem striktně konzervativní sekvence (CCR – „central conserved region“) tvořící tzv. „bulged-helix“, P doména asociována s patogenicitou, variabilní V doména a dvě terminální domény T_L a T_R (Keese a Symons, 1985). Na základě experimentů s teplotní denaturací a sekvenční analýzou byly navrženy 3 možné vlásenky vznikající na intermediárních produktech během replikace viroidu PSTVd – I, II a III (obr. 5) (Qu *et al.*, 1993).

Jako patogeny chmelu byly popsány dva viroidy ze skupiny *Pospiviroidae*: HLVd a HSVd. Latentní viroid chmele (HLVd, Puchta *et al.*, 1988) se vyskytuje ve chmelech po celém světě a jeho obecně škodlivý vliv byl prokázán u několika kultivarů (Patzak *et al.*, 2001). Vlivem infekce HLVd dochází vedle zmenšení hlávek ke kvantitativním změnám v hladinách některých sekundárních metabolitů v lupulinových žlázkách (Adams *et al.*, 1992; Barbara *et al.*, 1990). Až tedy nedochází k výrazným morfologickým změnám napadených rostlin, z pohledu biochemického se rozhodně nejedná o latentního patogena. Převodní přes široký screening nebyl nalezen jiný hostitel HLVd, než chmel (Puchta *et al.*, 1988), kromě kopřivy (Knabel *et al.*, 1999 cit. dle Matoušek, 2003). U HLVd-infikovaných chmelů však bylo zjištěno, že následkem tepelného šoku po prvotním snížení hladiny viroidní-specifické RNA dochází ke zvýšení sekvenční variability HLVd ze zanedbatelného množství mutantů u rostlin pěstovaných ve standardních podmínkách až na 9,8 % u rostlin léčených tepelným šokem. Zjištění mutanti se v rostlinách stabilně replikovali (Matoušek *et al.*, 2001). Následkem této mikroevoluce však inokulace směsí mutovaných „quasispecies“ HLVd způsobila infekci u rajčete, jež není pro divoký typ HLVd hostitelem, a navíc inokulem připraveným z infikovaných rajčat bylo možné infikovat také *N. benthamiana*. Je možné, že divoký typ HLVd je velmi dobře adaptovaný na infekci chmelu a nízká variabilita v sekvenci způsobuje neschopnost infikovat další hostitele, což může být bariéra pouze v nemutagenických podmínkách (Matoušek, 2003).

HSVd („hop stunt viroid“) je schopen infikovat široké spektrum hostitelů z několika řádů (Cannabaceae, Rosaceae, Rutaceae, Vitaceae a Cucurbitaceae). V některých druzích, například ve vinné révě (Shikata, 1990 cit. dle Matoušek *et al.*, 2003) a v meruňce (Astruc *et al.*, 1996), se zdá být infekce latentní, ale u jiných způsobuje typické a specifické symptomy (chmel, Shikata, 1990 cit. dle Matoušek *et al.*, 2003). V různých databázích jsou sekvence více než 100 variant HSVd, jeho variabilita a plasticita je tedy známa. Molekulárně genetická srovnání potvrdila obecně přijímaný názor, že k přenosu na chmel došlo z vinné révy (Sano *et*

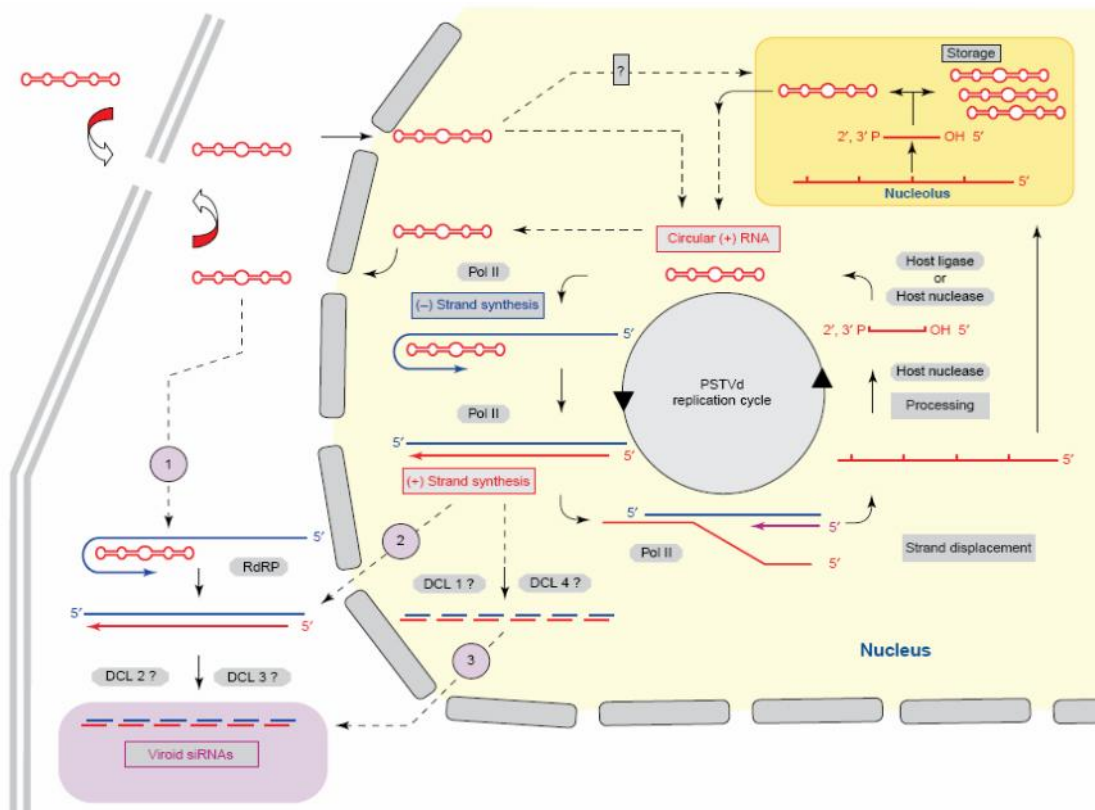
al., 2001). Dokázáno je to pouze na japonské populaci, ale viroid HSVd se rychle rozšířil do celého světa a značně ohrožuje kulturní chmel. Riziko přenosu na kulturní rostliny je o to vyšší, že se infekce HSVd přenáší také na plevelní druhy bylin se vyskytující na chmelnicích a bramborových polích, a hladina viroidu u některých druhů dosahuje pouze nízkých koncentrací (Matoušek *et al.*, 2007b). Je možné, že velké množství sekvenčních variant je právě důsledkem přenosu na nového hostitele a koadaptací na chmel by mohlo dojít u HSVd ke zúžení populace variant, jako je tomu v případě HLVD (Matoušek *et al.*, 2007b).

CPFVD („cucumber pale fruit viroid“) je sekvenční varianta HSVd s mírnými symptomy, která byla izolována z okurky (Sano *et al.*, 1984). Zatím pro tento viroid nebyla prokázána schopnost infikovat chmel, ale z důvodu přibuznosti lze tuto možnost očekávat.

1.4. Mechanizmy patogeneze viroidů

Kromě sekundární struktury mají dvě hlavní známé skupiny viroidů odlišnosti také v základních mechanismech množení a patogeneze. *Avsunviroidae* se od *Pospiviroidae* liší v prvním kroku jejich replikace: ASBVd a PLMVd se množí symetrickým mechanismem valivé kružnice v chloroplastech, kde špení na monomery a ligace do kruhové molekuly probíhá na (+) i (–) et zci, kdežto replikace PSTVd a HSVd probíhá v jádře asymetrickým způsobem, špení a ligují se pouze (+) multimery (Obr. 6). *Pospiviroidae* využívají k replikaci (+) i (–) et zci RNA polymerázu II (Warrilow a Symons, 1999), ale otázka, jakým způsobem mají specifitu hostitelských DNA-dependentních RNA polymeráz k transkripci RNA, zůstává nevyřešena. Počátek replikace (–) et zci se nachází v místech A₁₁₁ a A₃₂₅ a GC-boxy umístěné 15 a 16 bází směrem k 5' konci, v uvedeném pořadí, jsou považovány za viroidní promotorové elementy (Fels *et al.*, 2001). Bylo zjištěno, že (–) et zci zůstává přítomná v jádře, ale (+) et zci se vyskytuje v jádře i v jadérku (Qi a Ding, 2003; Obr. 6). Takovéto rozlišení opačných et zci RNA poukazuje na přítomnost vysoce specifické buněčné mašinerie s potenciálním významem pro genovou regulaci (Flores *et al.*, 2005). Špení transkriptu delších než monomer viroidu je zprostředkováno hostitelskou RNázou (Tsagris *et al.*, 1987), jejíž specifita je podmíněna určitou konformací molekuly RNA (Daròs a Flores, 2004), a tento mechanismus možná není obecný pro všechny viroidy. V případě *Avsunviroidae* se uplatňuje RNázová aktivita ribozymového motivu, vyskytujícího se v (+) i (–) et zci (Flores *et al.*, 1999). Data ohledně tohoto kroku replikace viroidů jsou omezená,

ale předpokládá se, že reakci katalyzuje enzym podobný zárodečné RNA-ligáze pšenice (Branch *et al.*, 1982) nebo reakce probíhá autokatalyticky (Baumstark *et al.*, 1997). Místo štěpení a ligace bylo u PSTVd mapováno mezi G₉₅ a G₉₆ (Baumstark *et al.*, 1997). Pohyb viroid skupiny *Pospiviroidae* v rámci rostliny probíhá v několika krocích: (1) import do jádra přes jaderné póry (ještě před replikací), (2) export z jádra (po replikaci), (3) pohyb mezi buňkami hostitele a (4) pohyb do vzdálených pletiv (Zhu *et al.*, 2001). Woo *et al.* (1999) ukázali, že molekula viroidu PSTVd obsahuje sekvenci a/nebo strukturální motiv, umožňující přenos do jádra v procesu nezávislém na cytoskeletu pomocí saturovatelného jaderného receptoru. Identifikace proteinu VirP1 (Viroid RNA-binding Protein1) s bromodómnou spojila tento proces s vhodným kandidátem: má afinitu k PSTVd *in vitro* a *in vivo* a obsahuje jaderný lokalizační signál. Další výzkum odhalil RNA motiv odpovídající za tuto specifickou



Obr.6: Mechanizmy replikace a silencingu PSTVd. Po přenosu do jádra začíná replikace (-) a (+) vláken viroidní RNA. Za povšimnutí stojí lokalizace (+) vláken v jádru. Degradace dvouvláknového meziprojektu probíhá pravděpodobně podobně jako u Dicer-like (DCL) enzymů přítomných v jádru. Detaily viz text (převzato a upraveno z Tabler a Tsagris, 2004).

interakci, asymetrickou vnitřní smyčkovou nacházející se v T_R doméně. Dle složení bazí byl nazván RY a mutace kteréhokoli ze dvou RY motivů PSTVd má za následek eliminaci jeho patogeneze (Martínez de Alba *et al.*, 2003). Pro pohyb mezi buňkami používají molekuly

PSTVd plazmodezmata, opírající se na základě sekvence nebo strukturálního motivu (Ding *et al.*, 1997). Systemický pohyb viroidů probíhá přes cévní soustavu (floém) rostlinného hostitele (Zhu *et al.*, 2001), což umožňuje systémovou infekci a napadení pletiv vzdálených od místa primární infekce. Zhu *et al.* (2001, 2002) dále ukázali, že přenos PSTVd je ovlivněn vývojovými a buněčnými faktory rostliny, která je schopná zablokovat přístup patogenu do určitých pletiv. Přenos do floému je pravděpodobně zprostředkován hostitelskými proteiny: jeden z nejpočetnějších proteinů floému PP2 z okurky tvoří *in vivo* komplex s HSVd (Gómez a Pallás, 2001; Owens *et al.*, 2001), dále interaguje s plazmodezmaty a je schopen translokace na dálku, dokonce mezi podnoží a roubem rozdílných druhů, i když není schopen efektivně přenášet HSVd z floému do pletiv roubu k viroidu necitlivého druhu (Gómez a Pallás, 2004). Viroidy se tedy koadaptovaly na využití stávajících transportních cest rostlin díky svým osobitým strukturálním vlastnostem. Studium mobility viroidů v rámci rostliny by mohlo mít jedině praktický význam pro studium pohybu RNA, včetně mRNA a mobilních signálů pro silencing, rostlinou.

PTGS („post-transcriptional gene silencing“; u živočichů RNA interference) je nejdůležitější molekulární obranná strategie u rostlin. Mechanismus tohoto procesu byl shrnut v několika rešerších (např. Voinnet, 2001). Základní charakteristikou je přítomnost dsRNA, jež je rozštěpena jednou z forem Dicer-like RNáz (DCL) na krátké dsRNA fragmenty s 3' převisem (siRNA). Fragment se posléze stává součástí RISC (RNA-induced silencing complex), čímž jej aktivuje. RISC svou helicázovou aktivitou dsRNA rozplete a dle templátu jednoho vlákna siRNA provádí štěpení komplementárních ssRNA v buňce. Během infekce běžným RNA virem probíhá celý proces silencingu v cytoplazmě. Jako spouštěcí signál je považována přítomnost dvouvláknového RNA meziprojektu replikace štěpeného na siRNA. Následuje specifická degradace virové (+) i (-) RNA prostřednictvím komplexu RISC.

Přítomností RdRP (RNA-dependentní RNA polymeráza) vznikají sekundární siRNA, které způsobí silencing sousedních sekvencí, např. virových genů (Hutvagner a Zamore, 2002). Silencing se jako obrana proti patogenům v rostlinných buňkách šíří také do okolních buněk (Mlotshwa *et al.*, 2002). Viroidy se také rozmnožují přes dvouvláknové RNA meziprojektu a pro obě skupiny byla potvrzena přítomnost specifických siRNA (Martínez de Alba, 2002; Papaefthimiou *et al.*, 2001). Viroidní infekce jsou však rezistentní k mechanismu silencingu.

Existuje několik možností, jakými se mohou viroidy vyhnout mechanismu silencingu: kompaktním tvarem molekuly RNA, únikem do buněčných organel nebo interakcí s hostitelskými proteiny. Jak již bylo řečeno, meziprojektu replikace viroidů se skutečně

nacházejí v jádře nebo v chloroplastech. Bylo zjištěno, že hotové cirkulární molekuly PSTVd a HSVd jsou odolné vůči štěpení cytoplazmatickým komplexem RISC (Itaya *et al.*, 2007; Gómez a Pallás, 2007). Štěpení hotových molekul možná napomáhá RdRP, která dosyntetizuje druhé vlákno aberantní molekuly RNA za vzniku dsRNA, která může být substrátem pro RISC (Tabler a Tsagris, 2004). Itaya *et al.* (2007) s použitím inhibitorů silencingu zjistili, že produkce siRNA specifických pro PSTVd probíhá nezávisle na dsRNA-dependentních drahách, probíhá tedy obdobně jako zpracování miRNA pomocí DCL. Pokud tedy vznikají siRNA, musí být štěpení viroidní molekuly probíhat pomocí DCL izoenzymu nacházejícího se v jádře u *Pospiviroidae* (Obr. 6), resp. v cytoplazmě při pohybu mezi buňkami u *Avsunviroidae*. Bylo potvrzeno, že 4 známé izoenzymy DCL (1-4) mají nukleární lokalizaci (Schauer *et al.*, 2002; Xie *et al.*, 2004), ale jejich přítomnost nestačí na potlačení infekce. Nejvýznamnějším obranným mechanismem viroidů zůstává jejich sekundární struktura (Itaya *et al.*, 2007). Viroid se stává zároveň spouštěčem, cílem i „uprchlíkem“ silencingu.

Primární interakce viroidních molekul nebo intermediárních produktů s hostitelskými faktory spouští doposud nepříliš objasněnou kaskádu, která vyúsťuje v pozorované symptomy. Místo interakce s hostitelskými proteiny byla zvažována alternativa interakce s hostitelskými RNA, interference se zpracováním rRNA, sestihem mRNA nebo sestavením 7S RNA do SRP („signal recognition particle“) (Diener, 2001). A tento mechanismus nevysvětluje odlišné symptomy způsobené PSTVd u blízce příbuzných rostlin, mohl by viroid „soutěžit“ o nukleární faktory a mít touto cestou vliv na úpravu rRNA (Qi *et al.*, 2003). Dalo by se předpokládat, že viroidy vyvolávají obecnou odpověď rostlinného obranného systému, obdobně jako další rostlinné patogeny. Analýzy mikrobiologie ukázaly vliv PSTVd infekce na celkový vzor exprese u rajčete, vedle genů obecné obrany vyvolané patogeny však odhalily změny regulace několika genů, dokonce v závislosti na kmenu PSTVd (Itaya *et al.*, 2002).

Objev, že malé antisense RNA, konkrétně miRNA a siRNA (přehledná práce viz Baulcombe, 2005; Carrington a Ambros, 2003), mohou mít regulační roli v expresi eukaryotních genů, přinesl nové hypotézy pro vysvětlení viroidní patogeneze. V těchto hypotézách se vytvářejí viroidně-specifické siRNA, které ale interagují také s náhodně komplementárními mRNA hostitelské rostliny a způsobují jejich štěpení, populaci remodelaci chromatinu a umlacení exprese. Podporou pro tyto hypotézy mohou být pokusy s expresí neúplných (a tedy neinfekčních) sekvencí PSTVd v přímé repetici nebo ve vlásence.

Vlásenkový transkript vytváří siRNA a vyvolával symptomy, kdežto u transkriptu v prímé repetici nebyla siRNA ani symptomy detekovány (Wang *et al.*, 2004). Výsledky naznačují, že na které symptomy způsobují siRNA vzniklé štěpením PSTVd, a tak by rostliny s potlačeným systémem PTGS nevykazovaly symptomy, a aby se v nich viroid mohl replikovat a síla symptomů by mohla záviset na stupni homologie mezi siRNA a prozatím blíže neurčenými geny (Tabler a Tsagris, 2004). Použitím metod mikroarray je možné identifikovat tyto geny, které specificky mění expresi v odpovědi na viroidní infekci. Dle zatím nepublikovaných výsledků, Owens *et al.* zjistili, že přibližně 10 % genů reaguje po 3 až 4 týdnech po inokulaci na viroidní infekci zvýšenou expresí, ale pouze 66 genů (<1 %) odpovídá snížením exprese (Owens, 2007). A tyto analýzy prozatím nejsou vyerpávající, pravděpodobně sehraje důležitou úlohu při mapování hostitelské odpovědi na viroidní infekci. Práce Matouška *et al.*, (Matoušek *et al.*, 2007c) však naznačuje, že spouštěcí mechanismus symptomů viroidní patogeneze by mohl být monogenního charakteru (například umlacení represoru exprese dalších TF) s neúplnou dominancí, nebo má na expresi infekce vliv genetické pozadí. Různorodost projevů pak vysvětluje zapojením transkripčních faktorů, které svojí aktivitou ovlivňují expresi dalších genů. Pro tuto hypotézu svědčí i fakt, že většina miRNA-regulovaných genů u rostlin jsou rozličné transkripční faktory (přehledná práce viz Zhang *et al.*, 2006).

