

**Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity
v Českých Budějovicích**



**Aktivace vybraných rostlinných promotorů v systému
leaf factory v závislosti na přítomnosti supresorů
silencingu a viroidní infekce**

Bakalářská práce

Martin Selinger

Vedoucí práce: RNDr. Jaroslav Matoušek, CSc.

ÚMBR BC AVČR, v.v.i.

České Budějovice 2011

Selinger M., 2011: Aktivace vybraných rostlinných promotorů v systému leaf factory v závislosti na přítomnosti supresorů silencingu a viroidní infekce [Activation of selected plant promoters in leaf factory system dependent on the presence of silencing suppressors and viroid infection, Bc. Thesis, in Czech] – 45 p., Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation: We analyzed activation of VSF1 promoter in *Nicotiana benthamiana* plants infected with different strains of PSTVd in presence of p19 and 2b silencing suppressors. Activation of VSF1 promoter was measured by GUS (β -glucuronidase) reference gene activity developed in leaf factory system (*in planta* incubation after agro-infiltration of analyzed promoter).

Key words: VSF1 promoter, PSTVd strains, *N. benthamiana*, agro-infiltration, silencing suppressor

Matoušek J., Fussy, Z., Orctová, L., Kocábek, T., **Selinger, M.**, Škopek, J., Ptáček, J., Stehlík, J. Heyerick, A. and Steger, G. (2008) Pospiviroid pathogenesis as a developmental process involving and modulating the expression of transcription regulation factors. Viroid-2008 International Conference on Viroids and Viroid-like RNAs Berlin, Otto Hahn building

Matoušek, J., Stehlík, J., Orctová, L., Duraisamy, G. S., **Selinger, M.**, Füssy, Z., Steger, G. (2010) The sequence differences between potato spindle tuber viroid variants PSTVd-C3, evolved in *Chamomilla recutita*, and PSTVd-AS1 suggest diverse primary targets of viroid pathogenesis. In: *EMBO/EMBL Symposium: Non-Coding Genome*, Heidelberg, Germany, October 13-16, p. 208

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Přírodovědeckou fakultou - elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

Poděkování:

Rád bych poděkoval svému školiteli RNDr. Jaroslavu Matouškovi, CSc. za odborné vedení mé práce a za cenné rady a připomínky. Dále bych rád poděkoval kolektivu laboratoře Molekulární genetiky za pomoc a rady při řešení laboratorních úkolů a za ochotné zodpovídání mých dotazů.

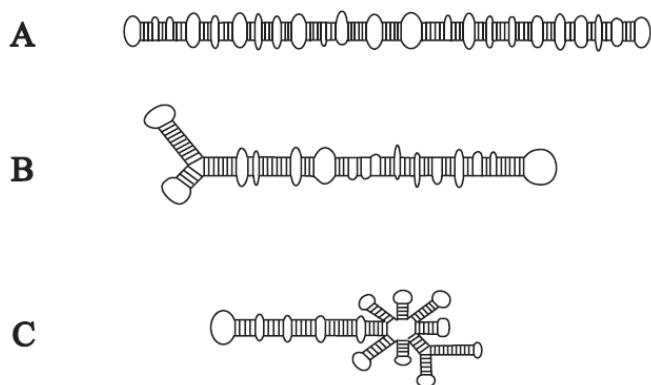
Obsah:

1. Úvod.....	1
1.1. Viroidy.....	1
1.2. Patogeneze viroidů a RNA silencing.....	4
1.3. Transkripční faktory.....	6
1.4. Supresory silencingu.....	9
1.5. Systém leaf factory a agro-infiltrace.....	9
1.6. Cíle práce.....	10
2. Metody a materiál.....	11
2.1. Materiál.....	11
2.1.1. Rostlinný materiál.....	11
2.1.2. Biochemický materiál.....	11
2.1.3. Primery.....	11
2.2. Metodické postupy.....	12
2.2.1. Transformace bakterií <i>Escherichia coli</i>	12
2.2.2. Transformace bakterií <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	12
2.2.3. Transformace rostlin <i>N. benthamiana</i> pomocí <i>A. tumefaciens</i>	13
2.2.4. Elektroforéza DNA na agarózovém gelu.....	14
2.2.5. Izolace DNA fragmentu z agarózového gelu (QIAquick Gel Extraction Kit)....	15
2.2.6. Izolace DNA fragmentu z agarózového gelu (QIAEX® II Gel Extraction Kit) ..	15
2.2.7. Izolace plazmidů (QIAGEN Plasmid Purification Kit).....	16
2.2.8. Izolace rostlinné RNA.....	16
2.2.9. Ligační reakce.....	17
2.2.10. Restrikční reakce.....	17
2.2.11. PCR.....	18
2.2.12. Přečistění DNA fenol-chloroformem.....	19
2.2.13. Metody molekulární hybridizace.....	19
2.2.14. Aktivace <i>A. tumefaciens</i> a listová infiltrace.....	24
2.2.15. Měření aktivity GUS (referenční gen pro β -glukuronidázu).....	24
3. Výsledky.....	26
3.1. Konstrukce vektorů pro viroidní infekce a ověření jejich infekčnosti.....	26
3.2. Měření aktivity vybraných promotorů.....	29
3.3. Analýza pVSF <i>in silico</i>	32
3.4. Charakterizace <i>N. benthamiana</i> transformovaných PSTVd AS1.....	34
4. Diskuze.....	36
6. Použité zkratky.....	40
7. Citovaná literatura.....	41

1. Úvod

1.1. Viroidy

Viroidy jsou nejmenší známí submolekulární parazité vyšších rostlin. Jejich objev a pojmenování je připisováno Theodoru O. Dienerovi (Diener et al., 1971). Jedná se o krátké infekční jednořetězcové molekuly RNA (246-401 nukleotidů). Tyto molekuly jsou cirkulární a kovalentně uzavřené, tvořící tak specifickou sekundární strukturu, ve které se střídají kovalentně uzavřené dvouřetězcové úseky s jednořetězcovými smyčkami (Obr. 1). Cirkulární RNA molekula viroidů je zcela „holá“, což znamená, že ji neobaluje žádný proteinový plášť jako u virů. Dále se u viroidů neprokázala translační aktivita, hovoříme tedy o nekódujících RNA. Vzhledem k absenci translační aktivity jsou tedy plně odkázány na hostitelské proteiny a enzymy (narozdíl od RNA virů, které si v hostitelské buňce vytváří řadu vlastních proteinů



Obr. 1: Schématické znázornění sekundárních struktur viroidů: PSTVd (A), ASBVd (B) a PLMVd (C). Převezto z Góra-Sochacka (2004).