V laboratoři OMG se, jak už bylo zmíněno, povedlo klonovat dva chmelové MYB faktory. Tyto faktory jsou vývojem regulovány a silně se exprimují v květech chmelu. V případě *HIMyb3* byla zjištěna zajímavá skutečnost, a to přítomnost dvou alternativních čtecích rámců, začínajících v N-terminální doméně, kódujících proteiny s délkou 269 a 265 aminokyselin (nazvány *l-HIMyb3* a *s-HIMyb3*, v uvedeném pořadí). Místní národní transformace chmelu bylo ale předmětem zkoumání účinku *HIMyb3* variant přistoupeno k transformaci jiných druhů, *A. thaliana*, *P. hybrida* a *N. benthamiana*. Zvýšená exprese obou variant čtecího rámce genu *HIMyb3* měla v heterologních systémech výrazný vliv na fenotyp transgenních rostlin. Linie *l-HIMyb3* se od divokého typu *A. thaliana* (ekotyp Columbia) lišily zejména opožděným klíčením a růstem, rostliny byly menší a poněkud bledší. Dospělé rostliny byly podobné divokému typu, a pokud byl evidentní pozdní nástup kvetení (15-20 dnů). Naopak, linie *s-HIMyb3* vykazovaly zrychlený růst již od počátku vývoje a dospělé rostliny měly zvláštní tvrný fenotyp s bočními v tvrnými generativními výhonky v úhlu kolem 90°. Fertilita nebyla přítomností transgenů příliš ovlivněna. Efekt exprese obou variant *HIMyb3* na fenotyp transformantů byl tedy různý, dalo by se říci antagonistický, a prokázalo se, že

HIMyb3 může mít vliv na morfogenezi v *A. thaliana*. Transformanti *N. benthamiana* vykazovali kromě snížené fertility až sterility nápadné morfologické odlišnosti mezi variantami *HIMyb3*, u varianty *l-HIMyb3* byl pozorován trpaslivý vzrůst a snížená apikální dominance, varianta *s-HIMyb3* měla vyšší hlavní stonek a málo dlouhých postranních větviček. Internodia byla zkrácená oproti kontrole a listy malé a úzké. Rostliny *P. hybrida* transformované *l-HIMyb3* také vykazovaly trpaslivý vzrůst a inhibici apikální dominance, avšak u *s-HIMyb3*-transformovaných rostlin byl fenotyp více vtvrdlý a podobný kontrolním rostlinám (Matoušek *et al.*, 2007a). Výsledky u dvou lilkovitých rostlin potvrzují účinnost transgenu *HIMyb3* v morfogenetických změnách, které připomínaly specifickou patogenezi vyvolanou viroidy. Existuje možnost, že zvýšená exprese tohoto transgenu způsobuje nerovnováhu v regulaci vývoje, čímž je pro transformanty toxická. Obdobný případ toxicity MYB-faktoru uvádí také Hsu *et al.* (2005) u *GhMyb7*-transgenních rostlin bavlníku. Pozorovaný vliv exprese TF *HIMyb3* na morfogenezi (Matoušek *et al.*, 2007a) a změna složení některých metabolitů u chmelu infikovaného HLVd (Adams *et al.*, 1992; Barbara *et al.*, 1990) vedly k myšlence, zda nedochází při viroidní patogenezi HSVd k expresi symptomů také cestou faktorů MYB, resp. dalších faktorů účastnících se regulace tvorby sekundárních metabolitů v chmelových hlávkách. Do této skupiny faktorů aktivovaných zejména při vývoji květu patří další TF klonované z cDNA knihovny, *HlbHLH*, *HlbZIPA* a *HlbZIP2* (nepublikováno), které byly v průběhu mé práce zkoumány pro změnu exprese v odpovědi na infekci viroidu HSVd. Projevem odlišné exprese těchto transkripčních faktorů by mohl být poznamenaný fenotyp v podobě odlišného složení sekundárních metabolitů, což bylo také předmětem zkoumání v průběhu mé práce.

2. CÍLE PRÁCE

Z důvodu podobnosti zmíněného fenotypu u transformantů *HIMyb3* připomínajícího symptomy viroidní patogeneze bylo cílem mé práce zjistit, zda nedochází i u infikovaného chmelu ke změnám v hladinách klonovaných transkripčních faktorů a k rozdílům na úrovni metabolomu. Důležitým cílem byla oprava infekčního vektoru HSVd a CPFVd, biologická infekce chmelu cv. Admiral připravenými vektory pro následná fenologická a molekulárně-genetická pozorování a srovnávací analýzy u kontrolního a infikovaného chmelu.

Pro analýzu transkripce vybraných chmelových transkripčních faktorů bylo třeba vytvořit systém hodnocení exprese pomocí citlivějších a přesnějších metod (optimalizace procedury RealTime RT-PCR) a hodnocení a srovnání exprese známých chmelových transkripčních faktorů pomocí semikvantitativních (RT-PCR) a kvantitativních metod (RealTime RT-PCR).

Dalším cílem bylo u chmelu hodnocení sekvenční homogenity nebo heterogenity transkripčního faktoru *H/bZIP2* v návaznosti na možnost existence genové rodiny a případné odhalení variability v rámci této rodiny pomocí termodynamických metod (TGGE), resp. analýza knihoven fragmentů cDNA.

3. MATERIÁL A METODY

3.1. Materiál

3.1.1. BIOLOGICKÝ MATERIÁL

Rostliny chmelu cv. Osvald v klon 72 a cv. Admiral byly pěstovány ve skleníku při teplotě $25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$, za nepřetržitého světla a dodatečného poskytování ($170 \text{ } \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ PAR) pro udržení 16-hodinového denního režimu.

3.1.2. ŽIVNÁ MÉDIA A CHEMIKÁLIE

LB médium (Luria-Bertani, 100 ml; 1 g kazein – Tryptone, 0,5 g kvasničný extrakt, 1 g NaCl, pH 7,5)

Bakteriální pěstovná (SOB médium, 1000 ml; 10 g kazein – Tryptone, 5 g kvasničný extrakt, 10 g NaCl, 15 g agaróza, pH 7,5, antibiotikum (ampicilín 200 mg/l), resp. IPTG a X-Gal přidány po sterilizaci)

Sterilizace v autoklávu nebo v tlakovém hrnci 20 minut při teplotě $120 \text{ }^\circ\text{C}$, poté médium pozvolna zchlazeno na teplotu $40\text{--}45 \text{ }^\circ\text{C}$. Posléze bylo přidáno antibiotikum.

3.1.3. ROZTOKY

Nanášecí pufr – 0,01% xylencyanolová modř, 0,01% bromfenolová modř, 30% glycerín, 100 $\mu\text{g/ml}$ EtBr, 5xTBE.

1 Kb Plus DNA Ladder (GibcoBRL)– 10 μl 10xDNA Ladder, 20 μl nanášecí pufr, 70 μl H_2O .

20xSSC	1000 ml:
3M NaCl	175,3 g NaCl
0,3M citrát sodný pH 7,0	88,2 g citrát sodný

Fenol – 500 g fenolu bylo rozpuštěno v 500 ml 0,1M Tris-báze (pH ~12,0, neupraveno). Nechal se oddělit fáze, poté bylo ovládnuto neutrální pH vodní fáze. V případě kyselého pH byla odebrána vodní fáze a znovu přidáno 500 ml 0,1M Tris.

Fenol:chloroform:IAA (25:24:1, v/v/v) 100 ml:

25 fenol	50 ml fenol (v pufovaném TE pH 8,0)
24 chloroform	48 ml chloroform
1 <i>iso</i> -amylalkohol	2 ml <i>iso</i> -amylalkohol

Dobře rozmícháno a převrstveno cca 1/3 objemu 10xTE pufru. Drženo ve tmě při 4 °C.

10x koncentrovaný PCR pufr (10xPCR) 40 ml:

100mM Tris-HCl pH 8,3	4 ml 1M Tris-HCl
500mM KCl	10 ml 2M KCl
25mM MgCl ₂	1 ml 1M MgCl ₂
0,5% Nonidet P40	200 µl Nonidet P40

10xTBE pufr 1000 ml:

1M Tris-borát pH 8,3	108 g Tris
0,88M kyselina boritá	55 g kyselina boritá
20mM EDTA	7,44 g EDTANa ₂

Roztoky pro přípravu membrán na hybridizaci (každý 200 ml):

(1) 0,5M NaOH	4 g NaOH
(2) 1M Tris-HCl pH 7,4	24,2 g Tris
(3) 3M NaCl	35 g NaCl
(4) 1,5M NaCl, 0,5M Tris	100 ml (2) + 100 ml (3)
(5) 0,15M NaCl	10 ml (3) do 200 ml roztoku
(6) 1xSSC	10 ml 20xSSC do 200 ml roztoku

Blotovací roztok 2000 ml:

0,6M NaOH	5,84 g NaOH
0,4M NaCl	46,75 g NaCl

Pre-prehybridizační pufr	1000 ml:
50mM Tris-HCl pH 8,0	6,05 g Tris
1mM EDTA	0,372 g EDTANa ₂
1M NaCl	58,44 g NaCl
0,1% SDS (w/v)	1 g SDS nebo 5 ml 20% SDS (w/v)

Deionizovaný formamid

Na 200 ml formamidu přidáno asi 3 g Amberlite (iontomni). Mícháno cca 3 hodiny, filtrováno.

100xDenhardtovo inidlo	100 ml:
2% Ficoll (w/v)	2 g Ficoll 400
2% BSA frakce V (w/v)	2 g BSA frakce V
2% PVP-40 (w/v)	2 g PVP M _r = 40000

20xSSPE	1000 ml:
3M NaCl	175,3 g NaCl
0,2M Na ₂ HPO ₄	71,6 g Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O
0,02M EDTA	7,4 g EDTANa ₂
NaOH upraveno pH na 7,4, filtrováno.	

(Pre)hybridizační pufr formamidový:	100 ml:
50% formamid (v/v)	50 ml deionizovaný formamid
1,5xDenhardtovo inidlo	1,5 ml 100xDenhardtovo inidlo
0,1% SDS (w/v)	500 µl 20% SDS (w/v)
5xSSPE	25 ml 20xSSPE
20 mg/100 ml tRNA	

Skladováno při -20 °C, použito pro použití při „Northern“ blotu při 4 °C.

Hybridizační pufr kakodylátový pro TGGE a analýzu heteroduplex – 1mM kakodylát sodný pH 6,8, 100mM NaCl, 1mM EDTA (použit jako v práci Matouška *et al.*; Matoušek *et al.*, 2000, 2001)

Příprava tRNA – 1 g kvasniční RNA (skladovat v lednici) bylo rozpuštěno za současného zahřátí na 50-60 °C v 10 ml TE pufru.

Roztok byl odstředěn.

Supernatant se fenolizoval 1:1 (v/v) směsí fenol:chloroform:IAA (25:24:1).

Přidáno 4M LiCl (1:1 v/v), RNA se umístila na 1 hodinu do ledu.

Po odstředění byl ponechán supernatant.

Promývací roztoky pro hybridizaci (2xSSC, 0,1% SDS; 1xSSC, 0,1% SDS; 0,1xSSC, 0,1% SDS)

2xCTAB pufr	200 ml:
2% CTAB (w/v)	4 g CTAB
100mM Tris-HCl (pH 8,0)	20 ml 1M Tris-HCl
20mM EDTA (pH 8,0)	8 ml 0,5M EDTANa ₂
1,4M NaCl	16,36 g NaCl
1% PVP-40 (w/v)	2 g PVP M _r = 40000

30% akrylamid (19:1)	200 ml:
28,5% akrylamid (w/v)	60 g akrylamid
1,5% bis-akrylamid (w/v)	3,15 g bis-akrylamid

Polyakrylamidový gel	50 ml, cca 10 gel (TGGE):
7M močovina	20,6 g močovina
5% akrylamid (19:1; w/v)	8,5 ml 30% akrylamid (13:1)
2% glycerín (v/v)	2 ml 50% glycerín (v/v)
0,2xTBE	1 ml 10xTBE
	doplňeno H ₂ O do objemu 50 ml

roztok byl odvědušen 5-20 minut za vakua

po použití iniciována polymerace:	3,5 µl TEMED
	25 µl 10% APS (w/v; persíran amonný)

Příprava roztoků pro barvení nukleových kyselin AgNO₃:

1) „Fixáž“	2000 ml:
-------------------	----------

10% etanol (v/v)	200 ml etanol (96%)	
	10 ml kys.octová	
2) „Vývojka“	1000 ml:	
0,375M NaOH	15 g NaOH	
2,37mM NaBH ₄	0,09 g NaBH ₄	
0,15% formaldehyd	4 ml 37% formaldehyd	
3) „Stop pufr“	pro vyvolávání – 50 ml ledová kys.octová do 1000 ml roztoku.	
4) 0,19% AgNO₃	0,855 g AgNO ₃ do 450 ml H ₂ O	
DEPC H₂O (RNase-free)	1000 ml H ₂ O	
0,02% DEPC	0,2 ml diethylpyrokarbonát	
Do 1000 ml H ₂ O bylo přidáno 0,2 ml DEPC. Nechal se inkubovat přes noc při 37 °C, posléze byl roztok zklávkován.		
5xFGB	500 ml:	2000 ml:
40mM	2,72 g	10,88 g NaOAc.3H ₂ O
Rozpustit v H ₂ O	350 ml	1400 ml (DEPC) H ₂ O
90mM MOPS-NaOH pH 7,0	10,3 g	41,2 g MOPS (C ₇ H ₁₅ NO ₄ S)
20mM EDTA pH 7,0	100 ml	400 ml 0,1M EDTA
Skladováno ve tmě při 4 °C.		
FGL	10 ml:	
50% glycerol	5 ml glycerol	
1mM EDTA pH 8,0	20 µl 0,5M EDTA pH 8,0	
0,25% bromfenolová mod		
0,25% xylencyanolová mod		
Extrakční pufr AMESS	200 ml:	
1M NaOAc pH 6,0	13,6 g NaOAc do 60 ml H ₂ O	
26mM MgCl ₂	0,48 g MgCl ₂ .6H ₂ O	
20% etanol	40 ml 96% etanol	

1M NaCl	11,6 g NaCl zvlášť rozpust no ve 40 ml H ₂ O a posléze přidáno
3% SDS	6 g SDS rozpust no v hotovém roztoku

3.1.4. POUŽITÉ KOMERČNÍ ENZYMY

Restriční endonukleázy s příslušnými pufrů: *EcoRI* (NEBuffer pro *EcoRI* 10x konc., NEB), *BamHI* (10x K buffer, Takara), *SmaI* (10x T buffer, Takara).

T4 DNA ligáza (Takara), liganční pufr (GibcoBRL)

Alkalická fosfatáza „AP from calf intestine“ (Boehringer Mannheim)

Pwo DNA polymeráza (Roche)

3.1.5. PRIMERY A DALŠÍ MATERIÁL

Pro sekvenční reakce byl používán pár primer M13F (5' GTAAAACGACGGCCATG 3') a M13R (5' GGAAACAGCTATGACCATG 3').

Pro amplifikaci 218 bp fragmentu *HlbHLH* pro analýzu exprese pomocí RT-PCR byl použit pár primer *hopbHLH* PCR-R (5' TTTACTCGGCGGAGCCCTAG 3') a *hopbHLH* RT-R (5' GGCATTGCAGCTTCCTCCTC 3').

Pro amplifikaci 301 bp fragmentu *HlbZIPA* pro analýzu exprese pomocí RT-PCR byl použit pár primer R-PCR *HlbZip* (5' AGTGGTACTTCGGGCAGAGG 3') a R-RT *HlbZip* (5' CGTGCTTTCTCATCCTCCAG 3').

Pro amplifikaci 200 bp fragmentu *HlbZIP2* pro analýzu exprese pomocí RT-PCR a RealTime RT-PCR, pro TGGE a analýzu heteroduplex byl použit pár primer R-*bZIP2*-PCR (5' TCACTCTGATCGACCCGAC 3') a R-*bZIP2*-RT (5' AAGCAGAAAGTCCTCGAGC 3').

Pro amplifikaci 303 bp fragmentu *HIMyb1* pro analýzu exprese pomocí RT-PCR byl použit pár primer *HIMyb1* PCR-R (5' GGCTCGGTTCTCACCATTG 3') a *HIMyb1* RT-R (5' CCAGTGCCAGACCATGAAG 3').

Pro amplifikaci 201 bp fragmentu *HIMyb3* pro analýzu exprese pomocí RT-PCR byl použit pár primer C5 M3PCR (5' GACGTCAACAGCAAGCAATTC 3') a C3 M3RT (5' GGCCTCTGACGTGTCTGATG 3').

Pro amplifikaci 301 bp cDNA 7SL RNA (konstitutivní exprese, Matoušek *et al.*, 1999) v analýzách RT-PCR a RealTime RT-PCR byly použity primery (5' TGTAACCC-AAGTGGGG 3') a anti- (5' GCACCGGCCCGTTATCC 3').

Pro klonování cDNA HSVd a CPFVd a pro detekci pozitivních klonů s inzertem viroidní sekvence byly použity primery HSVde I (5' aA₁₂GAATTCCCCAGAGGGGGCTCA-3') a HSVde II (5' aG₅GAATTCTCGAGTTGCCGC3')

DNA marker (1kb DNA ladder – GibcoBRL)

RNA marker (RNA Markers 9PIG319A – Promega)

Radioizotop Redivue ⁻[³²P]dCTP (3,000 Ci/mmol) (Amersham)

Nylonová membrána s upraveným nábojem, velikost pórů 0,2 μm (Sigma)

RNA membrána (Biodyne A Membrane 0,2 μm, PALL)

Filtrovací papír 3MM (Whatman)

Kompetentní bakterie (DH5⁺, XL2-Blue – Stratagene)

3.2. Metodické postupy

V následujících postupech byly dodržovány bezpečnostní předpisy práce s vysoce infekčním materiálem a GMO, bakteriální suspenze a roztoky s nukleovými kyselinami byly inaktivovány v 50% roztoku SAVO (Bochemie), veškerý odpad a zbytky rostlinných pletiv byly klávnány.

3.2.1. METODY AMPLIFIKACE A PŘÍPRAVY VZORKŮ PRO SEKVENACI PCR

PCR (angl., „Polymerase Chain Reaction“) s využitím *Taq* polymerázy byla použita k selekci klonů pozitivních po hybridizaci s cDNA sondou pro HSVd pro přítomnost inzertů s dle razem na hledání dimerických inzertů.

Na ledu za sterilních podmínek bylo připraveno 100 μl reakční směsi:

10 μl pufru (10xPCR)

8 μl dNTP (každý 2,5mM)

2x1 μl primer HSVde I a HSVde II (každý 100mM)

2 U (1,2 μl) *Taq* polymerázy

objem doplněn H₂O

templátem byl sterilní špičkou ponesený materiál bakteriálních kolonií

Teplotní a časový profil PCR reakce (pokud není uvedeno jinak):

1 x 2 min 94 °C (úplná denaturace templátové DNA)

35 x [30 sec 94 °C (denaturace dsDNA) – 30 sec 58 °C (zachycení primer („annealing“)) – 60 sec 72 °C („elongace“, reakce *Taq* polymerázy)]

Polymeráza *Taq* byla dále použita v reakcích smích PCR (50 µl) pro amplifikaci cDNA fragmentu klonu TF *H/bZIP2* pro TGGE a analýzu heteroduplex (viz níže). Použité primery: R-bZIP2-PCR a R-bZIP2-RT

Teplotní a časový profil této PCR reakce:

1 x 2 min 94 °C; 35 x [30 sec 94 °C – 30 sec 57,5 °C – 40 sec 72 °C]

Reamplifikace cDNA fragmentu viroidu a TF byla provedena za použití „high-fidelity“ *Pwo* polymerázy (Roche).

Gradientová PCR

Obdoba PCR provedená na termocykleru T-Gradient Thermoblock (Biometra), nezbytná pro ověření optimální teploty „annealingu“. Metoda sloužila k optimalizaci reakcí RT-PCR a RealTime RT-PCR pro přesnou analýzu exprese jednotlivých zkoumaných transkripčních faktorů chmelu.

Reakce probíhala v 50 µl, reakční směs má následující složení:

5 µl 10xPCR pufr

4 µl dNTP (každý 2,5 mM)

2x0,5 µl primery (konc. 100 mM, kap. 3.1.5.)

1 U (0,6 µl) *Taq* polymeráza

1 µl templát (plazmid nebo cDNA, konc. 100 pg/µl)

38,4 µl H₂O

Teplotní a časový profil gradientové PCR reakce:

1 x 2 min 94 °C; 28 x [30 sec 94 °C – 30 sec 55 °C ±5 °C – 40 sec 72 °C]

RT(reverse transcriptase)-PCR

Jednokroková reakce s použitím kitu Titan One Tube RT-PCR System (Roche), obsahuje reverzní transkriptázu AMV a DNA dependentní DNA polymerázy *Taq* a *Tgo*, která

je „high-fidelity“. Tato reakce byla použita pro klonování viroidů HSVd a CPFVd, pro jejich detekci v rostlinách bez symptomů a pro semikvantitativní analýzu exprese chmelových transkripčních faktorů.