či enzymů). Viroidy jsou také na rozdíl od satelitních RNA schopny autonomně se replikovat v rostlinné hostitelské buňce. Pohyb viroidů na mezibuněčné úrovni je uskutečňován přes plazmodezmata (Ding et al., 1997), systémově pak skrze cévní svazky, a to konkrétně přes floém (Tabler et al., 2004, Flores et al., 2004, Flores et al., 2005).

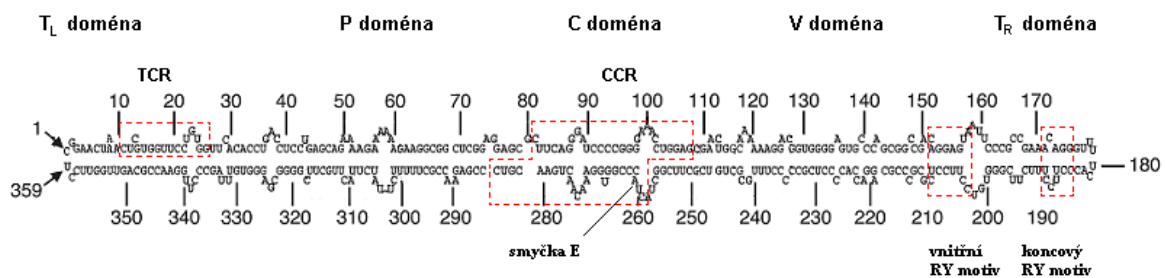
Původ viroidů není zcela objasněn. Existují dvě hlavní hypotézy – první hypotéza pokládá viroidy díky své „jednoduchosti“ (holá RNA molekula, přítomnost jednoduchých ribozymů, absence translační aktivity) za pozůstatky RNA světa, tedy tzv. „RNA fosílie“. Druhá hypotéza naopak pokládá viroidy za vysoce přizpůsobené a evolučně poměrně mladé transkripční parazity schopné se rychle přizpůsobit změnám v rostlinném metabolismu (Tabler et al., 2004, Flores et al., 2004).

Z dosavadních výzkumů bylo dokázáno, že prakticky každý nukleotid je funkční a pod určitou selekcí (Tabler et al., 2004). Záměna pouze jednoho či několika nukleotidů je schopna zapříčinit dramatickou změnu virulence viroidu či změnit jeho specifitu pro hostitelskou rostlinu (Matoušek et al., 2007, Matoušek et al., 2010, Wassenegger et al., 1996). Existuje však určitá sekvenční variabilita (zvláště v P doméně), která viroidům zaručuje dostatečnou

flexibilitu v přizpůsobivosti vzhledem k rostlinným hostitelům a jejich metabolickým pochodům. Například tepelný stres, kterému byly vystaveny rostliny *Nicotiana benthamiana* infikované viroidem PSTVd, způsobil určité mutace právě v levé části sekundární struktury, kde se nachází P doména (Matoušek et al., 2004a).

Sekundární struktura viroidů je jedním z nejdůležitějších faktorů jejich biologické aktivity – komplementárně uzavřená RNA molekula s mnohými smyčkami vytváří několik specifických signálů pro hostitelské faktory a enzymy, které se přímo či nepřímo podílejí na životním cyklu viroidů v rostlině (Zhong et al., 2008, Kalantidis et al., 2007). Sekundární struktura dále pravděpodobně hraje roli v rezistenci některých viroidů vůči RISC-komplexu, a tedy brání jejich degradaci při RNA-silencingu (Itaya et al., 2007, Wang et al., 2004).

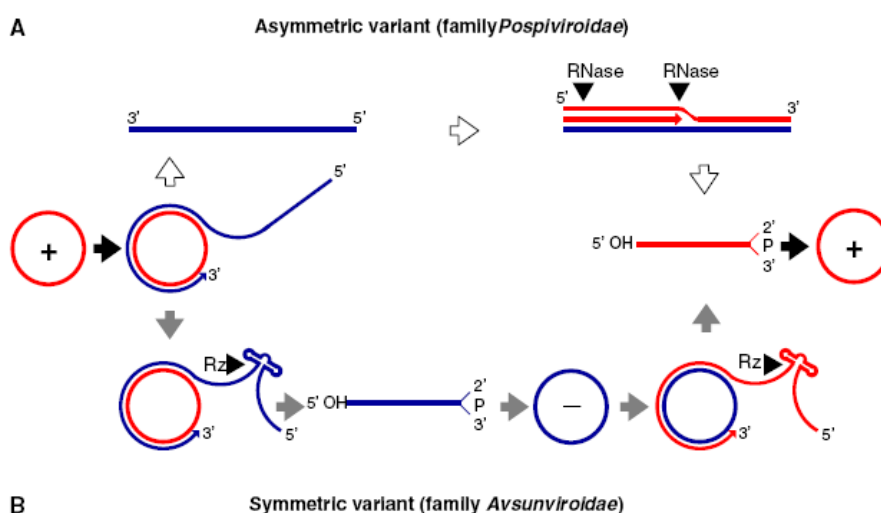
Taxonomicky jsou viroidy rozděleny do dvou čeledí. Do čeledi *Pospiviroidae* patří více jak 24 druhů viroidů rozdělených do 5 rodů (*Apscaviroid*, *Cocaviroid*, *Coleviroid*, *Hostuviroid* a *Pospiviroid*). Jejich typická sekundární tyčkovitá struktura je rozdělena na 5 strukturních a funkčních domén (Obr. 2). Centrální doména obsahuje centrální konzervovaný region – CCR (central conserved region). V T_L doméně se může nacházet koncový konzervovaný region (TCR – terminal conserved region) a koncová konzervovaná smyčka (TCH – terminal conserved hairpin). Podle odlišnosti sekvence CCR a přítomnosti či nepřítomnosti TCR a TCH se zástupci čeledi *Pospiviroidae* rozdělují do výše zmiňovaných rodů (Flores et al., 2004). U většiny zástupců skupiny *Pospiviroidae* se v T_R doméně nachází tzv. RY motiv, odpovědný za specifické vázání proteinu Virp1 (Viroid RNA-binding protein 1), obsahující jaderný signál a pravděpodobně transportuje molekuly viroidů do buněčného jádra. Tyto motivy existují dva – vnitřní a koncový, ale silněji se projevuje motiv koncový (Maniataki et al., 2003). Zástupci této čeledi se replikují v jádře hostitelské buňky v asymetrickém replikačním cyklu (Obr. 3). Mezi nejznámější zástupce čeledi *Pospiviroidae* patří například PSTVd (Potato spindle tuber viroid), CEVd (Citrus exocortis viroid) a HSVd (Hop stunt viroid), (Flores et al., 2004, Daròs et al., 2006).