Složení reakční směsi (50 µl):

Mix I: 2,5 µl DTT; 4 µl dNTP (každý 2,5 mM); 2x1,5 µl primeru konc. 100 mM

vzorek: 15,5 µl obsahujících 2 µg RNA izolované pomocí reagensu Concert (viz níže) z infikovaného chmelu cv. Oswald v klon 72, pro semikvantitativní RT-PCR použito 2,5 µg RNA izolované pomocí reagensu Concert a purifikované přes kolonky QIAGEN v etn. aplikaci DNázy (kap. 3.2.2.)

Mix II: 10 µl 5x RT-PCR reakčního pufru; 15 µl H₂O; 1 µl směsi enzymů

Složení „blanku“: 5 µl H₂O + 7,5 µl Mix I + 12,5 µl Mix II.

Teplotní a časový profil PCR reakce (pro amplifikaci viroidů HSVd):

1 x 30 min 48 °C (reverzní transkripce)

1 x 2 min 94 °C; 35 x [30 sec 94 °C – 30 sec 58 °C – 50 sec 68 °C]

Pro semikvantitativní analýzu exprese TF chmelu byl použit obdobný teplotní a časový profil PCR reakce, ale v gradientu teplot „annealingu“, optimalizovaných pro jednotlivé primery (viz kap. 4.3.).

Real-Time RT-PCR

Reakce pro kvantitativní stanovení a srovnání exprese chmelových TF *HlbZIPA* a *HlbZIP2* v kontrolních a HSVd-infikovaných rostlinách. Dvoukroková reakce s použitím reverzní transkriptázy StrataScript (Stratagene, 600085) a DyNAmo HS SYBR Green qPCR Kit (Finnzymes). Jako vzorek byla použita RNA purifikovaná přes kolonku QIAGEN v etn. inkubaci s DNázou (kap. 3.2.2.). Pro RealTime cDNA amplifikaci byly vybrány unikátní fragmenty délky kolem 200 bazí, aby se předešlo amplifikaci homologních sekvencí, tyto fragmenty jsou vymezeny vždy párem primerů označených -PCR a -RT (např. R-PCR *HlbZip* a R-RT *HlbZip* pro TF *HlbZIPA*, kap.3.1.5.), pouze v případě 7SL RNA jsou tyto primery označeny a anti-.

Složení reakční směsi reverzní transkripce (20 µl):

2,5 µl templát (2,2 µg RNA)

1 µl specifický primer (konc. 100 mM; označení -RT, nebo anti-)

1 µl reverzní transkriptáza

2 µl 10x pufr StrataScript

2 µl dNTP (každý 2,5 mM)

11,5 µl H₂O

Reverzní transkripce probíhala 90 minut při 44 °C, denaturace vzorku probíhala 2 minuty při 95 °C.

Jednovláknová cDNA vzniklá jako produkt RT reakce byla použita jako templát RealTime amplifikace (viz níže) nebo skladována při -70 °C.

Složení reakční směsi RealTime PCR amplifikace (25 µl):

5 µl templát (cDNA, množství odpovídající 0,55 µg RNA)

2x1 µl primery (-PCR a -RT, resp. a anti-)

12,5 µl master mix se SYBR Green

5,5 µl H₂O

Standardy byly připraveny z plazmidové DNA: klonované cDNA fragmenty odpovídajících TF a 7SL v plazmidu pCR-Script. Plazmidy o koncentraci 100 ng/µl bylyředny v desítkové řadě (5 µl DNA do 45 µl H₂O) a pro kalibrační křivku byly použity standardy o koncentracích 1 ng/µl až 0,01 pg/µl.

Teplotní a časový profil reakce:

1 x 95 °C; 36 x [30 sec 95 °C – 45 sec 56 °C – 30 sec 74 °C]

detekce disociace křivky (průběžné měření fluorescence za postupného zvyšování teploty 0,1 °C/sec)

3.2.2. METODY IZOLACE NUKLEOVÝCH KYSELIN

Izolace plazmidu pomocí kitu (QIAGEN Plasmid Mini/Midi Kit)

Bakterie z kultury (cca 20-25 ml) byly odstředeny 3-5 minut při 8000 ot.min⁻¹.

Sediment byl resuspendován ve **500 µl P1** s RNázou A.

Přidáním **550 µl P2** dochází k lýzi bakterií a vylití buněčného obsahu. Zkumavka se několikrát lehce obrátila a nechala stát cca 10 minut v ledu.

Přidalo se **600 µl P3**, zkumavkou se několikrát rychleji převrátilo. Čekalo se 5-10 minut. Dochází k neutralizaci, vzniká bílá sraženina – buněčný odpad včetně chromozomální DNA, plazmid v roztoku acetátového pufru.

PURIFIKACE PES KOLONKY QIAGEN-TIP (20 nebo 100)

Po centrifugaci 25 minut při 15500 ot.min⁻¹ byl supernatant 2x aplikován na ekvilibrovanou kolonku (ekvilibrace 3 ml roztoku QBT). Poté došlo k promytí roztokem QC (4 ml) a následně eluce roztokem QF (800 µl) do izopropanolu (500 µl). Vzorek se promíchal a nechal stát 1 hodinu při pokojové teplotě.

Vzorek byl centrifugován 30 minut při 13500 ot.min⁻¹. Sediment byl resuspendován ve 100 µl 0,3M octanu sodného a plazmidová DNA byla sražena aplikací 300 µl ethanolu. Nechal se srážet 30 minut při teplotě -70 °C.

Vzorek byl centrifugován 30 minut při 13500 ot.min⁻¹. Sediment byl vysušen ve vakuovém koncentrátoru a rozpuštěn v H₂O.

V případě většího množství kultivovaných bakterií (50 – 200 ml) bylo použito úměrně větší množství roztoků P1, P2 a P3. V takovém případě byla použita velká kolonka (QIAGEN-Tip 100). Postup byl obdobný, ale ekvilibrace probíhala použitím 10 ml roztoku QBT, promytí použitím 10 ml QC a eluce 5 ml QF do 3 ml izopropanolu. Sediment byl resuspendován ve 200 µl 0,3M octanu sodného a plazmidová DNA byla sražena aplikací 500 µl ethanolu.

Izolace RNA pomocí extrakčního pufu Concert™ (Plant RNA Purification Reagent, Invitrogen); ze 100 mg rostlinného pletiva

100 mg rostlinného pletiva bylo homogenizováno v tekutém dusíku a přeneseno do zkumavky s 500 µl extrakčního pufu Concert, zvortexováno a necháno 5 min ležet při pokojové teplotě.

Pak byl vzorek centrifugován 3 minuty při 15000 ot.min⁻¹ a supernatant byl pipetován do zkumavky se 100 µl 5M NaCl.

Po vortexování bylo přidáno 200 µl chloroformu, směs se zvortexovala a centrifugovala 10 minut při 15000 ot.min⁻¹.

400 µl supernatantu bylo pipetováno do zkumavky se 400 µl izopropanolu, směs se zvortexovala a nechala stát 10 min při pokojové teplotě.

Poté byl vzorek centrifugován 20 minut při 15000 ot.min⁻¹ při 4 °C. Po centrifugaci byl opatrně odstraněn supernatant a sediment byl vysušen při pokojové teplotě.

Suchý sediment byl uchováván při -80 °C, pak dle potřeby rozpuštěn ve vodě.

Purifikace RNA přes kolonku RNeasy Plant Total RNA kitu v etn. zpracování DNázou (QIAGEN)

K alikvotám DNázy (cca 10 µl) se přidalo 70 µl RDD pufru a směs se lehce promíchala.

Suchý sediment RNA byl rozpuštěn ve 100 µl H₂O nasáváním pipetou.

Bylo přidáno 350 µl RLT (RNeasy Plant Mini Kit).

Vzorek byl zvortexován a umístěn do ledu.

Ke vzorku bylo přidáno 250 µl etanolu (96 % v/v), směs se lehce promíchala pipetou a byla držena při pokojové teplotě.

Vzorek byl aplikován do označených kolonek, nechal se protéct přes kolonku (15 sekund na stolní centrifuze). Proteklá tekutina se vylila.

DNáza byla promíchána pipetou a celý objem se opatrně a bez doteku aplikoval na fritu.

Kolonka se centrifugovala 3 sekundy na stolní centrifuze (DNáza se vsákla do frity) a posléze se nechala stát 15 minut při teplotě nejméně 25 °C (25-30 °C).

Vzorek v kolonce byl promyt 350 µl RW1 pufru. Kolonka byla chvilku centrifugována, proteklá kapalina se vylila.

Bylo přidáno 500 µl RPE s etanolem, centrifugováno, proteklá kapalina se vylila. Další 500 µl RPE bylo aplikováno na kolonku a posléze byla frita vysušena centrifugací 3 minuty při 14000 ot.min⁻¹. Z obruby frity byl odpipetován zbytek pufru.

Kolonka se vložila do sterilní popsané zkumavky a RNA byla eluována aplikací 50 µl H₂O, centrifugací na stolní centrifuze a posléze 1 minutu při 14000 ot.min⁻¹ při 4 °C.

Izolace fragmentů DNA z gelu, metoda pomocí QiaQuick Gel Extraction Kit-u (QIAGEN)

Metoda byla použita pro izolaci specifických fragmentů z agarózového gelu, tj. izolace amplifikované cDNA HSVd, po RT-PCR kvůli klonování do plazmidu pCR-Script, izolace *EcoRI* štěpeného HSVd a CPFVd v plazmidu pCR-Script a izolace *EcoRI* štěpeného a defosforylovaného recipientu pUC19 (připrava inzerčního vektoru), izolace cDNA fragmentů *HlbZIPA*, *HlbZIP2*, *HIMyb1* a *HIMyb3* po RT-PCR kvůli klonování do plazmidu pCR-Script (hodnocení sekvenční variability).

Na každou váhovou jednotku (mg) gelu bylo přidány 3 objemové jednotky (μl) pufru QG, gel se nechal rozpustit v tepelném bloku při $50\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Obsah ve zkumavce byl zvortexován.

Byla přidána objemová jednotka (μl) izopropanolu, vzorek se lehce promíchal.

$650\text{ }\mu\text{l}$ vzorku bylo aplikováno na kolonku a odstředeno na stolní centrifuzě ($8000\text{ ot.}\cdot\text{min}^{-1}$). Proteklý roztok byl opět aplikován na kolonku a odstředěn. Totéž bylo opakováno se zbytkem vzorku až do jeho vyerpání.

Kolonka byla (pomocí centrifugace) promyta $500\text{ }\mu\text{l}$ pufru QG smíchaného s izopropanolem (3:1, v/v), vysušena 1 minutu při $13500\text{ ot.}\cdot\text{min}^{-1}$ a posléze dvakrát promyta $650\text{ }\mu\text{l}$ vymraženého pufru PE.

Kolonka byla vysušena centrifugací 3 minuty při $13500\text{ ot.}\cdot\text{min}^{-1}$.

Pro eluci byla na kolonku aplikováno $50\text{ }\mu\text{l}$ elučního pufru EB předehátého na $50\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.3. METODY POUŽITÉ KE KONSTRUKCI INFEKČNÍHO VEKTORU

Restriční analýza

Složení reakční směsi pro přípravu recipientu pUC19:

$5\text{ }\mu\text{l}$ restričního pufru (NEBuffer pro *EcoRI*, 10x konc., NEB)

$8\text{ }\mu\text{g}$ pUC 19

EcoRI (60 U; NEB)

H_2O do objemu $15\text{ }\mu\text{l}$

Inkubováno přes noc při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. *EcoRI* byla po reakci inaktivována fenolem:chloroformem:IAA (25:24:1), plazmid pUC19 byl posléze přesrážen ethanolem za podkyselení octanem sodným ($300\text{ }\mu\text{l}$: $10\text{ }\mu\text{l}$ ethanol:3M NaOAc). Sediment byl resuspendován ve $43\text{ }\mu\text{l}$ H_2O .

K vyštenění fragmentu viroidu z plazmidu pCR-Script byla použita restriční endonukleáza *EcoRI* ve $100\text{ }\mu\text{l}$ reakční směsi:

$10\text{ }\mu\text{l}$ restričního pufru (NEBuffer pro *EcoRI*, 10x konc., NEB)

$25\text{ }\mu\text{l}$ (cca $100\text{ }\mu\text{g}$) DNA

100 U *EcoRI* (NEB), po dvou hodinách reakce přidáno dalších 40 U

H_2O do objemu $100\text{ }\mu\text{l}$

Restriční analýza za účelem zjištění orientace dimerického inzertu v infekčním vektoru byla provedena v reakční směsi:

2 µl restričního pufru (10x K pro *Bam*HI (Takara), NEBuffer pro *Eco*RI, 10x konc. (NEB), 10x T pro *Sma*I (Takara))

1 µg vektoru (plazmid)

restriční endonukleáza (15 U *Bam*HI (Takara), *Eco*RI (NEB) nebo *Sma*I (Takara))

H₂O do objemu 20 µl

Inkubováno 1 hodinu při teplotě, která je optimální pro aktivitu enzymu (37 °C pro *Bam*HI a *Eco*RI, 25 °C pro *Sma*I). Analyzováno pomocí agarózové elektroforézy ve 2% gelu.

Defosforylace pomocí alkalické fosfatázy

Složení reakční směsi (50 µl):

5 µl 10x AP pufr („dephosphorylation buffer“, Boehringer Mannheim)

43 µl *Eco*RI štěpené DNA (pUC19, viz výše)

2 µl (2U) AP na každých 2,5 µg DNA

Reakční směs byla inkubována 30 minut při teplotě 37 °C.

Alkalická fosfatáza byla inaktivována fenolem:chloroformem:IAA (25:24:1), supernatant byl separován pomocí agarózové elektroforézy. Recipient byl izolován z gelu (kap. 3.2.2.).

Ligace a použité metody klonování

Pomocí enzymu ligázy byly pro štěpené fragmenty cDNA vkládány do linearizovaného plazmidu. Reakční směs pro tuto reakci měla objem 20 µl, obsahovala liganí pufr (5x koncentrovaný „T4 DNA ligase buffer“, Takara), T4 DNA ligázu (1 µl, Takara), fragment, který byl klonován, a plazmid. Inkubovalo se přes noc při 15-20 °C.

Pro **ligaci s indukci dimeru HSVd** byl použit následující postup (20 µl):

Exces inzertovaného fragmentu (cca 10x, tj. 1 µg) byl smíchán s liganím pufr (2 µl „T4 DNA ligase buffer“, Takara), 4 µl 25% PEG 6000 a 1 µl (350 U) T4 DNA ligázy (Takara).

Reakční směs byla inkubována 30 minut při 16 °C.

Poté bylo přidáno 100 ng defosforylovaného recipientu (pUC19) a 1 µl (350 U) T4 DNA ligázy.

Inkubovalo se nejmén 14 hodin při teplotě 18 °C. Poté byla teplota zvýšena na 25 °C a reakce probíhala další 4 hodiny.

Po proběhnutí reakce byla ligáza inaktivována 10 minut při teplotě 60 °C, po inaktivaci byla reakce nechána cca 1 minutu pozvolna vychladnout při pokojové teplotě, aby nedošlo k denaturaci DNA.

3.2.4. BIOLISTICKÁ INOKULACE

Byl použit systém Helios Gene Gun System (Biorad), postup dle návodu výrobce a upraven pro rostlinná pletiva (Hämäläinen *et al.*, 2000), provedeno dle postupu uvedeného v práci Matouška *et al.* (Matoušek *et al.*, 2004). Použitá koncentrace PVP byla 0,05 mg/ml 99,8% ethanolu. Váha zlatých mikroprojektilů (MLQ – microcarrier loading quantity) byla udržována na 0,5 mg / náboj, tzn. 25 mg projektilů na standardní délku trubice. Vzdálenost mezi nástavcem pistole a listem byla 0 cm. Množství DNA na projektily bylo 0,19 µg/mg. Byly použity projektily o průměru 1 µm, tlak hélia byl nastaven na 150 PSI.

Ve zkratce, zlaté projektily byly resuspendovány v 0,025M spermidinu a krátce sonikovány. 50 µl vzorku DNA bylo přidáno ke 100 µl suspenzi projektilů, vortexováno a sonikováno.

DNA byla srážena spolu s projektily postupným přidáváním 100 µl 1M CaCl₂ za stálého míchání. Suspenze se nechala stát 5 minut při pokojové teplotě a 5 minut v ledu.

Posléze byly projektily s navázanou DNA krátce centrifugovány a třikrát promyty 1 ml čistého ethanolu, než byly resuspendovány v PVP/ethanolu. Suspenze byla následně použita pro obalení trubice dle návodu výrobce.

3.2.5. METODY MOLEKULÁRNÍ HYBRIDIZACE, „NORTHERN“ BLOT A DOT BLOT

Příprava membrán na hybridizaci

Bakteriální klony byly aplikovány na membránu typu N0144 (nylonová membrána s upraveným nábojem, 0,45 µm průměr pórů, Sigma-Aldrich) a kultivovány na Petriho misce s bakteriální půdou (SOB) přes noc při 37 °C.

Druhý den se membrána postupně inkubovala (koloniemi nahoru) na filtračních papírech nasáknutých roztoky: 0,5M NaOH (10 minut), 1,0M Tris-HCl, pH 7,4 (5 minut), 1,5M NaCl, 0,5 M Tris (10 minut); při snímání membrány z nasáklých filtračních papírů se

tato lehce vysušila dotykem (spodní strany) na suchý filtrační papír a posléze se umístila do následujícího roztoku.

Po inkubaci ve stejném roztoku se membrána umístila mezi dva suché filtrační papíry a mírným tlakem byl odstraněn buněný materiál. Membrána se opatrně pinzetou odlepila od filtračního papíru a nechala se dokonale uschnout na vzduchu.

Vysušená membrána se vkládala do roztoku 1xSSC a nechala se inkubovat 15 minut. Membrána se následně umístila do první misky s chloroformem, inkubovala se 1-2 minuty při pomalém kroužení. Postup se opakoval také ve druhé a třetí misce s chloroformem (odlišné membrány od neistot). Membrána se posléze propláchl v H₂O (až do odpaření zbytků chloroformu). Nakonec se membrána inkubovala 20-30 minut v roztoku 0,15M NaCl.

Membrána se vysušila mezi dvěma suchými filtračními papíry. Suchá membrána byla ozářena UV zářením (120 mJ/cm²) a zapečena po dobu 20 minut při 80 °C. Membrána byla zatavena do mikroténového sáčku a do použití skladována při 4 °C.

Před hybridizací se membrána nechala inkubovat v (pre-)prehybridizačním pufru za stejných podmínek jako při následující hybridizaci po dobu minimálně 90 minut (tzn. 42 °C pro DNA:DNA hybridizaci, 50 °C pro DNA:RNA hybridizaci, pokud není uvedeno jinak). Inkubace v preprehybridizačním pufru s vysokým obsahem NaCl a SDS slouží k odstranění neistot; inkubace v prehybridizačním pufru s obsahem bílkovin a tRNA slouží k vysycení volných vazebních míst na membráně, kvůli snížení pozadí.

„Northern“ blot

V případě „Northern“ blotu pro detekci viroidů byly vzorky připraveny extrakcí RNA pomocí reagensu Concert (Invitrogen; kap. 3.2.2.) bez následné purifikace RNA.

Byly připraveny alikvoty o objemu 4,5 µl obsahující 15 µg vzorku RNA

Vzorky a molekulární RNA marker (3 µl RNA Markers 9PIG319A – Promega, 1,5 µl (DEPC) H₂O) byly k připraveny nanesení následujícím způsobem, přidáním:

2 µl 5xFGB („formaldehyde gel-running buffer“), promícháno pipetou.

3,5 µl 37% formaldehydu, promícháno.

10 µl deionizovaného formamidu, vzorek byl lehce vortexován a krátce centrifugován.

Vzorek byl denaturován 15 minut ve vodní lázni při 65 °C, posléze rychle umístěn do ledu. Před nanášením bylo přidáno 2 µl FGL pufru.