Obr. 2: Sekundární struktura viroidu PSTVd-AS1; znázornění strukturních domén: T_L doména (zahrnující TCR), P doména, C doména (zahrnující CCR), V doména a T_R doména (zahrnující oba RY motivy poutající Virp1). Smyčka E, nacházející se v CCR, je funkční doména nacházející se v mnoha RNA, u viroidů se podílí na procesu ligace monomerních PSTVd (+) RNA transkriptů.

Čeď *Avsunviroidae* zahrnuje podstatně méně druhů rozdělených do 2 rodů (*Avsunviroid* a *Pelamoviroid*). V čeďi *Avsunviroidae* je tyčkovitá sekundární struktura typická pro ASBVd (Avocado sunblotch viroid) a ELVd (Eggplant latent viroid), viz Obr. 1-B, ovšem další zástupci (např. CChMVD - Chrysanthemum chlorotic mottle viroid a PLMVd - Peach latent mosaic viroid) mají značně rozvětvenou sekundární strukturu (Obr. 1-C). Na rozdíl od čeďi *Pospiviroidae* zástupci čeďi *Avsunviroidae* postrádají centrální konzervovanou doménu (CCR). Replikace probíhá v chloroplastech za přítomnosti jaderné RNA – polymerázy v symetrickém replikačním cyklu (Obr. 3). Dalším zajímavým faktorem této čeďi je přítomnost ribozymů – jedná se o malý RNA motiv, který se při pokojové teplotě, neutrálním pH a v přítomnosti dvojmocného kovu (nejčastěji Mg^{2+}) sám štěpí a vytváří 2',3'-fosfodiesterový a 5'-OH konec (Flores et al., 2004).

Replikace viroidů probíhá mechanismem valivé kružnice pomocí hostitelských DNA-dependentních RNA-polymeráz (Tablet et al., 2004), které za normálních okolností katalyzují syntézu mRNA podle templátového (-) DNA řetězce. Mechanismus, který donutí tyto polymerázy katalyzovat polymeraci podle RNA templátu, není však dosud objasněn. V průběhu replikace obou čeďí jsou přítomny pouze RNA intermediáty. Zástupci čeďi *Pospiviroidae* se replikují v jádře za pomoci RNA-polymerázy II, zatímco zástupci čeďi *Avsunviroidae* se replikují v chloroplastech pomocí jaderné RNA-polymerázy často označované jako NEP - nuclear-encoded polymerase (Daros et al., 2006). U druhu PSTVd můžeme nalézt tři iniciační místa pro replikaci *in vivo* - A111, G168 a A325 (Tablet et al., 2004).



Obr. 3: Schéma replikace obou čeďí: **A) *Pospiviroidae*:** infekční monomerní (+) cirkulární RNA → replikace (RNA polymeráza II) na „hlava-ocas“ (-) multimery, které slouží jako templáty pro druhou RNA-RNA replikaci → výsledné „hlava-ocas“ multimery (+) jsou štěpeny na jednotlivé monomery (hostitelské RNázy) → ligace (RNA ligáza) na konečné cirkulární RNA; **B) *Avsunviroidae*:** infekční monomerní (+) cirkulární RNA → replikace (NEP) na „hlava-ocas“ (-) multimery → štěpení pomocí ribozymů na jednotlivé monomery (-) → replikace na „hlava-ocas“ (+) multimery → štěpení pomocí ribozymů na jednotlivé monomery (+) → ligace na konečné cirkulární RNA. Převzato z Flores et al. (2004).

1.2. Patogeneze viroidů a RNA silencing

Viroidy způsobují vážná onemocnění u mnoha vyšších rostlin. Symptomy typické pro viroidní infekci jsou například zakrslost, epinastie, nekrózy, chlorotické a nekrotické léze, poruchy vývoje určitých orgánů a vzácně i smrt rostliny (Flores et al., 2005, Owens et al., 2009).

Viroidní patogeneze je velmi specifický proces, u kterého záleží na genotypu viroidu a genotypu hostitelské rostliny. Například odlišné kultivary rajčete (*L. esculentum*) jsou různě senzitivní pro stejný kmen viroidu PSTVd (Matoušek et al., 2007). Při určitých kombinacích hostitelských rostlin a specifického viroidu můžeme tedy dosáhnout symptomů silných, mírných anebo symptomy nemusí být vůbec detekovány. Projev symptomů může být však závislý i na fyzikálních podmínkách - exprese symptomů je obecně podporována větší intenzitou světla a vyšší teplotou (Flores et al., 2005).

Mechanismy viroidní patogeneze nejsou dosud zcela objasněny. Exprese symptomů typických pro viroidní infekci je pravděpodobně výsledkem složitých interakcí viroidní RNA a buněčných faktorů, které vedou ke změnám ve vývoji, metabolismu a fyziologii hostitelských rostlin.

Jednou z takovýchto interakcí je například přímé ovlivnění exprese určitého genu či funkce určitých transkripčních faktorů. Viroid PSTVd například transkripčně aktivuje kinázu PKV (protein kinase yiroid-induced, GenBank Accession no. AF143505) v rostlinách rajčete (Hammond et al., 2000). Jedná se serinovou-threoninovou kinázu z třídy AGC VIIIA signálních kináz. Funkce PKV v rajčeti není dosud zcela jasná, existují však důkazy o jejím zapojení v signálních drahách giberelinů (Hammond et al., 2009). Kmen PSTVd-AS1 také pravděpodobně aktivuje expresi apoptotických nukleáz, například v rajčeti objevenou nukleázu – TBN1 (tomato bifunctional nuclease 1, AC: AM238701) (Matoušek et al., 2007).