ELEKTROFORÉZA VE FORMALDEHYDOVÉM DENATURAČNÍM GELU:

Byl připraven 1,6% agarózový gel, 2,16 g agarózy (Sea-Kem) bylo rozpuštěno v 84 ml H₂O a přivedeno k varu.

Roztok byl ochlazen na cca 60 °C, bylo přidáno 24 ml 5xTBE, promícháno, přidáno 24 ml formaldehydu, promícháno kroužením a gel byl okamžitě nalit do elektroforetické formy. Nechal se tuhnout nejméně 20 minut při 4 °C.

Před aplikací vzorku byla provedena „předelektroforéza“ po dobu 5 minut a více při napětí 80 V. Ke připravenému vzorku bylo přidáno 2 µl FGL nanášecího pufru, jak je uvedeno výše. Bezprostředně poté byly na gel aplikovány vzorky.

Elektroforéza byla prováděna za pokojové teploty po dobu 4 hodin, při napětí 80 V. Bromfenolová modř byla cca 2-3 cm od levého okraje gelu.

PŘENOS NA MEMBRÁNU:

Po elektroforéze byla část gelu s RNA markerem oddělena od zbytku vzorku a gel byl 3x po dobu 10 minut proplachován DEPC-ošetřenou H₂O z čího vodu odstraní zbytek formaldehydu. Část gelu s RNA markerem byla přímo obarvena EtBr.

RNA marker byl barven 1-2 hodiny v cca 80 ml H₂O s přidáním EtBr (15 µl zásobního roztoku), průběh byl stav obarvení kontrolován na transiluminátoru. Poté se přebytečný EtBr vyplavil inkubací gelu v H₂O (2-3 hodiny, opět byl průběh kontrolován). Obarvený RNA marker byl zdokumentován v mikrofotografii.

Gel se ukládal na mřížku z papíru 3MM Whatman smíšeného 20xSSPE, jež má kontakt s rezervoárem stejného pufru.

Na gel se aplikovala RNA membrána (Biodyne A Membrane 0,2 µm, PALL) a 3 ks 3MM Whatman papíru, smíšeného 20xSSPE. Membrána se přilepila suchým filtračním papírem, buničitou vatou a zatížila se cca 0,5kg závaží na skleněné destičce. Blot byl odizolován proti odpařování pufru potravinovou fólií.

Blotování probíhalo přes noc, nejméně však 16 hodin, za pokojové teploty.

Membrána nebyla posléze inkubována v žádném pufru, ale byla přímo iluminována UV (120 mJ/cm²) a zapečena 20 minut při 80 °C.

V případě detekce viroidů se hybridizovalo ve formamidovém pufru při 50 °C s cDNA sondou HSVd se specifickou inkorporovanou aktivitou 7,3.10⁶ CPM/ml sondy. Odmýváním pozadí s nejvyšší „stringencí“ probíhalo 5 minut v roztoku 0,1xSSC, 0,1% SDS T=50 °C.

Extrakce nukleových kyselin z testovaných rostlin pro dot blot

(Palukaitis *et al.*, 1987)

Bylo odebráno 300 mg listů ze všech částí rostliny, pokud není uvedeno jinak.

Do této misky bylo přidáno trochu písku, navážené pletivo a 450 µl roztoku AMESS. Po homogenizaci pletiva bylo do misky přidáno 600 µl směsi chloroform:iso-amylalkohol (24:1 v/v)

Po homogenizaci byl vzorek přidán do označené zkumavky.

Ke vzorku byl přidán stejný objem (1:1) roztoku 2:3 formaldehyd:20xSSC, (v/v).

Teplotně před denurací byl vzorek vortexován. Denaturace probíhala 15 minut při teplotě 65 °C v topném hnízdě, ihned poté byl vzorek uložen do ledu.

Dot blot probíhal v roztoku 1xSSC (7,5ml 20xSSC do 142 ml H₂O)

Porézní „spacer“ se umístil na gumové těsnění v komůrce.

Na „spacer“ se umístila RNA membrána (Biodyne A Membrane 0,2 µm, PALL) namořená v 1xSSC.

Membrána byla přeložena horní destičkou s otvory pro nanášení vzorků.

Množství nanášeného vzorku záviselo na odhadované infikovanosti rostliny, obvykle se nanášel objem v rozmezí 40 až 80 µl.

Roztok byl blotován za mírného podtlaku nejvíce 20 kPa.

Suchá membrána byla iluminována UV zářením (120 mJ/cm²) a zapečena po dobu 20 minut při 80 °C. Membrána byla až do použití skladována při 4 °C.

Hybridizace probíhala při teplotě 55 °C s cDNA sondou HSVd se specifickou inkorporovanou aktivitou 7,3.10⁶ CPM/ml sondy. Finální promývání probíhalo 10 minut v 0,1x SSC, 0,1% SDS T=60 °C.

Příprava sondy (Amersham Rediprime II Random Prime Labelling System, GE Healthcare)

Při manipulaci s radioaktivním materiálem je nutné dodržovat bezpečnostní předpisy.

DNA templát byl rozpuštěn v 1xTE pufru (10mM Tris-HCl pH 8,0, 1M EDTA) do výsledné koncentrace 2,5-25 ng na objem 45 µl reakční směsi.

Templát byl denurován ohříváním na 95-100 °C po dobu 2 minut.

Reakční směs se prudce zchladila v ledu po dobu alespoň 5 minut.

Templát byl následně aplikován do alikvoty Amersham Rediprime II Random Prime Labelling System, inkubován několik minut na ledu pro hydrataci reakční směsi a posléze rozmíchán.

Bylo přidáno 5 μ l dCTP (s radioaktivním izotopem $^{-}[^{32}\text{P}]\text{dCTP}$) „Redivue“ (Amersham). Reakční směs se nechala inkubovat ve vodní lázni 60 minut při 37 °C.

Po ukonění značení byly změny charakteristiky sondy, [CPM] – „Counts Per Minute“ a procento inkorporace (scintilační počítač LS7000, Beckman). Na DEAE celulózu se aplikoval 1 μ l připravené sondy a nechala se ve scintilační sklenici oschnout. Po přidání 2-3 ml 0,5M Na_2HPO_4 byla na scintilačním počítači odečtena aktivita sondy – hodnota korekce záření [CPM]. Pro celkovou aktivitu byly získané hodnoty vynásobeny 50 (celkový objem sondy). Ve scintilační sklenici se dvakrát vymyl roztok Na_2HPO_4 a aktivita byla opět změněna. Z poměru prvního a druhého měření bylo zjištěno procento inkorporace.

Použitá sonda pro „Northern“ blot: cDNA sonda HSVd měla specifickou inkorporovanou aktivitu $7,3 \cdot 10^6$ CPM/ml sondy.

Použitá sonda pro hodnocení sekvenční variability cDNA fragmentu klonu TF (hybridizace v bakteriích): cDNA sonda *H/bZIP2* měla specifickou inkorporovanou aktivitu $2 \cdot 10^6$ CPM/ml sondy.

Pro použití při hybridizaci byla sonda denaturována 2 minuty při 95-100 °C a poté prudce ochlazená.

Hybridizace

Membrána byla po prehybridizaci přenesena do prvního (pre)hybridizačního pufru, do kterého byla posléze přidána radioaktivní sonda.

Inkubace probíhala v hybridizéru přes noc při teplotě jako u prehybridizace (42 °C nebo 50 °C, pokud není uvedeno jinak).

Po hybridizaci byl zbytek sondy na membráně postupně omýván v roztocích s rostoucí vymývací schopností („stringencí“):

2xSSC, 0,1% SDS, T=25 °C;

1xSSC, 0,1% SDS, T=50 °C;

Za souběžné kontroly radioaktivního signálu pomocí ručního detektoru (Alpha-Beta-Gamma – Sonde 6150 AD17, Automess) se membrána v každém roztoku omývá 10 minut,

dle potřeby, resp. dle intenzity záření, které membrána vyzařovala, bylo pozadí odmyváno následovně :

V případě detekce viroidů se hybridizovalo ve formamidovém pufru při 50 °C s cDNA sondou HSVd. Odmyváání pozadí s nejvyšší „stringencí“ probíhalo 5 minut v roztoku 0,1xSSC, 0,1% SDS T=50 °C.

Hybridizace v bakteriích pro selekci cDNA fragmentů klonů TF *HtbZIP2* probíhala ve formamidovém pufru při 42 °C s cDNA sondou *HtbZIP2*. Odmyváání pozadí s nejvyšší „stringencí“ probíhalo 10 minut v roztoku 0,1xSSC, 0,1% SDS T=60 °C.

Omytá membrána byla osušena, zatavena do mikroténového sáčku a exponována v kazetě pro detekci radioaktivního signálu (Storage Phosphor Screen, Molecular Dynamics). Výsledek byl vyhodnocen pomocí skenovacího přístroje Typhoon Scanner 9410 (Amersham Biosciences); data byla zpracována v programu ImageQuaNT verze 4.2 (Molecular Dynamics).

3.2.6. METODY SEPARACE A ANALÝZY NUKLEOVÝCH KYSELIN V GELECH

Elektroforéza nukleových kyselin v agarózovém gelu

Metoda slouží k rozdělení fragmentů DNA podle jejich délky, v hustém prostředí gelu se delší fragmenty pohybují pomaleji. Pro analýzu dlouhých fragmentů se používají řídké gely (0,6-0,7%), pro krátké fragmenty středně husté gely (0,7-1%), pro fragmenty 1kbp a kratší husté gely (1-2%).

Roztok o požadované koncentraci agarózy v 1xTBE byl přiveden k varu. Po ochlazení na teplotu cca 40-45 °C byl přidán EtBr v množství 1,7 µl zásobního roztoku na 100 ml gelu (konečná koncentrace 250 ng/ml).

Gel byl nalit do elektroforetické vany a po ztuhnutí byl vložen do elektroforetického tanku a zalit pufrům 1xTBE.

Do jamek po vyndání hřebene byly nanášeno požadované množství vzorku s nanášecím pufrům (4:1 vzorek:pufr, v/v; viz kap.3.1.3.).

Tank byl připojen ke zdroji jednosměrného napětí. Vhodné napětí bylo vybráno v závislosti na délce zkoumaných fragmentů. Elektroforézu probíhala, dokud nedošlo k oddělení sledovaných fragmentů. Analyzováno na UV transiluminátoru (Chromato-Vue TM-36, UVP) při vlnové délce 302 nm.

TGGE sm si fragment

Pro analýzu cDNA *H/bZIP2* byly použity metody TGGE a analýza heteroduplex dle Matouška *et al.* (Matoušek *et al.*, 2000, 2001). Heteroduplexy byly připraveny hybridizací cDNA amplifikátů se standardy.

Vzorkem byl specifický PCR produkt smíšeného plazmidu izolovaného z banky pozitivních klonů v případě TGGE, resp. PCR bakteriálních kolonií v případě analýzy heteroduplex. PCR produkt byl fenolizován kvůli inaktivaci polymerázy *Taq*. K amplifikaci fragmentu *H/bZIP2* byly použity primery R-bZIP2-PCR a R-bZIP2-RT, vzniklý produkt má délku 200 bazí a 57,3 % obsahu G/C.

Příprava heteroduplex :

18 µl smíšené cDNA fragment se standardem (1:1 v/v) bylo smícháno se 2 µl kaskádového hybridizačního pufru

smíšená se ohřála na 95 °C a nechala se pozvolna vystydnout po dobu 2 hodin

bylo přidáno 20 µl TGGE pufru s 0,001 % bromfenolové a xylylencyanolové modifikace v 0,4xTBE

vzorek byl nanesen na polyakrylamidový gel (2 x 2,5 µl po stranách a 35 µl do prostřední dlouhé jamky v případě gradientové elektroforézy, 2,5 µl vzorku na jamku v případě analýzy heteroduplex pro jednotlivé klony)

Teplotní gradientová gelová elektroforéza probíhala v 6% polyakrylamidovém gelu (složení gelu pro TGGE (50 ml) viz kap. 3.1.3.; Riesner *et al.*, 1989) (8,8 x 8,8 x 1,5 mm) na aparatu e TGGE System (Biometra).

Nastavení TGGE přístroje: 15 minut při 10 °C/220 V, 500 mA, 30 W (zamigrování vzorku); 20 minut při 10 °C/150 V, 500 mA, 30 W (zamigrování vzorku s krycí fólií); 40 minut elektroforéza v gradientu teplot 32,5-50 °C při 150 V, 500 mA, 30 W.

Analýza heteroduplex probíhala v 6% polyakrylamidovém gelu (8,8 x 8,8 x 1,5 mm) na aparatu e Biometra.

Nastavení TGGE přístroje: 15 minut při 10 °C/220 V, 500 mA, 30 W ; 20 minut při 10 °C/150 V, 500 mA, 30 W; 40 minut elektroforéza při 47,2 °C při 150 V, 500 mA, 30 W.

Barvení nukleových kyselin AgNO₃

(Schumacher *et al.*, 1986)

Po inkubaci gelu ve fixáži (5 minut) byl tento převeden do roztoku 0,19% AgNO₃ (30 minut). Gel byl opláchnut vodou a inkubován v roztoku vývojky (maximálně 15 minut).

Vývojka byla vymyta na za „stop pufr“. Po inkubaci 5 minut byl gel převeden do H₂O a skenován.

3.2.7. SEKVENACE

Automatické sekvenování bylo provedeno jak je uvedeno v práci Matouška *et al.* (Matoušek *et al.*, 2005) pomocí systému ALF II (Amersham Pharmacia Biotech) s využitím sekvenovacího kitu s Cy5-značenými standardními primery.

3.2.8. EXTRAKCE SEKUNDÁRNÍCH METABOLITŮ PRO HPLC ANALÝZU A HODNOCENÍ OBSAHU PIGMENTŮ A SEKUNDÁRNÍCH METABOLITŮ

Provedeno podobně jako v práci Matouška *et al.* (Matoušek *et al.*, 2007a).

Pro analýzu bylo použito listové pletivo chmelu cv. Osvald v klon 72 a cv. Admiral, resp. apíčky chmelu cv. Admiral.

Lyofilizovaný materiál byl rozmělněn ve třecí misce a v alikvotách po cca 55 mg rozpuštěn sonikací (PG100 150 Watt ultrasonic disintegrator Mk2, MSE; vlnová délka cca 2-3 μm, síla cca 1/2 maxima) v 1 ml methanolu, resp. směsi methanol: voda (1:1 v/v).

Extrakty se posléze nechaly přes noc rozpouštět při teplotě 4 °C.

Nerozpustný materiál byl sedimentován centrifugací 20 minut při 18000 ot.min⁻¹, supernatant převeden do nových označených zkumavek a sedimentován ještě 10 minut při 13500 ot.min⁻¹, aby se zamezilo ucpání kolony HPLC.

Pozn.: sediment lze resuspendovat v dalším mililitru použitého extrakčního roztoku (kvůli možnosti dodatečného uvolnění dalších metabolitů) a obdobně skladovat přes noc a centrifugovat.

Při HPLC bylo analyzováno 50 μl extraktu, jako nulový vzorek sloužilo stejné rozpouštědlo (metanol, resp. metanol:voda).

HPLC („High-Performance Liquid Chromatography“) chromatografie probíhala na řízení Waters 2690 Alliance Separations Module a Waters 996 Photodiode Array, řízením softwarem Millennium (verze 3.20) (Waters). Kolona Omnispher C18 (250 x 4,6 mm, 5 μm) byla udržována při teplotě 35 °C, injikovaný objem vzorku byl 50 μl. Eluce probíhala v 60-

minutovém profilu na gradientu s rostoucí hydrofobicitou rozpouštědla B (metanol/acetonitril, 1/1, v/v s 0,025% mravenčí kyseliny) z poměrem 15 % v rozpouštědlu A (voda s 0,025% mravenčí kyseliny) na konci 95 % rozpouštědla B v A, resp. chromatografií optimalizovanou na zkoumání obsahu prenylovaných flavonoidů a hořkých kyselin (0-32 minut voda:methanol 55:45 v/v, 32-45 minut voda:methanol 5:95 v/v, 45-60 minut voda:methanol 55:45 v/v).

Z 3D dat byl extrahován chromatogram při 310, 350 a 370 nm (fenolické kyseliny, flavonoly a prenylflavonoidy, v uvedeném pořadí), jednotlivé píky byly identifikovány na základě jejich UV-spekter a retenčních časů. Integrace píků byly prováděny na základě standardních parametrů, normalizované plochy píků byly vypočteny jako podíl plochy píku a navážky vzorku relativně vzhledem k patřícímu referenčnímu píku.

3.2.9. FENOLOGICKÉ HODNOCENÍ SYMPTOM

U rostlin byly pozorovány morfologické změny (zejména hlavní příznaky viroidní infekce popsané v literatuře: zakrslost, zkrácená internodia, pokroucené listy, specifické vtvěření), heterochronní a další fenotypové změny v souvislosti s transgenozí nebo viroidní infekcí. Příznaky byly fotografovány a vyhodnocovány pomocí funkce „measure pixel density“ v programu *Lucia* verze 5.0 (Laboratory Imaging).

4. VÝSLEDKY

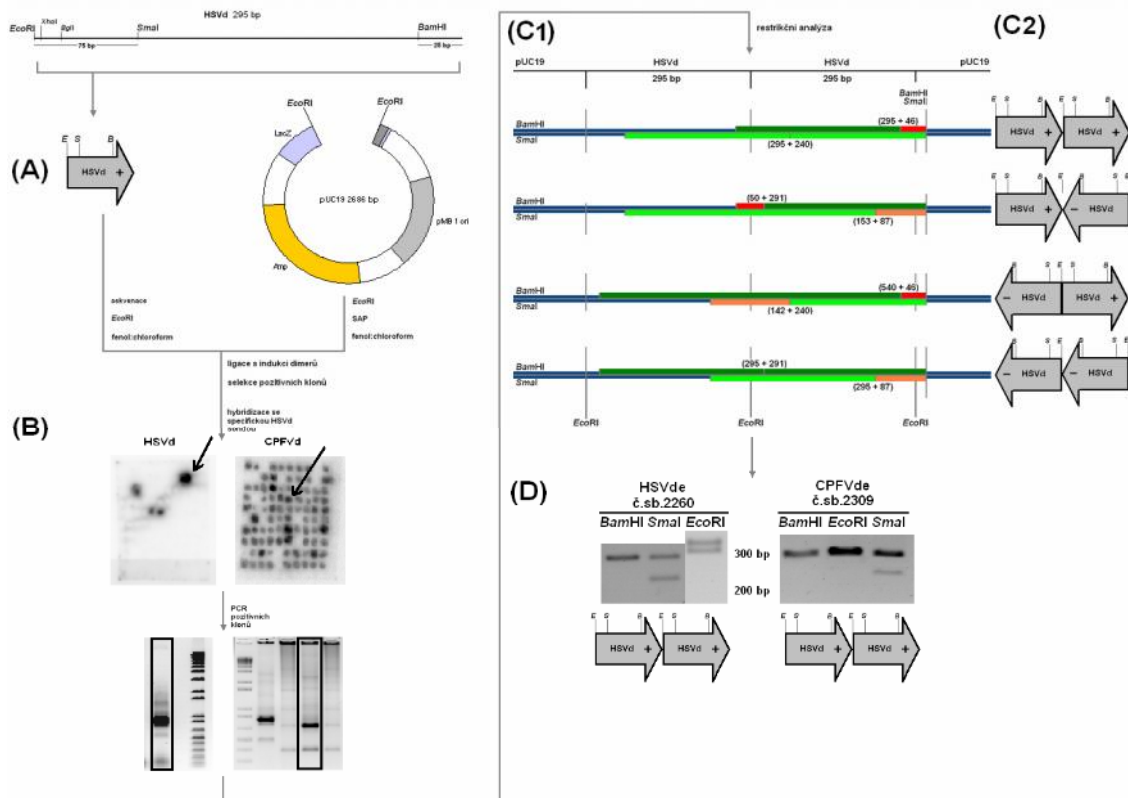
4.1. Konstrukce infekčního viroidního vektoru, infekce *Humulus lupulus* a hodnocení patogeneze

Protože forma jednoho z chmelových regulačních faktorů *HIMyb3* byla toxická v heterologních transformantech se symptomy nápadně připomínajícími viroidní infekcí, je tu možnost, že viroidní infekce by mohla mít expresi tohoto faktoru nebo modifikovat jejich projevy, jak je předpokládáno v práci Matouška *et al.* (Matoušek *et al.*, 2007c). V další práci jsme se proto soustředili na hodnocení exprese regulačních faktorů u viroidem infikovaného a kontrolního chmelu. Pro snadné infekce chmelu biolistickou metodou byly v dalším experimentálním kroku konstruovány infekční vektory nesoucí inzerty dvou kmenů patogenního viroidu HSVd, tzv. okurkového izolátu CPFVd a HSVd z révy vinné, jež byl izolován dříve (Matoušek *et al.*, 2003). Pro klonování CPFVd byla RNA purifikována přes kolonku v etn. aplikaci DNázy (kap. 3.2.2.). Takto připravená RNA byla použita v RT-PCR reakci (kap. 3.2.1.), jejíž produkt byl separován v agarózovém gelu a následně dle protokolu izolován (kap. 3.2.2.). Získaný fragment byl klonován do plazmidu pCR-Script a sekvenován. Obdobný postup byl použit pro klonování HSVd, jehož klon v plazmidu pCR-Script v etn. sekvenci byl k dispozici z předšlých pokusů. K vyšetření fragmentu viroidu z plazmidu pCR-Script byla použita restriktivní endonukleáza *EcoRI* ve 100 µl reakční směsi (kap. 3.2.3.).

Pro konstrukci infekčního vektoru byl použit plazmid pUC 19, izolovaný pomocí QIAGEN Plasmid Midi Kit-u a purifikován přes kolonky QIAGEN-Tip 100 (kap. 3.2.2.). Izolovaný plazmid byl štěpen *EcoRI* v 50 µl reakční směsi (kap. 3.2.3.), následně byla nukleáza inaktivována fenolem:chloroformem:IAA (25:24:1), plazmid byl sražen ethanolem/octanem sodným a po optovném rozpuštění v H₂O defosforylován (kap. 3.2.3.) pro snížení rizika samoligace. Fosfatáza byla inaktivována fenolizací, vodní fáze obsahující plazmid byla separována pomocí agarózové elektroforézy a lineární forma byla z gelu izolována dle protokolu uvedeného v kapitole 3.2.2.

Ligace s indukcí dimeru viroidu probíhala dle protokolu uvedeného v kapitole 3.2.3. Selektce pozitivních klonů probíhala pomocí hybridizace s cDNA sondou pro HSVd, vybírány byly klony s nejvyšším signálem. Tyto byly dále analyzovány pomocí restriktivní analýzy. Oba

získané dimery byly ve stejné orientaci, „++“, resp. *EcoRI* +- +- *SmaI* *Bam*HI (monomery podtrženy; obr. 7).



Obr.7: Schéma p ípravě infekčního vektoru pro biolistickou infekci chmelu. Práce probíhala v několika krocích: (A) cDNA fragmenty viroidů HSVd a CPFVd byly klonovány do plazmidu pCR-Script a sekvenovány. Z plazmidu pCR-Script byly následně fragmenty vyšťepeny restrikční endonukleázou *EcoRI*, separovány v agarózovém gelu a z něj izolovány. Purifikovaný plazmid pUC19 byl linearizován *EcoRI* a posléze byly jeho konce defosforylovány pomocí alkalické fosfatázy (SAP). Fragmenty viroidů byly ligovány do vektoru za podmínek indukujících dimerizaci inzerce. (B) Získané klony byly ověřovány molekulárně-hybridizačními metodami se specifickou radioaktivní sondou pro HSVd. Pro přehled uvádím dvě membrány, šipkou označené klony byly v dalších analýzách potvrzeny jako dimery fragmentů ve stejné orientaci. Velikost inzerce byla u pozitivních klonů zjišťována pomocí PCR-amplifikace. Uvádím příklady takovéto analýzy u dvou dimerů (v obdélníku). Po stranách je nanesen 1 kb DNA ladder. (C1) Pomocí restrikčních map pUC19 a HSVd byla navržena restrikční analýza, která by odhalila orientaci fragmentů v získaném vektoru. Bylo nutné vybírat vektory s inzertí ve stejné orientaci. Na schématu (C2) jsou znázorněny i alternativy inserce, pro jednoduchost označeny šipkami + a - (+ značí orientaci stejnou jako v restrikční mapě viroidu HSVd nahoře). V sekvenci pUC19 jsou vyznačeny místa *EcoRI*, *SmaI* a *BamHI*. V případě restrikční analýzy jednotlivých variant orientace by vznikaly krátké (červené) nebo dlouhé (zelené) fragmenty *BamHI* (nad osou) a *SmaI* (pod osou). Reakcí *EcoRI* by došlo k vyšťepení inzerce. Očekávané délky fragmentů jsou uvedeny v závorkách. (D) Výsledek restrikční analýzy vybraných klonů.

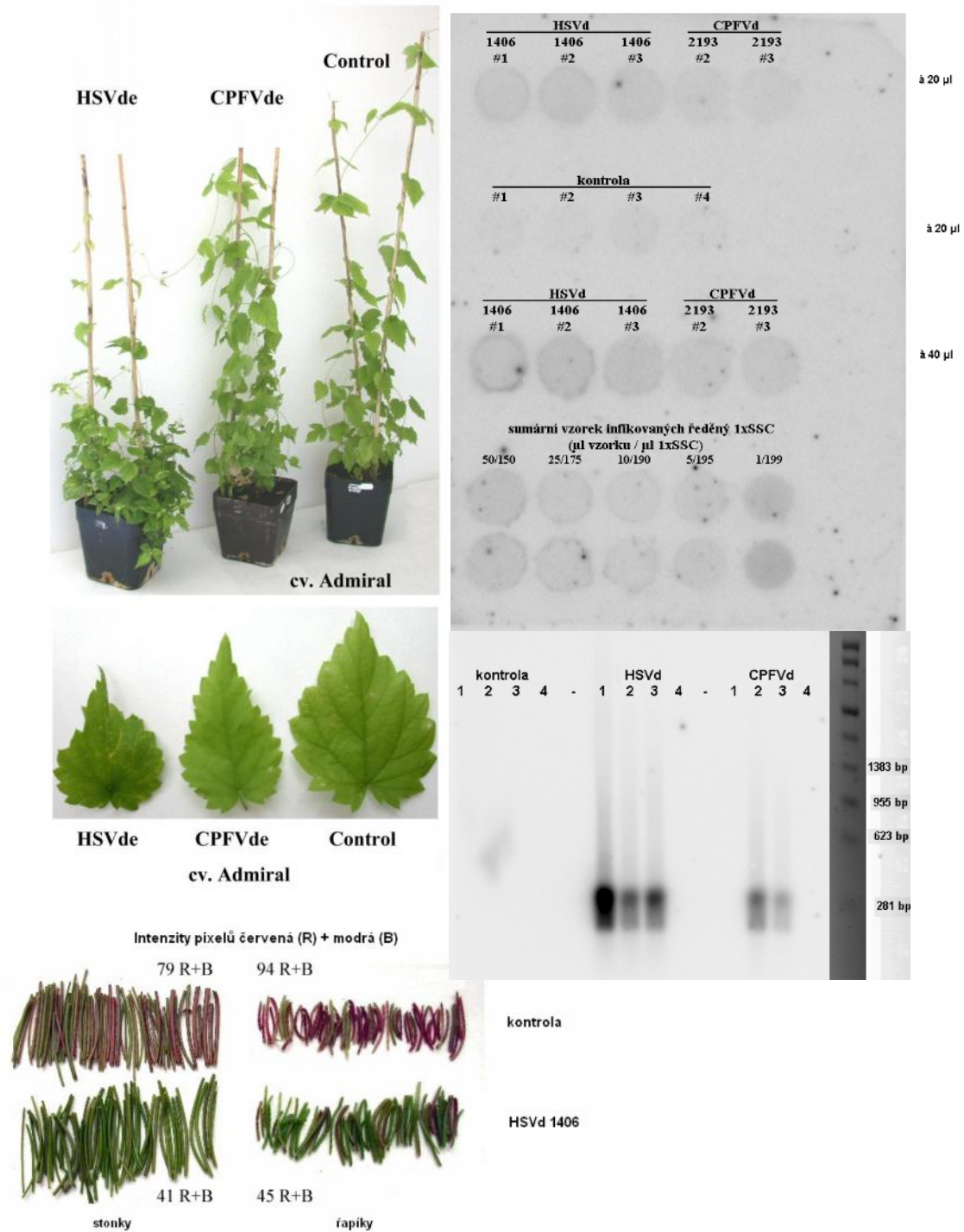
Infekce chmelu odrůdy Admiral, která byla vybrána jako modelový objekt zejména proto, že u této odrůdy narozdíl od českého nízkooosažného chmelu lze i v listech hodnotit hladinu pigmentu a sekundárních metabolitů, probíhala pomocí biolistické metody vpravení DNA do rostlinných buněk pomocí systému Helios Gene Gun System (Biorad), jak je

uvedeno v kapitole 3.2.4. Infekční DNA byla do chmelu vnášena ve stádiu mladých výhonů do dvou až tří mladých listů. Aby došlo k systémové infekci rostlin s vyšší incidencí příznaků, byly chmelové kolikrát za vegetační sezonu sestřizeny na úrovni vzdělaných stonků.

Příznaky jako pokroucené listy a nízký vzrůst se objevily ještě ve fázi primární infekce (2 měsíce po infekci, před prvním sestřizením) a naplno se vyvinuly po druhém a třetím obrázení, kdy se objevila také tuhost listů. Infekce byla sledována nejen na úrovni morfologické, ale také pomocí molekulárně-hybridizačních metod (extrakce pomocí pufru AMESS a dot blot, „Northern“ blot, kap. 3.2.5.). Pokud lze soudit ze srovnání výsledků detekce viroidů pomocí dot blot a „Northern“ blot, dot bloty se mnohdy ukázaly jako méně spolehlivé. Pozadí v případě dot blot hybridizace bylo pravděpodobně způsobeno sekundárními metabolity, „Northern“ hybridizace však infekci kontrolních rostlin prakticky vyloučila (obr. 8). Zajímavým fenoménem z pohledu transkripčních faktorů byla absence anthokyanů v apikálních a ve stonku u infikovaného materiálu. Stonky a zejména apiky, u kontrolních rostlin výrazně červené, byly u rostlin infikovaných mírným viroidem CPFVd pouze na červenalé a u rostlin infikovaných HSVd zcela zelené. Takovéto pozorování bylo potvrzeno analýzou obrazu zbarvení fotograficky zdokumentovaných stonků a apíků (viz kap. 3.2.9.) (obr. 8). Kvůli evidentní blokaci syntézy pigmentů v těchto částech rostlin bylo na místě soustředění pozornosti na expresi známých chmelových transkripčních faktorů v uvedených pletivech, v souvislosti s viroidní infekcí.

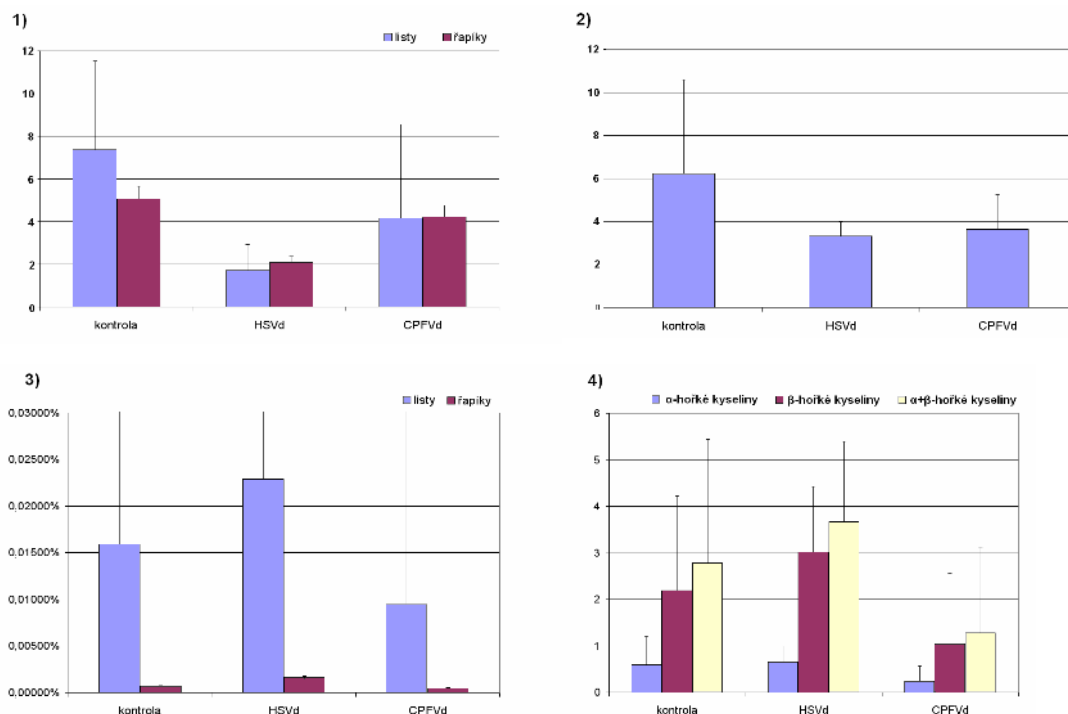
Lze předpokládat, že vlivem infekce HSVd dochází ke kvantitativním a kvalitativním změnám v metabolomu postižených rostlin, obdobně jako je tomu v případě infekce viroidem HLVd (Barbara *et al.*, 1990; Adams *et al.*, 1992). Pro hodnocení těchto změn byla provedena analýza HPLC na listovém pletivu infikovaného chmelu cv. Admiral, jak je uvedeno v kap. 3.2.8. Co se týče jednotlivých zkoumaných sekundárních metabolitů (flavonolových glykozidů a fenolických kyselin), účinek viroidní infekce byl roznorodý a v listovém pletivu byla vysoká variabilita v kvantitě jednotlivých metabolitů. Poněkud ucelenější obraz dává vynesení sumy normalizovaných ploch jednotlivých skupin metabolitů (grafy 1-2). Z nich je patrné, že v případě flavonolových glykozidů a fenolických kyselin docházelo v případě infekce viroidem HSVd ke snížení obsahu těchto skupin látek. Podobné výsledky vykazovaly také rostliny napadené CPFVd, ke snížení obsahu metabolitů však nedocházelo v takové míře.

Podobný výsledek ukázala také analýza obsahu flavonolových glykozidů v sumárním vzorku apíků (graf 1). Zajímavým výsledkem bylo, že na druhou stranu docházelo k akumulaci prenylovaných flavonoidů, xanthohumolu a desmethylxanthohumolu, a dalších



Obr.8: Fenologické pozorování infikovaného chmelu a detekce viroidní infekce. Vlevo nahoře morfologické změny postihující chmele infikované dvěmi kmeny HSVd se silnými (HSVd) a mírnými (CPFVd) symptomy. Symptomy zahrnují nízký vzrost, malé a pokroucené listy a také odbarvení červených stonků a řapíků (vlevo dole příklad HSVd, řapíky ve sloupci vpravo). Detekce patogenu probíhala také pomocí hybridizačních metod, vpravo nahoře extrakce a dot blot, dole „Northern“ blot. Detaily viz text.

kyselin u rostlin infikovaných HSVd. U rostlin infikovaných CPFVd naopak docházelo k mírnému snížení obsahu těchto látek (grafy 3-4). Při analýze obsahu xanthohumolu v sumárním vzorku apík byla tato tendence prokázána znovu, a v apících dosahuje koncentrace xanthohumolu poměrně nízkých hodnot (graf 3). Přesná kvantifikace však není z uvedených dat možná.

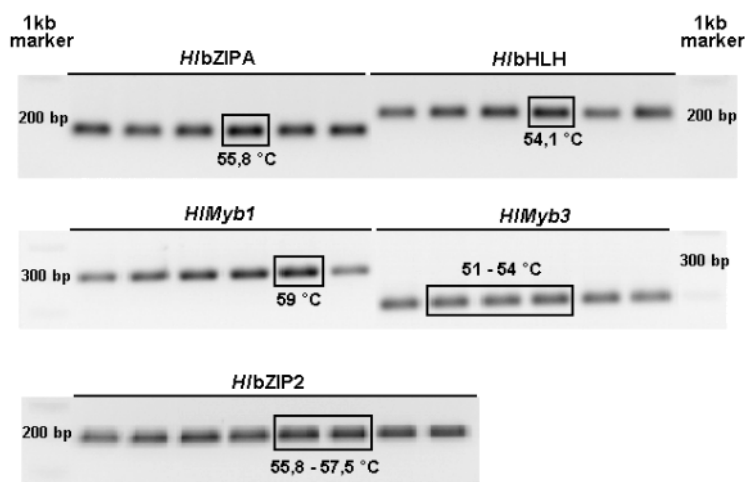


Grafy 1-4: Porovnání průměrných hodnot obsahu sekundárních metabolitů (1, flavonolových glykozidů; 2, fenolických kyselin; 3, xanthohumolu; a 4, hořkých kyselin) v kontrolním a HSVd- resp. CPFVd-infikovaném chmelu v listovém pletivu a v apících cv. Admiral (viz popisky u grafů). U grafu 1 jsou na svislé ose vyneseny hodnoty normalizovaných ploch pík $\times 10^4$, u grafu 2 hodnoty normalizovaných ploch pík $\times 10^5$, u grafu 3 hmotnostní procenta obsahu xanthohumolu v celkové hmotnosti vzorku a u grafu 4 hodnoty normalizovaných ploch pík $\times 10^6$. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku ve vzorcích listového pletiva, resp. směrodatnou odchylku chyby opakovaného měření u sumárních vzorků apík.

Tyto výsledky naznačují, že viroidy HSVd a CPFVd způsobily aktivaci odlišných transkripčních faktorů nebo jejich homologů, nebo vliv jejich patogeneze na metabolismus listového pletiva a apík byl poněkud odlišný. U CPFVd-infikovaných pletiv docházelo k celkovému snížení obsahu flavonoidů, nicméně u HSVd-infikovaných došlo k jakémusi přesměrování syntézy z flavonolových glykozidů a fenolických kyselin na syntézu prenylovaných flavonoidů a hořkých kyselin. S tím se nabízí zajímavá možnost pro praktické využití v metabolickém inženýrství, totiž že se na tomto modelu v případě této infekce aktivují nebo reprimují specifické TF, což způsobuje „přepnutí“ z produkce prekurzorů květních barviv na produkci prenylovaných flavonoidů a hořkých kyselin. Pro objasnění tohoto

procesu bylo také zjištěno, zda dochází ke změně exprese známých chmelových TF specificky aktivovaných při vývoji květních orgánů a pravděpodobně se účastnících také řízení produkce sekundárních metabolitů v těchto orgánech.

4.2. Optimalizace podmínek pro RT-PCR a RealTime RT-PCR sekvencí chmelových transkripčních faktorů



Obr.9: Optimalizace zachycení primerů. Pro jednotlivé TF jsou v rámci každé reakce zvýrazněny nejsilnější pruhy a pod nimi uvedeny odpovídající teploty zachycení. Po stranách jsou vyznačeny pozice dle 1kb DNA markeru.

První srovnávací analýza exprese známých chmelových transkripčních faktorů u infikovaných a kontrolních rostlin pomocí RealTime RT-PCR (teplota „annealingu“ 52 °C) sice neukázala přesvědčivé výsledky (nízké koncentrace), ale naznačily možnost pro každou z nich získat lepší výsledky v případě optimalizace podmínek této analýzy.