Další a dnes nejvíce zkoumanou možností viroidní patogeneze je úloha viroidů v procesu tzv. RNA silencing. Jedná se o regulační a obranný mechanismus mnohých eukaryotních organismů, který spočívá v sekvenčně-specifické degradaci RNA či úpravě DNA pomocí malých (21-26 nukleotidů) regulačních RNA molekul. Tyto malé RNA molekuly jsou rozděleny do 2 tříd podle vzniku a mechanismu působení – miRNA (micro RNA) a siRNA (small interfering RNA). Regulace může probíhat na úrovni iniciace transkripce (TGS – transcriptional gene silencing) nebo na postranskripční úrovni degradací RNA (PTGS – post-transcriptional gene silencing) (Flores et al., 2005, Vaucheret, 2004).

miRNA molekuly (21-24 nukleotidů) jsou endogenního původu. Vzniklé prekursory miRNA (nekódující jednořetězcové transkripty) vytvářejí vlásenkovou strukturu s částečnými dvouřetězcovými úseky. Prekursory jsou následně štěpeny enzymy rodiny DCL (Dicer-like) patřícím do třídy RNáz typu III. Vzniklé miRNA jsou poté inkorporovány do ribonukleoproteinového komplexu RISC (RNA-induced silencing complex) s RNázovou aktivitou, který na základě komplementarity vyhledává cílové molekuly mRNA. miRNA molekuly tedy hrají roli v PTGS, kdy regulují expresi zejména vývojových genů pomocí sekvenčně-specifické degradace příslušných mRNA či inhibice transkripce (Carrington et al., 2004, cit. dle Flores et al., 2005).

siRNA molekuly (21-26 nukleotidů) jsou zejména exogenního původu a jsou zapojeny jak v procesu TGS, tak i PTGS. Při TGS negativně regulují genovou expresi siRNA-řízenou methylací DNA. Jedná se o proces, který je u rostlin spojený s modifikací histonů (Flores et al., 2005). Proces PTGS spojený s siRNA je eukaryoty využíván zejména jako obrana proti virům a satelitním RNA. Spouštěčem tohoto mechanismu je dsRNA, která je štěpena opět enzymem DCL na siRNA molekuly. Ty jsou inkorporovány do RISC komplexu, jenž následně degraduje ssRNA komplementární k integrovaným siRNA (Baulcombe et al., 2004, cit. dle Flores et al., 2005). Proces PTGS probíhá v cytoplazmě, u PSTVd a jiných druhů čeledi *Pospiviroidae* by mohl však být lokalizován i v jádře. Např. v genomu *A. thaliana* byly identifikovány 4 druhy Dicerů, z toho 2 druhy (DCL1 a DCL4) obsahují jaderný lokalizační signál (Schauer et al., 2002, cit. dle Tabler et al., 2004).

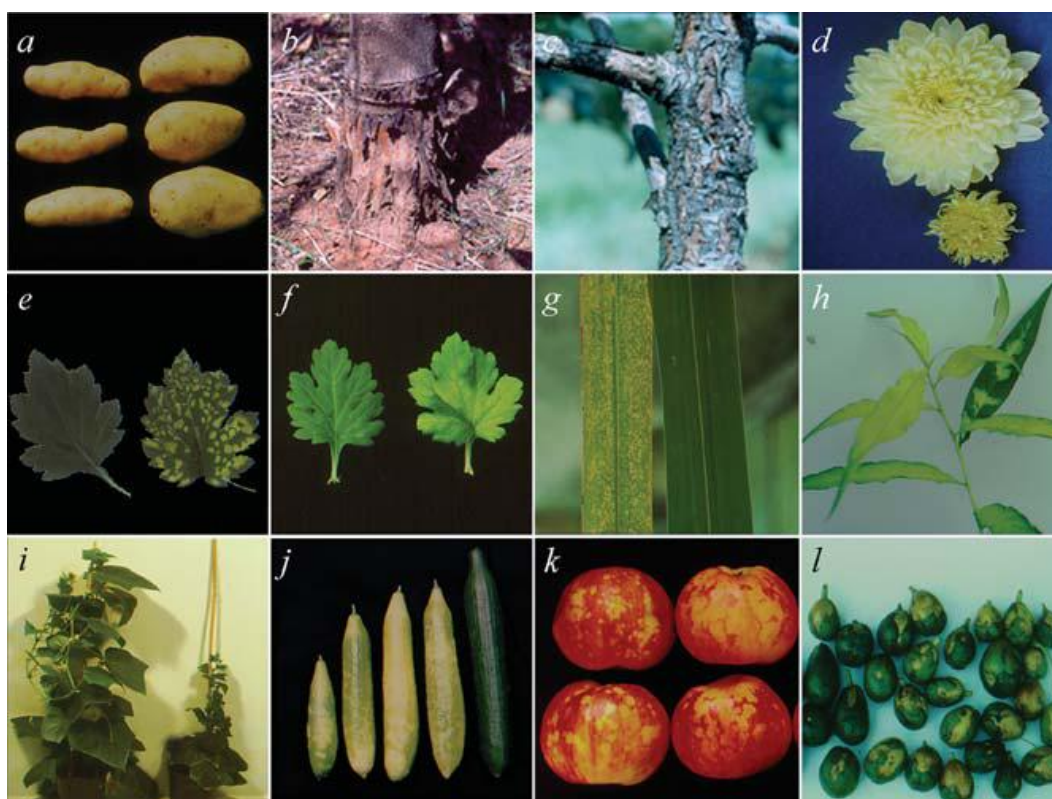
Důkazem o probíhajícím PTGS v rostlině jsou pak sekvenčně specifické siRNA molekuly. Role viroidů jako spouštěčů PTGS je potvrzována přítomností viroid-specifických siRNA molekul v rostlinách prokazatelně infikovaných viroidem (Matoušek et al., 2007; Itaya et al., 2001; Papaefthimiou et al., 2001; Martínez et al., 2002). Úlohu viroid-specifických siRNA v projevu symptomů u napadených rostlin podporuje i experiment Wang, který prokázal, že u rostlin rajčete (*L. esculentum*) k projevu symptomů stačí i nereplikativní fragment viroidu PSTVd produkující siRNA (Wang et al., 2004).

Dalším důkazem potvrzujícím spojení mezi viroidní patogenezí a PTGS je závislost projevu symptomů u rostlin infikovaných HSVd na aktivitě RDR6 (RNA-dependent RNA polymerase 6). RDR6 je jedním z klíčových enzymů kaskády PTGS, neboť syntézou 2. řetězce RNA tvoří z ssRNA dsRNA, která je substrátem pro DCL při PTGS (Gómez et al., 2008). Dále byla pozorována silná korelace mezi projevem symptomů a viroid-specifickým PTGS, kdy se u rostlin infikovaných HSVd a pěstovaných při teplotě inhibující proces PTGS

(14 °C) neprojevíly symptomy na rozdíl od rostlin pěstovaných při 28 °C, přičemž u obou variant byla detekována vysoká hladina HSVd (Gómez et al., 2008).

Představou tedy je, že produkované viroid-specifické siRNA mohou hrát roli miRNA a degradují mRNA či inhibují translaci určitých regulačních enzymů či transkripčních faktorů v hostitelské rostlině.

Studium viroidní patogeneze je tedy zásadní ze zemědělského hlediska - jako parazité vyšších rostlin způsobují závažná onemocnění u některých kulturních plodin (Obr. 4) či negativně ovlivňují hladinu významných sekundárních metabolitů (Matoušek et al., 2001). A dále pak také z hlediska molekulárně biologického, kde slouží jako „modelové organismy“ pro výzkum regulační úlohy malých RNA v eukaryotní buňce (Ding et al., 2007).

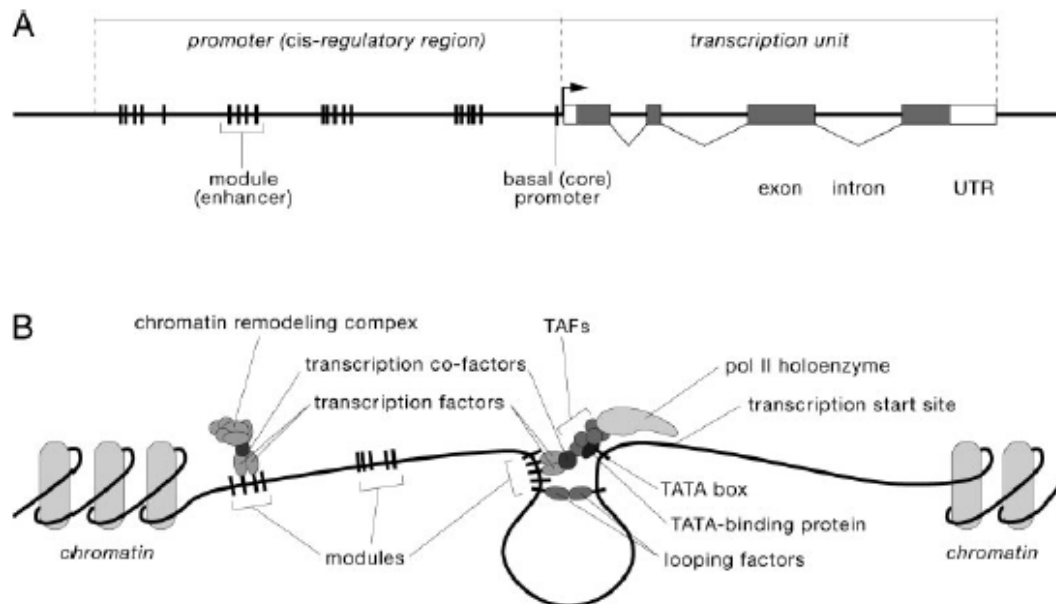


Obr. 4: Symptomy typické pro určité zástupce viroidů: (a) PSTVd na bramb. hlízách (nalevo) a zdravé (napravo), (b) CEVd u kořene pomerančovníku, (c) PBCVd na hrušce A20, (d) CSVd u květu chryzantémy (dole) a zdravé (nahore), (e) CSVd na listech chryzantémy (vpravo) a zdravé (nalevo), (f) CChMVd na listech chryzantémy (vpravo) a zdravé (vlevo), (g) CCCVd na listech kokosové palmy (vlevo) a zdravé (vpravo), (h) chloróza (peach calico) způsobená PLMVd, (i) zkracování internodií u okurky způsobené HSVd (vpravo) a zdravé (vlevo), (j) HSVd na okurkách (4 zleva) a zdravá (vpravo), (k) skvrnitost jablek způsobená ASSVd, (l) ASBVd symptomy na plodech avokáda. Převzato z Flores et al. (2005).

1.3. Transkripční faktory

Iniciace transkripce u eukaryotních organismů se vyznačuje kooperací specificky se vázících proteinů, transkripčních faktorů (TF), a RNA-polymerázy vytvářející tak složitý iniciační komplex (Obr. 5-B). Díky tomu zde vzniká prostor pro jemnou regulaci genové exprese založený na specifické vazbě TF na DNA *cis*-element či jiný TF. Mimo přímou

interakci s transkripčním aparátem ovlivňují TF i funkce proteinů remodelace chromatinu. Veškeré působení TF je iniciováno určitým vývojovým, hormonálním či environmentálním signálem. TF tedy působí jako aktivátory či jako represory transkripce, kdy v konečném důsledku zvyšují či snižují hladinu mRNA regulovaného genu.



Obr. 5: (A) Organizace obecného eukaryotního genu naznačující relativní pozice transkribovaného úseku, promotoru a vazebných míst pro transkripční faktory (B) Idealizovaný promotor při aktivaci - iniciace transkripce vyžaduje specifickou spolupráci několika desítek proteinů, včetně komplexu RNA polymerázy II, TATA-binding proteinu (TBP), TAF proteinů (TBP-associated factors neboli obecné transkripční faktory), transkripční faktory a kofaktory a komplex remodelace chromatinu. Převzato z *Wray et al.* (2003).