Aby se snížilo riziko špatné interpretace výsledků, bylo potřeba stanovit optimální podmínky pro semikvantitativní (RT-PCR) a kvantitativní (RealTime RT-PCR) stanovení koncentrace mRNA známých chmelových TF, zejména zda-li jsou primery navržené pro TF cv. Oswald v klon 72 vhodné také pro analýzu TF cv. Admiral a pokud ano, jaká je optimální teplota „annealingu“ jednotlivých specifických primerů. Produkty PCR reakcí probíhajících při gradientu teplot „annealingu“ (kap. 3.2.1.) v termocykleru T-Gradient Thermoblock (Biometra) byly separovány pomocí agarózové elektroforézy a snímek získaný z transiluminátoru (obr. 9) byl vyhodnocen elektronicky pomocí analýzy hloubky pixelů (ImageQuANT verze 4.2, Molecular Dynamics).

Pro jednotlivé primery byly zjištěny následující optimální teploty „annealingu“:

H1Myb1 59 °C

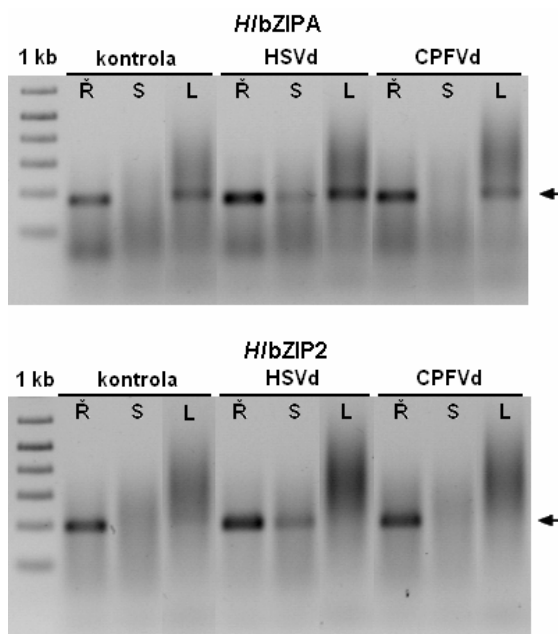
HIMyb3 51 - 54 °C

HlbZIPA 55,8 °C

HlbZIP2 56 - 57,5 °C

HlbHLH 54,1 °C

Jedním z možných faktorů ovlivujících výsledek byl také výběr pletiva, ve kterém by bylo možné změny exprese pozorovat. Pro tuto analýzu byly vybrány RNA extrakty z listů, apíků a stonků rostlin ve stádiu primární infekce. Analyzovány byly pomocí semikvantitativní RT-PCR (32 cyklů, teplota „annealingu“ 55 °C). Bylo zjištěno, že u zkoumaných TF *HlbZIPA* a *HlbZIP2* byla exprese ve stoncích a listech oproti apíkům nízká, a že vlivem infekce docházelo ke hromadění produktu mRNA, zkoumaných genů (obr. 10). Pro další práci byl vybrán pouze silný kmen HSVd, který způsobil úplnou blokáci syntézy pigmentů.



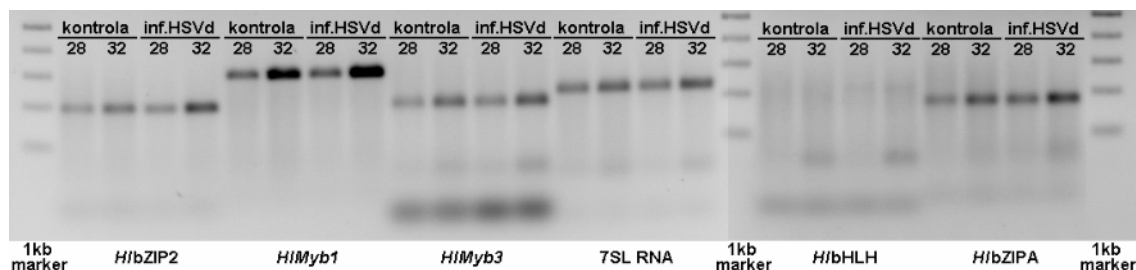
Obr.10: Příklad semikvantitativního stanovení exprese faktorů *HlbZIPA* a *HlbZIP2* pro které orgány: apíky (Ř), stonky (S) a listy (L). Šipkami jsou vyznačeny polohy specifických proužků.

4.3. Hodnocení exprese vybraných transkripčních faktorů v infikovaném a kontrolním chmelu

V předchozích pracích bylo zjištěno, že je exprese TF *HIMyb1* a *HIMyb3* silně vyvíjena a probíhá zejména v pletivu vznikajících květních orgánů chmelu (Matoušek *et al.*, 2005, 2007a). Dále pak bylo v uvedených pracích zjištěno, že je jejich exprese v listovém pletivu velice malá, a kvůli jejich nízké koncentraci i v mycích pěstebných analýzách pomocí RealTime RT-PCR bylo od jejich kvantifikace stávajícími metodami v listech v mé práci upuštěno. Na druhou stranu bylo o faktorech skupiny AtbZIP i v literatuře zjištěno, že jsou aktivovány v odpovědi na stres (Jakoby *et al.*, 2002) a jejich aktivace by mohla ovlivňovat nebo být součástí viroidní patogeneze. Pěstební výsledky ukázaly

možnost jejich podrobnější analýzy a proto byla naše pozornost zaměřena zejména tímto směrem.

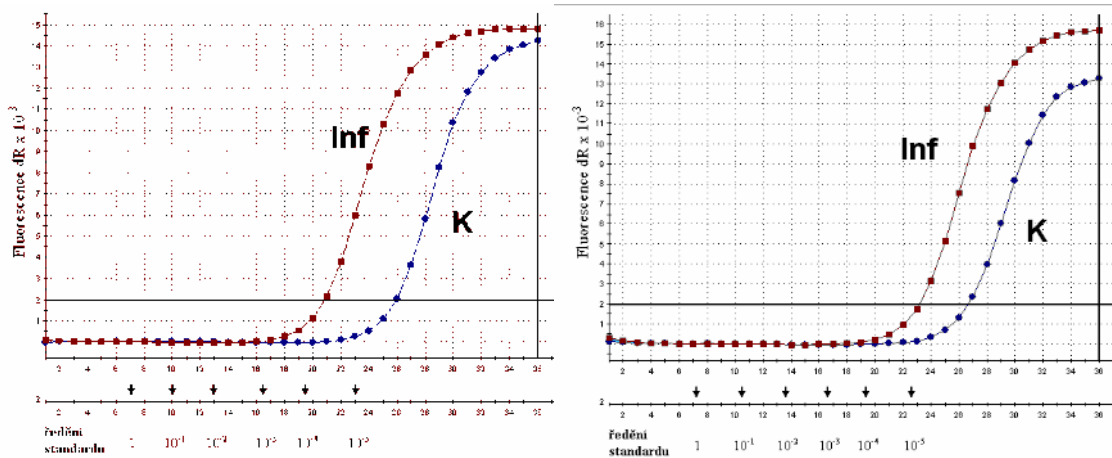
V dalších pokusech se tedy pozornost soustředila zejména na expresi transkripčních faktorů typu bZIP v ervenajícím, resp. blednoucím pletivu apík. Byla provedena semikvantitativní RT-PCR za optimalizovaných podmínek pro detekci každého transkripčního faktoru. Pro lepší možnosti vyhodnocení byl zvolen profil RT-PCR pouze s 32 cykly, přičemž bylo ve 28. cyklu (resp. během „annealingu“ 29. cyklu) odebráno 5 µl reakční směsi. Vzorčky byly posléze odděleny pomocí agarózové elektroforézy a snímky pořízené pomocí transiluminátoru při expozičních 400 a 520 ms (obr. 11) vyhodnocovány elektronicky pomocí analýzy hloubky pixel (ImageQuaNT verze 4.2, Molecular Dynamics). Zbýlých 15 µl reakční směsi bylo nanášeno na preparativní agarózový gel a fragmenty transkripčních faktorů, kromě bHLH, odpovídající délky byly z gelu izolovány (kap. 3.2.2.), viz níže. Průměrné zjištěné změny exprese byly: 46 % u *HlbZIPA*, 49 % u *HlbZIP2*, 11,5 % u *HIMyb1*, 53 % u *HIMyb3*; 1,7 % u 7SL RNA. Na základě této semikvantitativní analýzy jeví zejména TF *HlbZIPA*, *HlbZIP2* a *HIMyb3* zvýšenou expresi.



Obr.11: Semikvantitativní analýza exprese TF v apících kontrolních a HSVd-infikovaných rostlin. Vzorčky byly odebírány ve 28. a 32. cyklu RT-PCR, pruhy byly kvantifikovány analýzou obrazu pomocí software ImageQuaNT (Molecular Dynamics). Průměrný naměřený nárůst exprese pro TF: 46 % *HlbZIPA*, 49 % *HlbZIP2*, 11,5 % *HIMyb1*, 53 % *HIMyb3*; pro 7SL RNA 1,7 %. Pro *HlbHLH* nebyl detekován specifický pruh. Nárůst exprese byl vyhodnocován na snímku pořízeném při expoziční, při níž byla očekávaná linearita fluorescence EtBr.

Tyto výsledky byly u faktorů bZIP ověřovány a potvrzeny pomocí přesnější kvantitativní metody, RealTime RT-PCR (kap. 3.2.1.). Dle kalibrační křivky, která byla připravena vnesením po určitém cyklu ve kterých standardy cDNA odečtené v desítkové řádce překročily prahovou hodnotu fluorescence stanovenou na 2000 dR proti jejich koncentraci, byly určeny odpovídající množství mRNA TF a bylo zjištěno, že v případě *HlbZIPA* je exprese 43x vyšší u infikovaných rostlin a v případě *HlbZIP2* je exprese u infikovaných vyšší 25x (obr. 12). Disociační křivka měla pouze jedno maximum, což naznačuje jediný vznikající produkt v průběhu RealTime PCR reakce (nezobrazeno). 7SL RNA nicméně nebylo možné za identických podmínek dobře amplifikovat, standardy v edicích řádce neprekročily prahovou

hodnotu v přesných odstupech, jako tomu bylo v případě vzorků, což se přitáhlo špatné reverzní transkripci nebo amplifikaci (optimální teplota „annealingu“ pro primery a anti- je 52 °C, RealTime PCR probíhala při teplotě „annealingu“ 56 °C).



Obr.12: Kvantitativní analýza exprese *HlbZIPA* (vlevo) a *HlbZIP2* (vpravo) v apicích kontrolních a HSVd-infikovaných rostlin chmelu. Jako prahová hodnota fluorescence pro stanovení koncentrace RNA byla stanovena hodnota dR 2000. Z grafů je patrné, že se exprese v infikovaných pletivech zvyšuje v koliknásobně (43x v případě *HlbZIPA* a 25x v případě *HlbZIP2*). Na druhé horizontální ose jsou šipkami naznačeny cykly, ve kterých došlo k překročení prahové hodnoty v případě standardů, jejichž hodnoty je znázorněno pod osou.

4.4. Hodnocení sekvenční variability fragmentů transkripčních faktorů pomocí termodynamických metod

Kromě kvantitativní změny by mohla mít viroidní patogeneze vliv také na odlišnou indukci genových rodin TF. Pomocí termodynamických metod bylo možné zjistit, zda dochází k expresi více genů jedné genové rodiny TF, identifikovat odlišné klony a tyto pomocí sekvenční reakce charakterizovat. Pozornost jsme soustředili zejména na chmelový TF *HlbZIP2*, jehož klonování bylo oddělením molekulární genetiky dokončeno a byly připraveny expresní vektory pro jeho funkční analýzu.

Jak již bylo zmíněno výše, výstupem semikvantitativních analýz nebylo pouze zjištění změny exprese vybraných transkripčních faktorů chmelu, ale také amplifikované fragmenty, jež se podařilo izolovat z gelu ve dvou variantách: kontrolní a infikovaná populace cDNA fragmentů.

Tyto fragmenty byly následně klonovány do plazmidu pCR-Script, jimž byly transformovány ultrakompetentní bakterie (Stratagene) dle návodu výrobce. Z narostlých

klon bylo 200 vybráno a skrínováno cDNA radioaktivní sondou (*HlbZIP2*, specifická aktivita $2,0 \cdot 10^6$ CPM/ml sondy). Membrány byly připraveny a hybridizovány dle postupu uvedeného v kapitole 3.2.5. Finální promývání v roztoku s nejvyšší „stringencí“ probíhalo 10 minut v $0,1 \times \text{SSC}$, 0,1% SDS $T=60$ °C. Pozitivní kolonie byly přeškrabány na bakteriální plátek s ampicilínem. Tyto kolonie byly druhý den zpláckány LB médiem s ampicilínem, kultivovány 3,5 hodiny při 37 °C a posléze alikvotovány a uloženy do bakteriální sbírky jako banka pozitivních klonů.

Pro hodnocení sekvenční variability *HlbZIP2* v kontrolních a infikovaných rostlinách chmelu cv. Admiral byl z banky pozitivních klonů izolovaný smíšený plazmid, který byl samohybridizován, a pomocí termodynamické metody TGGE (kap. 3.2.6.) separován na teplotním gradientu. Principem metody je detekce sekvenčních variant oproti standardu na základě teplotní nestability heteroduplexů, které kvůli nekomplementárním místům denaturují rychleji než homoduplexy, a tedy se v gelu zpožují. V případě teplotního gradientové elektroforézy se přítomnost sekvenčních variant projeví znásobenou sigmoidální křivkou denurace duplexů (obr. 13). Takového výsledku bylo skutečně dosaženo jak u kontrolních rostlin, tak i u infikovaných rostlin. Je tedy možné říci, že se u chmelu cv. Admiral exprimuje několik sekvenčních variant genu *HlbZIP2* v kontrolních i infikovaných rostlinách.

Tzv. „melting point“, tedy místo největšího rozdílu migrace homo- a heteroduplexů v gelu, se určuje jako inflexní bod křivky denurace duplexů. Při této teplotě, která byla stanovena na 47,2 °C, se hodnotí sekvenční variabilita jednotlivých klonů vůči standardu pomocí analýzy heteroduplexů (kap. 3.2.6.). Touto analýzou je tedy také možno určit, zda-li vlivem infekce nedochází k aktivaci odlišných sekvenčních variant než u kontrolních rostlin.

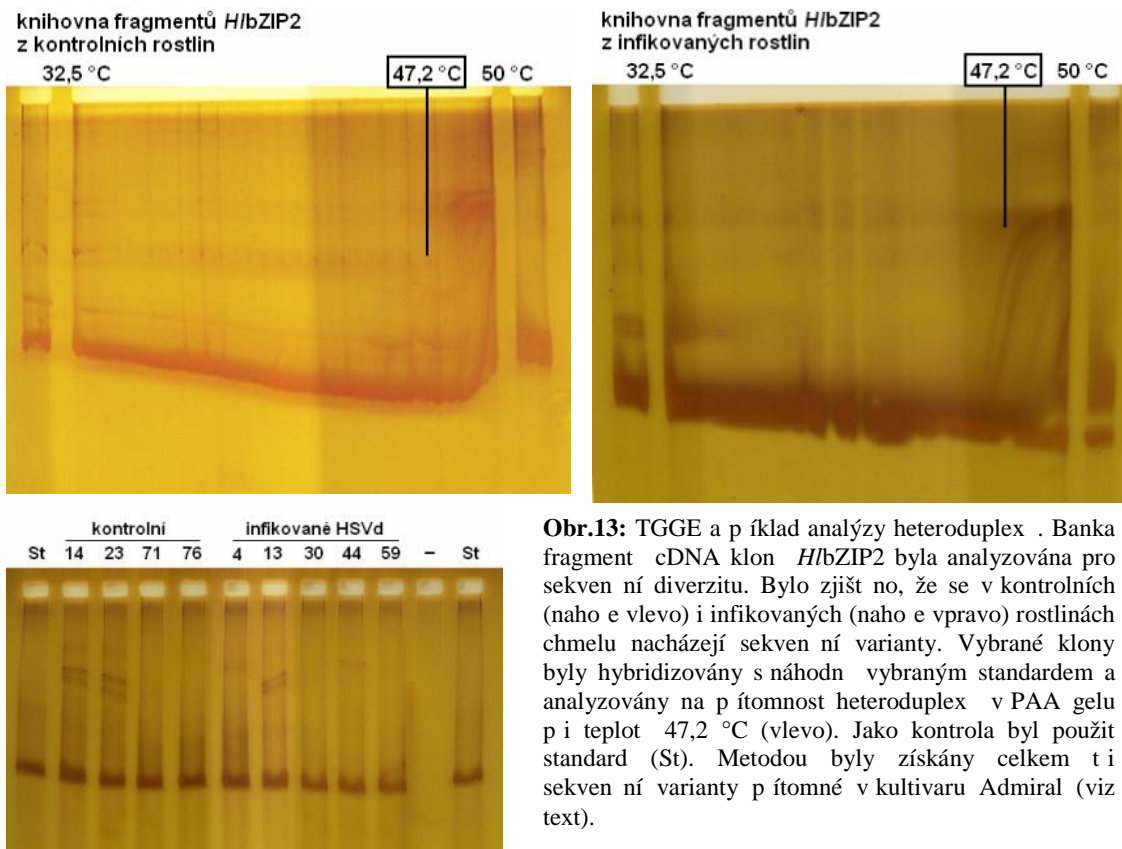
Analýzou heteroduplexů bylo identifikováno několik klonů jevících sekvenční heterogenitu, tyto byly sekvenovány s následujícím výsledkem:

.sb.2433, 2434, 2436, 2445 – sekvence shodná s homolog. úsekem *HlbZIP2* (.sb.2327),

.sb.2435, 2446 – byl zjištěn sekvenční mutant ve 4 místech (T275A, C306T, A379G, A421C), po translaci mají tyto mutace za následek změny aminokyselin (Ile92Lys, Ile127Val, Met141Leu); klon .sb.2435 byl použit jako standard pro TGGE analýzu ostatních cDNA klonů *HlbZIP2* v cv. Admiral,

.sb.2447 – sekvence unikátní, oproti *HlbZIP2* pouze tři změny nukleotidů (T275A, C306T, A421C) a dvě změny aminokyselin (Ile92Lys, Met141Leu).

Zjištěné změny aminokyseliny pravděpodobně nemají vliv na funkci proteinu, protože jsou dle našich srovnávacích analýz lokalizovány mimo DNA-vazebnou a dimerizační doménu, a pokud funkce tohoto proteinu by musela být zkoumána na úplné sekvenci a pomocí molekulárně-biologických metod.



Obr.13: TGGE a příklad analýzy heteroduplex. Banka fragmentů cDNA klonu *H/bZIP2* byla analyzována pro sekvenční diverzitu. Bylo zjištěno, že se v kontrolních (nahoru vlevo) i infikovaných (nahoru vpravo) rostlinách chmelu nacházejí sekvenční varianty. Vybrané klony byly hybridizovány s náhodně vybraným standardem a analyzovány na přítomnost heteroduplexů v PAA gelu při teplotě 47,2 °C (vlevo). Jako kontrola byl použit standard (St). Metodou byly získány celkem tři sekvenční varianty přítomné v kultivaru Admiral (viz text).

5. DISKUSE

Pro biolistickou infekci chmelu byly připraveny infekční vektory obsahující dimery viroidů HSVd a CPFVd ve stejné orientaci klonované do plazmidu pUC19, podobně jako v pracích Gardnera *et al.* (Gardner *et al.*, 1986) a Salazara *et al.* (Salazar *et al.*, 1988), nebo infekce monomerní cDNA viroidu je nízká. Sekvence klonovaných viroidních genomových cDNA klonů byly ověřeny pomocí ligací do plazmidu pUC19 s indukci dimerizace. Selektce pozitivních klonů probíhala pomocí PCR a metod molekulární hybridizace v bakteriálních koloniích. Silně pozitivní klony byly dále ověřovány restrikční analýzou pro zjištění přesné orientace vkládaných inzertů.