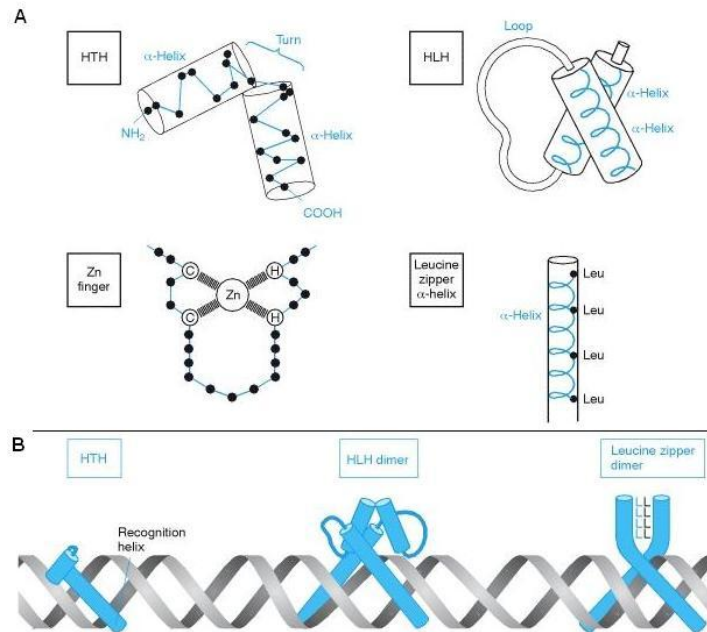
Transkripční faktory obsahují několik funkčních domén, determinujících tak jejich funkci a specifitu (Liu et al., 1999):

1) DNA-vazebné domény obsahují charakteristické strukturní motivy složené z určitých aminokyselinových zbytků, které zajišťují sekvenčně specifickou vazbu TF na DNA v místě *cis*-elementů. Mezi tyto strukturní motivy patří například leucinový zip, zinkové prsty, motiv helix-otáčka-helix („helix-turn-helix“ – HTH) či motiv helix-smyčka-helix („helix-loop-helix“ – HLH), viz Obr. 6. Další aminokyselinové postranní řetězce nacházející se v doméně zlepšují vazbu TF pomocí nespécifické interakce s fosfátem či deoxyribózou.

2) oligomerizační domény zajišťují formaci hetero- a/nebo homopolymerů TF. Ovlivňují tak vazebnou specifitu, afinitu TF k promotorovým elementům a jadernou lokalizaci. Vzniklé oligomery jsou stabilizovány hydrofobními či hydrofilními interakcemi mezi postranními aminokyselinovými zbytky.

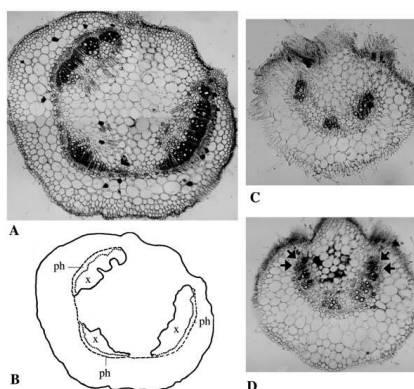
3) transkripčně regulační domény, které jsou zodpovědné za aktivaci či represii funkce daného TF.

4) NLS („nuclear localization signal“) – jedná se o úsek TF bohatý na argininové nebo lysinové zbytky zajišťující selektivní transport TF do jádra. Existují TF bez NLS, u nichž se předpokládá, že jsou do jádra importovány pomocí dimerizace s proteiny vlastními NLS (Goldfarb et al., 1994 cit. dle Liu et al., 1999).



Obr. 6: (A) Schématické znázornění strukturálních motivů nacházejících se v TF a DNA-vazebných proteinech (B) Schématické znázornění interakce DNA-protein u vybraných strukturálních motivů. Převzato z Strachan et al. (1999).

V této práci byla studována aktivace promotoru transkripčního faktoru VSF-1 (vs-1 binding factor). Tento TF nasedá na 28 bp dlouhý DNA element zvaný vs-1 (vein-specific) nacházející se v promotoru genu *grp1.8* (glycine-rich protein) v rostlinách fazolu. Gen *grp1.8* je činností VSF-1 a dalších faktorů specificky exprimován pouze v buňkách xylému a výsledný strukturální protein GRP1.8 je zabudováván do buněčných stěn vznikajících tracheí. Faktor VSF-1 je charakterizován bazickou doménou následovanou motivem leucinového zipu (bZIP doména), pomocí kterých se váže na vs-1 element a aktivuje tak vaskulárně-specifickou expresi *grp1.8* (Torres-Schumann et al., 1996). Studium aktivace promotoru VSF-1 bylo prováděno na pozadí viroidní infekce, neboť bylo zjištěno, že kmen PSTVd AS1, který je letální pro *L. esculentum*, vyvolává u experimentálních rostlin rajčete výraznou degradaci xylému v řapících listů (Matoušek et al., 2007) – viz Obr. 7.



Obr. 7: Příčný řez řapíky listů zdravých a PSTVd infikovaných rostlin *L. esculentum* - (A) zdravá rostlina; (B) schématický náčrt obrázku A, kde ph – floém, x – xylém; (C) PSTVd AS1 infikovaná rostlina – 63 dpi, 70 dní stará rostlina; (D) rostlina infikována PSTVd QFA – 22 dpi, 30 dní stará rostlina; zvětšení 51x (převzato z Matoušek et al., 2007).

1.4. Supresory silencingu

PTGS neslouží pouze jako regulační mechanismus, ale zejména jako obrana proti virům na molekulární úrovni. Existují však proteiny produkované virem, které inhibují PTGS v napadeném organismu, tzv. supresory silencingu. Supresory silencingu interagují s různými komponenty kaskády PTGS inhibující tak tento proces různými způsoby. Virové supresory silencingu nejsou specializovanými makromolekulami, jedná se o enzymy či proteiny s různou funkcí, které však dodatečně potlačují silencing v napadené rostlině.

Například supresory p15 (*Pecluvirus*), p19 (*Tombusvirus*) a HC-Pro (*Potyvirus*) váží siRNA molekuly, čímž blokují jejich navázání do RISC-komplexu (Méraï et al., 2006; Silhavy et al., 2002; Lakatos et al., 2006). Naproti tomu supresor 2b z viru mozaiky okurky (*Cucumber mosaic virus*) se váže na Argonaute-1 protein (AGO1), čímž inhibuje restriční aktivitu RISC-komplexu, jehož je AGO1 součástí (Zhang et al., 2006). Supresor p25 (*Potyvirus*) rovněž interaguje s AGO1, ovšem s tím rozdílem, že po navázání zprostředkovává jeho degradaci (Chiu et al., 2010). Supresor p38 (*Carmovirus*) inhibuje funkci DCL4 (Deleris et al., 2006), zatímco supresor AC2 (*Geminivirus*) ovlivňuje expresi hostitelských genů kódujících efektoru RNA silencingu (Trinks et al., 2005). Existuje však celá řada supresorů, u kterých není mechanismus působení doposud zcela objasněn.

1.5. Systém leaf factory a agro-infiltrace

Agrobacterium tumefaciens je gram-negativní proteobakterie napadající dvouděložné rostliny, u kterých vyvolává charakteristické nádorové bujení na kořenech. Vznik nádorů je způsoben transformací genomu rostliny pomocí speciálních bakteriálních Ti plasmidů (tumor-inducing). Ti plasmidy obsahují T-DNA region (transfer DNA), který se začlení do jaderné DNA rostliny. T-DNA region obsahuje geny, které ovlivňují tvorbu auxinu a

cytokininů, kdy nadprodukce a změněný poměr těchto fytohormonů způsobuje množení nediferenciovaných nádorových buněk (Nečásek, 1993).

Umělou úpravou Ti plasmidů, kdy zaměníme geny pro nadprodukcí fytohormonů s námi zkoumaným genem v T-DNA oblasti, byl získán efektivní systém pro transformaci rostlin pomocí rekombinantních *A. tumefaciens* (viz např. Gelvin et al., 2003). Rostliny tak mohou být pomocí agro-transformace použity jako expresní systém k produkci rekombinantních proteinů. Rekombinantní *A. tumefaciens* můžou být použity i pro systém transientní exprese, kdy jsou rekombinantní *A. tumefaciens* infiltrovány do diferenciovaných pletiv rostlin (tzv. agro-infiltrace). Většina buněk v infiltrované oblasti je pak transformována a produkuje transgen. Tento systém je výhodný zejména pro svoji rychlost, flexibilitu a možnost kombinace několika transgenů najednou (Voinnet et al., 2003). Zvýšení efektivity systému transientní exprese může být dosaženo koinfiltrací transgenů pro virové supresory silencingu, které potlačují PTGS vyvolaný přítomností cizorodé DNA (Voinnet et al., 2003).

Biotechnologický systém leaf factory využívá procesu transientní exprese po infiltraci tekuté kultury rekombinantních *A. tumefaciens* do listů *Nicotiana benthamiana* (*Solanaceae*).

1.6. Cíle práce

Cílem mé práce bylo: (1) zkonstruovat infekční vektory, obsahující dimerní fragment kontrastních kmenů PSTVd Mild a C3 ve známé orientaci pod promotorem 35S v expresním rostlinném vektoru pLV07, vhodné pro inokulaci rostlin *N. benthamiana* pomocí agro-infiltrace

(2) popsat symptomy projevené v průběhu viroidní infekce u rostlin *N. benthamiana* inokulovaných kmeny PSTVd pomocí zkonstruovaných vektorů; dále získat a charakterizovat rostliny *N. benthamiana* transformované kmenem PSTVd AS1

(3) pomocí získaných vektorů spolu s dříve připraveným vektorem pro PSTVd AS1 analyzovat změny v aktivaci vybraných rostlinných promotorů v závislosti na přítomnosti supresorů silencingu a viroidní infekce.

2. Metody a materiál

Při své práci jsem dodržoval zásady bezpečnosti práce, organizační řád BC AV ČR ÚMBR a interní směrnice oddělení molekulární genetiky BC AV ČR ÚMBR pro práci s karanténními viroidními patogeny a geneticky modifikovanými organismy a dále pak pro práci v izotopové laboratoři.

2.1. Materiál

2.1.1. Rostlinný materiál

Během práce byly použity rostliny *Nicotiana benthamiana*, cv. Samsun NN. Rostliny byly pěstovány ve skleníku při teplotě $25\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ za přirozeného denního světla a dodatečného přisvětlování ($170\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PAR) pro udržení 16-ti hodinového denního režimu.

2.1.2. Biochemický materiál

Byly použity restriční endonukleázy *AscI*, *BamHI*, *PacI*, *StyI*, *XbaI*, *XmaI* a *XhoI* s příslušnými pufry (NEB, Takara). T4 DNA ligáza (Takara) a PCR master-mixy s *Taq* polymerázou (Qiagen) a s *Pwo* polymerázou (Roche). Pro určení velikosti fragmentů při elektroforéze byl použit DNA marker (1kbp DNA ladder GibcoBRL) a RNA marker (RNA markers 9PIG319A – Promega). Při molekulární hybridizaci byl použit radioaktivní izotop α - $[^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ (3000 Ci/mmol; MP Biomedicals); dále pak nylonová membrána s upraveným nábojem a velikostí pórů $0,45\text{ }\mu\text{m}$ (Sigma) pro koloniovou hybridizaci a RNA membrána (Biodyne A Membrane $0,2\text{ }\mu\text{m}$, PALL) pro dot-blot hybridizaci a Northernový blot.

2.1.3. Primery

M13f - 5' GTT GTA AAA CGA CGG CCA GT 3'

M13r - 5' CAC AGG AAA CAG CTA TGA CC 3'

BPUCLINK-Xba: 5'-AAT TCT AGA CAG TGA ATT CGA GCT CGG TAC C-3'

BPUCLINK-Xho: 5'-GAC CTC GAG GGC CCC TGC AGG TCG ACA CTA GAG GAT C-3'

2.2. Metodické postupy

2.2.1. Transformace bakterií *Escherichia coli*

LB médium (100 ml):

1 g kazein – Tryptone
0,5 g kvasničný extrakt
1 g NaCl
upravit na pH 7,0, sterilizovat

Práce probíhala ve sterilních podmínkách. Ihned po rozmrznutí kompetentních bakterií (kmen DH5 α) na ledu jsme aplikovali 1 μ l purifikovaného plazmidu či 5 μ l ligační směsi a nechali jsme 30 minut inkubovat v ledu. Následoval 90-ti sekundový tepelný šok při 42 °C ve vodní lázni (HAAKE K20-DC1) a poté rychlé ochlazení v ledu po dobu 2 minut. Přidali jsme předeřáté LB médium (37 °C, na 200 μ l vzorku 800 μ l LB média). Následovala kultivace bakterií při 37 °C po dobu 1,5 h při 170 ot.min⁻¹ (třepačka GFL 3032). Narostlou kulturu jsme vyseli v rostoucí koncentraci na selektivní agarovou půdu (1,5% agar; kanamycin 50 mg/l nebo ampicilin 100 mg/l) a inkubovali dnem vzhůru přes noc při 37 °C.