Výše uvedené infekční vektory byly biolisticky inokulovány do mladých výhonů chmelu, infekce byla sledována fenologicky (symptomy jako zakrslý růst, malé a pokroucené listy a snižování intenzity červeného zabarvení apíků) a molekulární hybridizací. Bylo zjištěno, že CPFVd je schopen po biolistické infekci množení v chmelových rostlinách, a pokud se jedná o izolát HSVd z okurky (Sano *et al.*, 1984). V mé práci nebylo zjištěno, zda během infekce chmelu dochází ke vzniku sekvencí variant CPFVd, avšak analýzami OMG bylo prokázáno, že uvedená sekvence je v chmelu stabilní. Infikované rostliny byly analyzovány pro kvantitativní změny obsahu sekundárních metabolitů v listovém pletivu, podobně jako je uvedeno v práci Matouška *et al.* (Matoušek *et al.*, 2007a). Byly zjištěny prokazatelné změny v obsahu zkoumaných sloučenin. Ze získaných dat lze předpokládat trend snižování obsahu flavonoidů v důsledku viroidní infekce. Na druhou stranu, lze také sledovat určitý trend změny obsahu xanthohumolu, desmethylxanthohumolu a hořkých kyselin. V případě infekce viroidem HSVd je tento trend opačný než v případě obsahu flavonoidů (obsah prenylovaných flavonoidů vzrostl), což naznačuje, že by se mohlo jednat o regulaci z biochemické dráhy tvorby květních barviv na biochemickou dráhu tvorby hořkých kyselin a prenylovaných flavonoidů, které mají společný prekurzor v podobě chalkonu. Tyto výsledky byly pozorovány také v případě analýzy sekundárních metabolitů přítomných v apících kontrolních a infikovaných rostlin. Je zatím otázkou, jaký je mechanismus odlišné odpovědi na přítomnost viroidu HSVd a CPFVd. Zjištěné výsledky nejsou konzistentní s výsledky získanými na infikovaném chmelu cv. Oswald v klonu 72. V tomto případě byla distribuce flavonoidů zvýšená u obou infikovaných variant oproti kontrole. Lze to ovšem vysvětlit jako odlišnou fenotypovou odpověď v závislosti na kultivaru, nebo v případě Oswaldova klonu 72

bylo zjištěno, že v listovém pletivu obsahuje pouze málo nebo žádné prenylflavonoidy a kyseliny (Matoušek *et al.*, nepublikovaná data). Zvýšení obsahu flavonoidů by bylo možné interpretovat jako reakci na stres způsobený patogenem. V odpovědi na takovýto stres by rostlina aktivovala produkci sekundárních metabolitů, jako v případě reakce na UV-záření, v extrémním případě by docházelo k hypersenzitivní reakci a nakonec k programované buněčné smrti (PCD, přehledná práce viz Collazo *et al.*, 2006). O tomto procesu by svědily i příznaky viroidní nemoci: tuhnutí stonku následkem xylogeneze (která je regulována také Myb-faktory; Demura a Fukuda, 2007), redukce pletiva xylému v apicích listů (Matoušek *et al.*, 2007c), změna charakteru vtvěnění (přehledná práce viz Schmitz a Theres, 2005) a ostatní i kvantitativní změny obsahu sekundárních metabolitů, až nakonec následkem nekrotického dojde k zastavení růstu.

V případě, že by viroidní infekce interferovala s regulací sekundárních metabolitů mimo květní orgány, lze předpokládat změny exprese souvisejících TF. V souvislosti s pozorovanými změnami zabarvení apíků byla zkoumána exprese známých chmelových transkripčních faktorů pravděpodobně asociovaných s produkcí sekundárních metabolitů v hlávkách. Pro tyto analýzy byly také optimalizovány podmínky PCR (teplota „annealingu“ primerů), aby se minimalizovalo riziko mylné interpretace výsledků. Tato teplota byla stanovena na 55,8 °C pro *HlbZIPA*, 55,8 - 57,5 °C pro *HlbZIP2*, 59 °C pro *HIMyb1*, 51 - 54 °C pro *HIMyb3* a 54,1 °C pro *HlbHLH*. Na základě semikvantitativních metod stanovení množství mRNA pomocí RT-PCR bylo zjištěno, že docházelo ke zvýšení exprese faktorů bZIP zejména v apicích, avšak exprese v listech a stoncích byla velice nízká a obtížně měřitelná použitou metodou. Exprese TF *HIMyb1* a *HIMyb3* je naproti tomu specificky regulována zejména u pletiv vznikajících květních orgánů. V pletivu apíků bylo dále zjištěno, že PCR signál specifický pro TF byl zvýšen u rostlin infikovaných HSVd, průměrně o 46 % u *HlbZIPA*, o 49 % u *HlbZIP2*, o 11,5 % u *HIMyb1*, o 53 % u *HIMyb3* za relativně stálého množství 7SL RNA, jež se exprimuje konstitutivně a byla proto použita jako kontrola ekvivalentního množství vzorku v reakci (Matoušek *et al.*, 1999). RT-PCR reakce nebyla u faktoru *HlbHLH* úspěšná. U transkripčních faktorů *HlbZIPA* a *HlbZIP2* byla exprese dále srovnávána pomocí přesnějších kvantitativních metod RealTime RT-PCR. Touto metodou bylo zjištěno výrazné zvýšení hladiny mRNA bZIP faktorů v infikovaných rostlinách, 43x v případě *HlbZIPA* a 25x v případě *HlbZIP2*. Disociační křivka měla pouze jedno maximum, což naznačuje jediný vznikající produkt v proběhlé reakci. Nicméně, 7SL RNA nebylo možné za identických podmínek dobře amplifikovat, jako tomu bylo v případě vzorků, což se přičítá

špatné reverzní transkripci nebo amplifikaci (optimální teplota „annealingu“ pro primery a anti- je 52 °C, RealTime PCR probíhala při teplotě „annealingu“ 56 °C). Přesto mají výsledky dobrou vypovídací hodnotu. Dle údajů získaných v Laboratoriu molekulární genetiky dochází dále v infikovaných apicích také ke snížení exprese *chs_H1* na čtvrtinu hladiny kontrolních rostlin. Zmínka na exprese tohoto genu poukazuje na účinnost nějakého TF v projevech patogeneze viroidu HSVd.

Pro transkripční faktory *HlbZIPA*, *HlbZIP2* a *HIMyb3* byly připraveny banky klonů cDNA fragmentů pro analýzu sekvenční variability v exprimovaných mRNA. V průběhu této práce byla analyzována sekvenční variabilita faktoru *HlbZIP2* pomocí termodynamických metod TGGE a analýza heteroduplexů. Na osmi sekvenovaných klonech bylo zjištěno, že se u kultivaru Admiral skutečně exprimují nejméně tři varianty u kontrolních i infikovaných rostlin. První varianta je v rámci zkoumaného fragmentu shodná s genem *HlbZIP2* izolovaným z kultivaru Osvald v klonu 72 a exprimuje se v kontrolních i infikovaných rostlinách. Další varianta má ve zkoumaném úseku 4 mutace, které mají za následek 3 záměny aminokyselin (T275A, C306T, A379G, A421C; Ile92Lys, Ile127Val, Met141Leu) a exprimuje se v kontrolních i infikovaných rostlinách. Třetí varianta má ve zkoumaném úseku tři mutace, které mají za následek 2 záměny aminokyselin (T275A, C306T, A421C; Ile92Lys,

```

HlbZIP2      MASSKVLASS NSRNSDLSRK SSSASSS-AV RRPKLSFSDQ QAHIINSNNN 50
AtbZIP13    .T.FQ.MR.. .....R I....T.SSS I...QQQ.RRD LTVGVYGGGR.

GGDHTAKPSM TVDGFRLRVY DATP--AAES TLLDAQITLI DPTPIASVSA 100
D.LYSSN-... .E.I.HDTF ASD.PAPT.. S...S.N.M .AS.APMEIT

      (1)
AAVATGDLNS GS-IGSSSAP KTVDEVWREI ISGDRKECKE EEQDMVMTLE 150
TTT.SDVVDH .GGTETTRGG .S...I...M V...EG.GM. .TSEEI...

      (2)
DFLLAKTGIA SVEEEDVKSL PAPLTESLSS GLFSFDSIPP SPLQALDNVE 200
...AAVE DETAVTASAE DLVVKIPVTN YGFDHSAP.H N.F.MI.K..

      DNA binding
GSIIGFGNGV EVIGGGGAGG RGKRGRRVLE PLDKAAQQRQ RRMIKNRESA 250
...VA...L D.Y...--A .....A.VMV. ....A...

      motif      basic motif - Leu zip
ARSPERKQAY QVELES LAVR LEEENDRLLK EKAERTKERF KQLMEKVIVP 300
.....A..AK .....EL.S. .IEDKR...Y QK..EF....

      (3)
EEK--RRPPR VLRVRVSLQW 320
V...PKQQ... F...I...E.

```

Obr.14: Porovnání dedukované primární sekvence aminokyselin *HlbZIP2* a *AtbZIP13* (GenBank AC: BN000024). Známé strukturální elementy *AtbZIP13* jsou porovnány se sekvencí *HlbZIP2*: DNA binding motif – DNA-vazebná doména, vysoce konzervované aa N a R jsou označeny tverými čarami; basic motif Leu zip – oligomerizační doména s motivem leucinového zipu, leuciny pravděpodobně tvořící leucinový zip jsou podtrženy; (1) a (2) – potenciační místa fosforylace kazein kinázy II; (3) – konzervovaná doména s neznámou funkcí. NLS bohatý na R/K se nachází v rámci DNA-vazebné domény. Místa s výskytem sekvenčních variant (popsané výše a v kap. 4.4.) jsou vyznačeny plnou kruhovou značkou.

Met141Leu) a byla zjištěna v bance fragmentů z infikovaných rostlin. Nelze však kvůli malému počtu zkoumaných sekvencí vyloučit také přítomnost této sekvence v bance fragmentů z kontrolních rostlin. Získaná sekvence aminokyselin *HlbZIP2* byla porovnána s databází Blast. Jako nejbližší protein byl nalezen *AtbZIP13* (GenBank AC: BN000023, TrEMBL: Q9FNB9, lokus At5g44080) s podobností na úrovni sekvence DNA 57 % a na úrovni sekvence aa 58 % (ExpASy Blast2). Na základě porovnání sekvencí aminokyselin byla identifikována DNA-vazebná doména a

leucinový zip HlbZIP2. Výše uvedené změny aminokyselin pravděpodobně nemají vliv na funkci proteinu, nebo se nacházejí mimo tyto vysoce konzervované domény. Vzhledem k rozsahu provedených analýz však nelze vyvodit přesné závěry, dokud nebudou provedeny funkční analýzy uvedených faktorů. AtbZIP13 patří do skupiny A (Jakoby *et al.*, 2002), pravděpodobně se účastní procesu signalizace ABA nebo stresu. Zjištěná změna exprese faktoru HlbZIP2 u chmelu je v souladu s tímto předpokladem, nebo viroidní infekce je rozhodně stresovým agens. Nalezené podobné sekvence *HlbZIP2* by mohly mít praktický dopad v podobě alternativních sond pro hledání dalších homologů rodin transkripčních faktorů, avšak nelze vyloučit sekvenční uniformitu mimo variabilní amplifikovaný úsek.

Nebylo zjištěno, zdali ke zvýšení exprese faktorů bZIP u chmele dochází v rámci obecné odpovědi na stres v podobě viroidní infekce, nebo zda se jedná o jiný mechanismus regulace. Dle sekvenčních analýz vychází nejvíce podobnost *HlbZIP2* s *AtbZIP13*, patřícím do skupiny A (Jakoby *et al.*, 2002), ve které se dle dostupných informací studované faktory účastní signalizace abscisové kyseliny nebo stresu. Lze také předpokládat, že dochází k odlišné expresi TF vlivem infekce CPFVd. Regulace chmelových transkripčních faktorů však zůstává předmětem dalších výzkumů v laboratoři OMG. Prvním zdrojem informací budou promotorové sekvence chmelových transkripčních faktorů, jež lze zkoumat také v heterologních systémech v konjugaci s reportérovými geny GUS a GFP, popř. v *in vitro* podmínkách za využití „shift assay“ a dihybridních systémů.

6. ZÁVĚRY

a) Byl připraven infekční vektor na základě plazmidu pUC19 s dimerickým inzertem HSVd resp. CPFVd. Přítomnost inzertu byla potvrzena a orientace fragmentu viroidu ověřena restriktivní analýzou. Tímto vektorem byly inokulovány rostliny chmelu cv. Admiral. Rostliny byly úspěšně infikovány a bylo zjištěno, že je možné pomocí biolistickej inokulace infikovat chmel také viroidem CPFVd.

b) Pro analýzu exprese byly s použitím gradientové PCR optimalizovány podmínky amplifikace a ověřeny pro kultivar Admiral.

c) Hladina exprese vybraných chmelových transkripčních faktorů byla hodnocena a srovnána v kontrolních a infikovaných rostlinách chmelu pomocí semikvantitativních a kvantitativních metod. Bylo zjištěno, že vlivem viroidní infekce dochází ke zvýšení exprese mRNA známých TF chmelu. Zejména byla charakterizována změna exprese genů doposud nepublikovaných TF *HlbZIPA* a *HlbZIP2*.

d) Pomocí termodynamických metod byla zjištěna sekvenční variabilita v rámci exprimované skupiny mRNA *HlbZIP2*. Byly identifikovány celkem tři sekvenční varianty, což svědčí o expresi genové rodiny tohoto faktoru.

e) Získaná data jsou v souladu s dostupnými informacemi. Bylo zjištěno, že vlivem infekce viroidu docházelo ke změně složení sekundárních metabolitů, přičemž docházelo k odlišným změnám při infekci HSVd a CPFVd v závislosti na genotypu chmele. Dle porovnání sekvence *HlbZIP2* bylo zjištěno, že pravděpodobně patří do skupiny TF účastnících se signalizace stresu a/nebo ABA.

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

7.1. V decké články a publikace

- Adams, A.N., Morton, A., Barbara, D.J., Ridout, M.S. (1992) The distribution and spread of hop latent viroid within 2 commercial plantings of hop (*Humulus lupulus*). *ANNALS OF APPLIED BIOLOGY* - (121): 585-592.
- Astruc, N., Marcos, J.F., Macquaire, G., Candresse, T., Pallás, V. (1996) Studies on the diagnosis of hop stunt viroid in fruit trees: Identification of new hosts and application of a nucleic acid extraction procedure based on non-organic solvents. *EUROPEAN JOURNAL OF PLANT PATHOLOGY* - (102): 837-846.
- Barbara, D.J., Morton, A., Adams, A.N., Green, C.P. (1990) Some effects of hop latent viroid on 2 cultivars of hop (*Humulus lupulus*) in the UK. *ANNALS OF APPLIED BIOLOGY* - (117): 359-366.
- Baulcombe, D. (2005) RNA silencing. *TRENDS IN BIOCHEMICAL SCIENCES* - (30): 290-293.
- Baumstark, T., Schroder, A.R.W., Riesner, D. (1997) Viroid processing: Switch from cleavage to ligation is driven by a change from a tetraloop to a loop E conformation. *EMBO JOURNAL* - (16): 599-610.
- Borevitz, J.O., Xia, Y.J., Blount, J., Dixon, R.A., Lamb, C. (2000) Activation tagging identifies a conserved MYB regulator of phenylpropanoid biosynthesis. *PLANT CELL* - (12): 2383-2393.
- Bovy, A., de Vos, R., Kemper, M., Schijlen, E., Pertejo, M.A., Muir, S., Collins, G., Robinson, S., Verhoeyen, M., Hughes, S., Santos-Buelga, C., van Tunen, A. (2002) High-flavonol tomatoes resulting from the heterologous expression of the maize transcription factor genes LC and C1. *PLANT CELL* - (14): 2509-2526.
- Branch, A.D., Robertson, H.D., Greer, C., Gegenheimer, P., Peebles, C., Abelson, J. (1982) Cell-free circularization of viroid progeny RNA by an RNA ligase from wheat-germ. *SCIENCE* - (217): 1147-1149.
- Broun, P. (2004) Transcription factors as tools for metabolic engineering in plants. *CURRENT OPINION IN PLANT BIOLOGY* - (7): 202-209.

- Bruce, W., Folkerts, O., Garnaat, C., Crasta, O., Roth, B., Bowen, B. (2000) Expression profiling of the maize flavonoid pathway genes controlled by estradiol-inducible transcription factors CRC and P. *PLANT CELL* - (12): 65-79.
- Carrington, J.C., Ambros, V. (2003) Role of microRNAs in plant and animal development. *SCIENCE* - (301): 336-338.
- Collazo, C., Chacón, O., Borrás, O. (2006) Programmed cell death in plants resembles apoptosis in animals. *BIOTECNOLOGÍA APLICADA* – (23): 1-10.
- Daròs, J.A., Flores, R. (2004) *Arabidopsis thaliana* has the enzymatic machinery for replicating representative viroid species of the family Pospiviroidae. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA* - (101): 6792-6797.
- De Keukeleire, J., Ooms, G., Heyerick, A., Roldán-Ruiz, I., Van Bockstaele, E., De Keukeleire, D. (2003) Formation and accumulation of alpha-acids, beta-acids, desmethylxanthohumol, and xanthohumol during flowering of hops (*Humulus lupulus* L.). *JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY* - (51): 4436-4441.
- Demura, T., Fukuda, H. (2007) Transcriptional regulation in wood formation. *TRENDS IN PLANT SCIENCE* - (12): 64-70.
- Diener, T.O. (1989) Circular RNAs - relics of precellular evolution. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA* - (86): 9370-9374.
- Diener, T.O. (1995) Origin and evolution of viroids and viroid-like satellite RNAs. *VIRUS GENES* - (11): 119-131.
- Diener, T.O. (2001) The viroid: Biological oddity or evolutionary fossil? *ADVANCES IN VIRUS RESEARCH, VOL 57* - (57): 137-184.
- Diener, T.O., Raymer, W.B. (1967) Potato spindle tuber virus - a plant virus with properties of a free nucleic acid. *SCIENCE* - (158): 378.
- Ding, B., Kwon, M.O., Hammond, R., Owens, R. (1997) Cell-to-cell movement of potato spindle tuber viroid. *PLANT JOURNAL* - (12): 931-936.
- Fels, A., Hu, K.H., Riesner, D. (2001) Transcription of potato spindle tuber viroid by RNA polymerase II starts predominantly at two specific sites. *NUCLEIC ACIDS RESEARCH* - (29): 4589-4597.

- Flores, R. (2001) A naked plant-specific RNA ten-fold smaller than the smallest known viral RNA: the viroid. *COMPTES RENDUS DE L'ACADEMIE DES SCIENCES SERIE III-SCIENCES DE LA VIE-LIFE SCIENCES* - (324): 943-952.
- Flores, R., Navarro, J.A., de la Pena, M., Navarro, B., Ambros, S., Vera, A. (1999) Viroids with hammerhead ribozymes: Some unique structural and functional aspects with respect to other members of the group. *BIOLOGICAL CHEMISTRY* - (380): 849-854.
- Flores, R., Hernandez, C., de Alba, A.E.M., Daros, J.A., Di Serio, F. (2005) Viroids and viroid-host interactions. *ANNUAL REVIEW OF PHYTOPATHOLOGY* - (43): 117-139.
- Gardner, R.C., Chonoles, K.R., Owens, R.A. (1986) Potato spindle tuber viroid infections mediated by the Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *PLANT MOLECULAR BIOLOGY* - (6): 221-228.
- Gerhäuser, C. (2005) Beer constituents as potential cancer chemopreventive agents. *EUROPEAN JOURNAL OF CANCER* - (41): 1941-1954. Gerhäuser, C. (2005) Beer constituents as potential cancer chemopreventive agents. *EUROPEAN JOURNAL OF CANCER* - (41): 1941-1954.
- Gerhäuser, C., Alt, A., Heiss, E., Gamal-Eldeen, A., Klimo, K., Knauff, J., Neumann, I., Scherf, H.R., Frank, N., Bartsch, H., Becker, H. (2002) Cancer chemopreventive activity of Xanthohumol, a natural product derived from hop. *MOLECULAR CANCER THERAPEUTICS* - (1): 959-969.
- Goff, S.A., Klein, T.M., Roth, B.A., Fromm, M.E., Cone, K.C., Radicella, J.P., Chandler, V.L. (1990) Transactivation of anthocyanin biosynthetic genes following transfer of B regulatory genes into maize tissues. *EMBO JOURNAL* - (9): 2517-2522.
- Gómez, G., Pallás, V. (2001) Identification of an *in vitro* ribonucleoprotein complex between a viroid RNA and a phloem protein from cucumber plants. *MOLECULAR PLANT-MICROBE INTERACTIONS* - (14): 910-913.
- Gómez, G., Pallás, V. (2004) A long-distance translocatable phloem protein from cucumber forms a ribonucleoprotein complex *in vivo* with Hop stunt viroid RNA. *JOURNAL OF VIROLOGY* - (78): 10104-10110.
- Gómez, G., Pallás, V. (2007) Mature monomeric forms of Hop stunt viroid resist RNA silencing in transgenic plants. *PLANT JOURNAL* - (51): 1041-1049.
- Gruner, R., Fels, A., Qu, F., Zimmat, R., Steger, G., Riesner, D. (1995) Interdependence of pathogenicity and replicability with potato spindle tuber viroid. *VIROLOGY* - (209): 60-69.

- Hämäläinen, J.H., Kekarainen, T., Gebhardt, C., Watanabe, K.N., Valkonen, J.P.T. (2000) Recessive and dominant genes interfere with the vascular transport of Potato virus A in diploid potatoes. *MOLECULAR PLANT-MICROBE INTERACTIONS* - (13): 402-412.
- Hsu, C.Y., Jenkins, J.N., Saha, S., Ma, D.P. (2005) Transcriptional regulation of the lipid transfer protein gene LTP3 in cotton fibers by a novel MYB protein. *PLANT SCIENCE* - (168): 167-181.
- Hutvágner, G., Zamore, P.D. (2002) RNAi: nature abhors a double-strand. *CURRENT OPINION IN GENETICS & DEVELOPMENT* - (12): 225-232.
- Choi, H.I., Hong, J.H., Ha, J.O., Kang, J.Y., Kim, S.Y. (2000) ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* - (275): 1723-1730.
- Itaya, A., Matsuda, Y., Gonzales, R.A., Nelson, R.S., Ding, B. (2002) Potato spindle tuber viroid strains of different pathogenicity induces and suppresses expression of common and unique genes in infected tomato. *MOLECULAR PLANT-MICROBE INTERACTIONS* - (15): 990-999.
- Itaya, A., Zhong, X.H., Bundschuh, R., Qi, Y.J., Wang, Y., Takeda, R., Harris, A.R., Molina, C., Nelson, R.S., Ding, B. (2007) A structured viroid RNA serves as a substrate for dicer-like cleavage to produce biologically active small RNAs but is resistant to RNA-induced silencing complex-mediated degradation. *JOURNAL OF VIROLOGY* - (81): 2980-2994.
- Jakoby, M., Weisshaar, B., Droge-Laser, W., Vicente-Carbajosa, J., Tiedemann, J., Kroj, T., Parcy, F. (2002) bZIP transcription factors in Arabidopsis. *TRENDS IN PLANT SCIENCE* - (7): 106-111.
- Jin, H.L., Martin, C. (1999) Multifunctionality and diversity within the plant MYB-gene family. *PLANT MOLECULAR BIOLOGY* -(41): 577-585.
- Keese, P., Symons, R.H. (1985) Domains in viroids - evidence of intermolecular RNA rearrangements and their contribution to viroid evolution. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA* - (82): 4582-4586.
- Knogge, W., Schmelzer, E., Weissenböck, G. (1986) The role of chalcone synthase in the regulation of flavonoid biosynthesis in developing oat primary leaves. *ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS* - (250): 364-372.

- Liu, L.S., White, M.J., MacRae, T.H. (1999) Transcription factors and their genes in higher plants - Functional domains, evolution and regulation. *EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY* - (262): 247-257.
- Marles, M.A.S., Ray, H., Gruber, M.Y. (2003) New perspectives on proanthocyanidin biochemistry and molecular regulation. *PHYTOCHEMISTRY* - (64): 367-383.
- Martínez de Alba, A.E., Flores, R., Hernandez, C. (2002) Two chloroplastic viroids induce the accumulation of small RNAs associated with posttranscriptional gene silencing. *JOURNAL OF VIROLOGY* - (76): 13094-13096.
- Martínez de Alba, A.E., Sagesser, R., Tabler, M., Tsagris, M. (2003) A bromodomain-containing protein from tomato specifically binds potato spindle tuber viroid RNA in vitro and in vivo. *JOURNAL OF VIROLOGY* - (77): 9685-9694.
- Matoušek, J. (2003) Hop latent viroid (HLVd) microevolution: an experimental transmission of HLVd "thermomutants" to solanaceous species. *BIOLOGIA PLANTARUM* - (46): 607-610.
- Matoušek, J., Junker, V., Vrba, L., Schubert, J., Patzak, J., Steger, G. (1999) Molecular characterization and genome organization of 7SL RNA genes from hop (*Humulus lupulus* L.). *GENE* - (239): 173-183.
- Matoušek, J., Ptáček, J., Didi, P., Schubert, J. (2000) Analysis of variability of P1 gene region of N strain of potato virus Y using temperature-gradient gel electrophoresis and DNA heteroduplex analysis. *ACTA VIROLOGICA* - (44): 41-46.
- Matoušek, J., Patzak, J., Orctová, L., Schubert, J., Vrba, L., Steger, G., Riesner, D. (2001) The variability of hop latent viroid as induced upon heat treatment. *VIROLOGY* - (287): 349-358.
- Matoušek, J., Novák, P., Bída, J., Patzak, J., Niedermeierová, H. (2002a) Cloning and characterisation of *chs*-specific DNA and cDNA sequences from hop (*Humulus lupulus* L.). *PLANT SCIENCE* - (162): 1007-1018.
- Matoušek, J., Novák, P., Patzak, J., Bída, J., Krofta, K. (2002b) Analysis of true chalcone synthase from *Humulus lupulus* L. and biotechnology aspects of medicinal hops. *ROSTLINNA VYROBA* - (48): 7-14.
- Matoušek, J., Orctová, L., Patzak, J., Svoboda, P., Ludviková, I. (2003) Molecular sampling of hop stunt viroid (HSVd) from grapevines in hop production areas in the Czech Republic and hop protection. *PLANT SOIL AND ENVIRONMENT* - (49): 168-175.

- Matoušek, J., Orctová, L., Steger, G., Riesner, D. (2004) Biolistic inoculation of plants with viroid nucleic acids. *JOURNAL OF VIROLOGICAL METHODS* - (122): 153-164.
- Matoušek, J., Vrba, L., Novák, P., Patzak, J., De Keukeleire, J., Škopek, J., Heyerick, A., Roldán-Ruiz, I., De Keukeleire, D. (2005) Cloning and molecular analysis of the regulatory factor *HIMyb1* in hop (*Humulus lupulus* L.) and the potential of hop to produce bioactive prenylated flavonoids. *JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY* - (53): 4793-4798.
- Matoušek, J., Vrba, L., Škopek, J., Orctová, L., Pešina, K., Heyerick, A., Baulcombe, D., De Keukeleire, D. (2006) Sequence analysis of a "true" chalcone synthase (*chs_H1*) oligofamily from hop (*Humulus lupulus* L.) and PAP1 activation of *chs_H1* in heterologous systems. *JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY* - (54): 7606-7615.
- Matoušek, J., Kocábek, T., Patzak, J., Škopek, J., Maloukh, L., Heyerick, A., Füßy, Z., Roldán-Ruiz, I., De Keukeleire, D. (2007a) *HIMyb3*, a putative regulatory factor in hop (*Humulus lupulus* L.), shows diverse biological effects in heterologous transgenotes. *JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY* - (55): 7767-7776.
- Matoušek, J., Orctová, L., Ptáček, J., Patzak, J., Didi, P., Steger, G., Riesner, D. (2007b) Experimental transmission of pospiviroid populations to weed species characteristic of potato and hop fields. *JOURNAL OF VIROLOGY* - (81): 11891-11899.
- Matoušek, J., Kozlová, P., Orctová, L., Schmitz, A., Pešina, K., Bannach, O., Diermann, N., Steger, G., Riesner, D. (2007c) Accumulation of viroid-specific small RNAs and increase in nucleolytic activities linked to viroid-caused pathogenesis. *BIOLOGICAL CHEMISTRY* - (388): 1-13.
- Menkens, A.E., Schindler, U., Cashmore, A.R. (1995) The G-box - a ubiquitous regulatory DNA element in plants bound by the GBF family of bZIP proteins. *TRENDS IN BIOCHEMICAL SCIENCES* - (20): 506-510.
- Milligan, S.R., Kalita, J.C., Heyerick, A., Rong, H., De Cooman, L., De Keukeleire, D. (1999) Identification of a potent phytoestrogen in hops (*Humulus lupulus* L.) and beer. *JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM* - (84): 2249-2252.
- Miranda, C.L., Stevens, J.F., Helmrich, A., Henderson, M.C., Rodriguez, R.J., Yang, Y.H., Deinzer, M.L., Barnes, D.W., Buhler, D.R. (1999) Antiproliferative and cytotoxic effects of prenylated flavonoids from hops (*Humulus lupulus*) in human cancer cell lines. *FOOD AND CHEMICAL TOXICOLOGY* - (37): 271-285.

- Mlotshwa, S., Voinnet, O., Mette, M.F., Matzke, M., Vaucheret, H., Ding, S.W., Pruss, G., Vance, V.B. (2002) RNA silencing and the mobile silencing signal. *PLANT CELL* - (14): S289-S301.
- Muir, S.R., Collins, G.J., Robinson, S., Hughes, S., Bovy, A., De Vos, C.H.R., van Tunen, A.J., Verhoeven, M.E. (2001) Overexpression of petunia chalcone isomerase in tomato results in fruit containing increased levels of flavonols. *NATURE BIOTECHNOLOGY* - (19): 470-474.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *PHYSIOLOGIA PLANTARUM* - (15): 473.
- Novák, P., Matoušek, J., Bříza, J. (2003) Valerophenone synthase-like chalcone synthase homologues in *Humulus lupulus*. *BIOLOGIA PLANTARUM* - (46): 375-381.
- Novák, P., Krofta, K., Matoušek, J. (2006) Chalcone synthase homologues from *Humulus lupulus*: some enzymatic properties and expression. *BIOLOGIA PLANTARUM* - (50): 48-54.
- Okada, Y., Ito, K. (2001) Cloning and analysis of valerophenone synthase gene expressed specifically in lupulin gland of hop (*Humulus lupulus* L.). *BIOSCIENCE BIOTECHNOLOGY AND BIOCHEMISTRY* - (65): 150-155.
- Okada, Y., Saeki, K., Inaba, A., Suda, N., Kaneko, T., Ito, K. (2003) Construction of gene expression system in hop (*Humulus lupulus*) lupulin gland using valerophenone synthase promoter. *JOURNAL OF PLANT PHYSIOLOGY* - (160): 1101-1108.
- Owens, R.A. (2007) Potato spindle tuber viroid: The simplicity paradox resolved? *MOLECULAR PLANT PATHOLOGY* - (8): 549-560.
- Owens, R.A., Blackburn, M., Ding, B. (2001) Possible involvement of the phloem lectin in long-distance viroid movement. *MOLECULAR PLANT-MICROBE INTERACTIONS* - (14): 905-909.
- Palukaitis, P. (1987) Potato spindle tuber viroid – investigation of the long-distance, intraplant transport route. *VIROLOGY* - (158): 239-241.
- Papaefthimiou, I., Hamilton, A.J., Denti, M.A., Baulcombe, D.C., Tsagris, M., Tabler, M. (2001) Replicating potato spindle tuber viroid RNA is accompanied by short RNA fragments that are characteristic of post-transcriptional gene silencing. *NUCLEIC ACIDS RESEARCH* - (29): 2395-2400.

- Patzak, J., Matoušek, J., Krofta, K., Svoboda, P. (2001) Hop latent viroid (HLVd)-caused pathogenesis: effects of HLVd infection on lupulin composition of meristem culture-derived *Humulus lupulus*. *BIOLOGIA PLANTARUM* - (44): 579-585.
- Payne, C.T., Zhang, F., Lloyd, A.M. (2000) *GL3* encodes a bHLH protein that regulates trichome development in *Arabidopsis* through interaction with *GL1* and *TTG1*. *GENETICS* - (156): 1349-1362.
- Puchta, H., Ramm, K., Sanger, H.L. (1988) The molecular structure of hop latent viroid (HLV), a new viroid occurring worldwide in hops. *NUCLEIC ACIDS RESEARCH* - (16): 4197-4216.
- Qi, Y.J., Ding, B. (2003) Differential subnuclear localization of RNA strands of opposite polarity derived from an autonomously replicating viroid. *PLANT CELL* - (15): 2566-2577.
- Qu, F., Heinrich, C., Loss, P., Steger, G., Tien, P., Riesner, D. (1993) Multiple pathways of reversion in viroids for conservation of structural elements. *EMBO JOURNAL* - (12): 2129-2139.
- Ramsay, N.A., Glover, B.J. (2005) MYB-bHLH-WD40 protein complex and the evolution of cellular diversity. *TRENDS IN PLANT SCIENCE* - (10): 63-70.
- Riechmann, J.L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., Jiang, C.Z., Keddie, J., Adam, L., Pineda, O., Ratcliffe, O.J., Samaha, R.R., Creelman, R., Pilgrim, M., Broun, P., Zhang, J.Z., Ghandehari, D., Sherman, B.K., Yu, C.L. (2000) *Arabidopsis* transcription factors: Genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *SCIENCE* - (290): 2105-2110.
- Riesner, D., Steger, G., Zimmat, R., Owens, R.A., Wagenhofer, M., Hillen, W., Vollbach, S., Henco, K. (1989) Temperature-gradient gel-electrophoresis of nucleic-acids - analysis of conformational transitions, sequence variations, and protein-nucleic acid interactions. *ELECTROPHORESIS* - (10): 377-389.
- Salazar, L.F., Hammond, R.W., Diener, T.O., Owens, R.A. (1988) Analysis of viroid replication following *Agrobacterium*-mediated inoculation of non-host species with potato spindle tuber viroid cDNA. *JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY* - (69): 879-889.
- Sano, T., Uyeda, I., Shikata, E., Ohno, T., Okada, Y. (1984) Nucleotide-sequence of cucumber pale fruit viroid - homology to hop stunt viroid. *NUCLEIC ACIDS RESEARCH* - (12): 3427-3434.

- Sano, T., Mimura, R., Ohshima, K. (2001) Phylogenetic analysis of hop and grapevine isolates of hop stunt viroid supports a grapevine origin for hop stunt disease. *VIRUS GENES* - (22): 53-59.
- Schauer, S.E., Jacobsen, S.E., Meinke, D.W., Ray, A. (2002) *DICER-LIKE1*: blind men and elephants in *Arabidopsis* development. *TRENDS IN PLANT SCIENCE* - (7): 487-491.
- Schmitz, G., Theres, K. (2005) Shoot and inflorescence branching. *CURRENT OPINION IN PLANT BIOLOGY* - (8): 506-511.
- Schumacher, J., Meyer, N., Riesner, D., Weidemann, H.L. (1986) Diagnostic procedure for detection of viroids and viruses with circular RNAs by return-gel electrophoresis. *JOURNAL OF PHYTOPATHOLOGY-PHYTOPATHOLOGISCHE ZEITSCHRIFT* - (115): 332-343.
- Shewmaker, C.K., Sheehy, J.A., Daley, M., Colburn, S., Ke, D.Y. (1999) Seed-specific overexpression of phytoene synthase: increase in carotenoids and other metabolic effects. *PLANT JOURNAL* - (20): 401-412.
- Stevens, J.F., Page, J.E. (2004) Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health! *PHYTOCHEMISTRY* - (65): 1317-1330.
- Stracke, R., Werber, M., Weisshaar, B. (2001) The *R2R3-MYB* gene family in *Arabidopsis thaliana*. *CURRENT OPINION IN PLANT BIOLOGY* - (4): 447-456.
- Tabler, M., Tsagris, M. (2004) Viroids: petite RNA pathogens with distinguished talents. *TRENDS IN PLANT SCIENCE* - (9): 339-348.
- Tsagris, M., Tabler, M., Muhlbach, H.P., Sanger, H.L. (1987) Linear oligomeric potato spindle tuber viroid (PSTV) RNAs are accurately processed in vitro to the monomeric circular viroid proper when incubated with a nuclear extract from healthy potato cells. *EMBO JOURNAL* - (6): 2173-2183.
- Voinnet, O. (2001) RNA silencing as a plant immune system against viruses. *TRENDS IN GENETICS* - (17): 449-459.
- Wang, M.B., Bian, X.Y., Wu, L.M., Liu, L.X., Smith, N.A., Isenegger, D., Wu, R.M., Masuta, C., Vance, V.B., Watson, J.M., Rezaian, A., Dennis, E.S., Waterhouse, P.M. (2004) On the role of RNA silencing in the pathogenicity and evolution of viroids and viral satellites. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA* - (101): 3275-3280.

- Warrilow, D., Symons, R.H. (1999) Citrus exocortis viroid RNA is associated with the largest subunit of RNA polymerase II in tomato in vivo. *ARCHIVES OF VIROLOGY* - (144): 2367-2375.
- Weston, K. (1998) Myb proteins in life, death and differentiation. *CURRENT OPINION IN GENETICS & DEVELOPMENT* - (8): 76-81.
- Woo, Y.M., Itaya, A., Owens, R.A., Tang, L., Hammond, R.W., Chou, H.C., Lai, M.M.C., Ding, B. (1999) Characterization of nuclear import of potato spindle tuber viroid RNA in permeabilized protoplasts. *PLANT JOURNAL* - (17): 627-635.
- Wray, G.A., Hahn, M.W., Abouheif, E., Balhoff, J.P., Pizer, M., Rockman, M.V., Romano, L.A. (2003) The evolution of transcriptional regulation in eukaryotes. *MOLECULAR BIOLOGY AND EVOLUTION* - (20): 1377-1419.
- Xie, Z.X., Johansen, L.K., Gustafson, A.M., Kasschau, K.D., Lellis, A.D., Zilberman, D., Jacobsen, S.E., Carrington, J.C. (2004) Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLOS BIOLOGY* - (2): 642-652.
- Yamazaki, M., Makita, Y., Springob, K., Saito, K. (2003) Regulatory mechanisms for anthocyanin biosynthesis in chemotypes of *Perilla frutescens* var. *crispa*. *BIOCHEMICAL ENGINEERING JOURNAL* - (14): 191-197.
- Ye, X.D., Al-Babili, S., Klöti, A., Zhang, J., Lucca, P., Beyer, P., Potrykus, I. (2000) Engineering the provitamin A (beta-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *SCIENCE* - (287): 303-305.
- Zhang, B.H., Pan, X.P., Cobb, G.P., Anderson, T.A. (2006) Plant microRNA: A small regulatory molecule with big impact. *DEVELOPMENTAL BIOLOGY* - (289): 3-16.
- Zhu, Y.L., Green, L., Woo, Y.M., Owens, R., Ding, B. (2001) Cellular basis of potato spindle tuber viroid systemic movement. *VIROLOGY* - (279): 69-77.
- Zhu, Y.L., Qi, Y.J., Xun, Y., Owens, R., Ding, B. (2002) Movement of potato spindle tuber viroid reveals regulatory points of phloem-mediated RNA traffic. *PLANT PHYSIOLOGY* - (130): 138-146.

7.2. Sekundární citace

- Knabel, S., Seigner L., Wallnöfer P. R. (1999) Nachweis des Hop latent Viroids (HLVd) mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR). *GESUNDE PFLANZEN* - (51): 234-239.
- Shikata, E. (1990) New viroids from Japan. In: *SEMIN. VIROLOGY* - (1): 107-115.

8. POUŽITÉ ZKRATKY

aa: aminokyseliny

cDNA: „complementary/copy DNA“

DEAE: diethylaminoethyl (celulóza)

EtBr: ethidiumbromid

HPLC: „High-Performance Liquid Chromatography“

IAA: *iso*-amylalkohol

NEB: New England Biolabs

PCR: „Polymerase Chain Reaction“, polymerázová řetězová reakce

RT-PCR: „reverse transcriptase“-PCR

TF: transkripční faktor(y)