2.2.2. Transformace bakterií *Agrobacterium tumefaciens*

LK médium (100 ml):

1 g sacharóza
0,8 g kazein – Tryptone
0,4 g kvasničný extrakt
0,2 g K₂HPO₄
30 mg MgSO₄
upravit na pH 6,8, sterilizovat

YEP médium (100 ml):

1 g kazein - Tryptone
0,5 g kvasničný extrakt
0,8 g NaCl
sterilizovat

Práce probíhala ve sterilních podmínkách. Bakterie (kmen LBA4404) jsme inokulovali do 10 ml tekutého LK média a nechali jsme přes noc růst při 28 °C při 100 ot.min⁻¹ (GFL 3032). Narostlou kulturu jsme upravili na OD₆₆₀ = 0,02 přidáním čerstvého LK média (na 200 μ l bakteriální suspenze 20 ml LK média). Bakterie jsme poté nechali inkubovat po dobu 4 h při 28 °C a 100 ot.min⁻¹ a následně jsme bakteriální suspenzi centrifugovali 5 min. při 5000 ot.min⁻¹ (Hettich UNIVERSAL 32). Supernatant jsme slili a pelet promyli 20 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,4-7,6 (objem je stejný jako původní objem média). Opět jsme bakterie nechali 5 minut centrifugovat při 5000 ot.min⁻¹. Supernatant jsme opět slili a buňky zahustili resuspendováním ve 100 μ l YEP média. Resuspendované buňky jsme přemístili do zkumavky a přidali 5 μ l plazmidové DNA (tj. 1-5 μ g). Směs jsme 5 minut inkubovali v tekutém dusíku a poté 25 minut ve vodní lázni při 37 °C (HAAKE K20-DC1). Suspenzi jsme poté zředili přidáním 0,5 ml čerstvého LK média a inkubovali 2 h při 28 °C a 100 ot.min⁻¹. Následně byla

suspenze nanesena v rostoucí koncentraci na selektivní agarovou půdu LK (1,5% agar; kanamycin 50 mg/l). Bakterie jsme nechali růst přes noc při 28 °C.

2.2.3. Transformace rostlin *N. benthiana* pomocí *A. tumefaciens*

Médium NBR1si (*Nicotiana benthiana* regenerate – shoot inducing):

MS koncentrát (Duchefa) s vitaminy B5	0,5x
sacharóza	1,5 %
agar	0,8 %
NAA (auxin; α -naphthalene acetic acid)	0,1 mg/l
BAP (cytokinin; 6-benzylaminopurin)	1mg/l

Bakterie *A. tumefaciens* s požadovaným konstruktem (č.sb. 2554) byly kultivovány v LK médiu s kanamycinem (koncentrace 50 mg/l) při 28 °C a 120 ot.min⁻¹ přes noc (třepačka GFL 3032). Po kultivaci jsme bakteriální kulturu sedimentovali stočením na 10 minut při 5000 ot.min⁻¹ (Hettich UNIVERSAL 32). Sediment jsme poté resuspendovali ve 20 ml 100 μ M MgSO₄.

Pomocí korkovače jsme odebrali několik desítek disků ze středně mladých listů ze 4-6 týdnů starých rostlin *N. benthiana* (disky nesměly obsahovat okraje listů a silnější žilnatinu). Disky jsme následně sterilizovali 15 minut v 10%-ním roztoku SAVO. Poté jsme disky 3× propláchli ve sterilní H₂O. K promytým diskům jsme následně přidali bakteriální suspenzi a inkubovali 20 minut (spodní stranou disků nahoru). Sterilně jsme následně přendali explantáty na misky s 1/2 MS médiem (Murashige and Skoog medium; bez antibiotik) a přenesli do kultivační místnosti (120 μ mol.m⁻².s⁻¹ PAR, 20 °C, 16-ti hodinový denní cyklus). Druhý den jsme explantáty sterilně přendali na misky s NBR1si médiem s antibiotiky (kanamycin 50 mg/l, ticarcilin 250 mg/l). Explantáty jsme poté nechali kultivovat v kultivační místnosti při stejných podmínkách.

Každých 14 dní jsme sterilně přenesli vzniklé kalusy na nové misky s NBR1si médiem s antibiotiky. Regeneranty jsme sterilně pasážovali do skleniček se selektivním MS médiem (kanamycin 50 mg/l, tikarcilin 250 mg/l) a kultivovali při stejných podmínkách.

Pro kontrolu byla po zakořenění regenerantů část pasážované rostliny odstříhnutá a sterilně převedena do čerstvé skleničky s MS selektivním médiem. Pokud zakořenila i tato pasáž, byla původní kořenící rostlina převedena do půdy s perlitem (kořeny rostlin byly omyty vodou pro odstranění zbytků agarového média). Květníky se zasazenými rostlinami byly přeneseny do uzavřeného těsnícího pařníku a kultivovány ve fytotronu (120 μ mol.m⁻².s⁻¹ PAR, 23 °C, 16-ti hodinový denní cyklus). Po 3-5 dnech byly pootevřeny větrací otvory na pařníku, aby klesla vzdušná vlhkost a rostliny si vytvořily kutikulu. Po dalších 5 dnech byly

větrací otvory otevřeny úplně a následně byl kryt pařníku zcela sundán. Rostliny byly ve fytostronu ponechány zhruba měsíc a následně přeneseny do skleníku pro produkci semen (*N. benthamiana* je samosprašná rostlina). Téměř zralé tobolky jsme vždy odebrali do mikrozkuřavky, kde jsme je nechali dozrát a prasknout. Získaná semena jsme následně uskladnili v mikrozkuřavce při 4 °C.

Pro získání T1 generace jsme získaná semena sterilizovali v 10%-ním roztoku SAVA 15 minut a následně jsme je 3× promyli ve sterilní H₂O. Semena jsme poté sterilně přendali na Petriho misky s MS médiem (0,8 % agar) a kanamycinem (50 mg/l). Abychom synchronizovali klíčení, nechali jsme Petriho misky se semeny 3 dny inkubovat při 4 °C. Po inkubaci byla semena kultivována v kultivační místnosti (120 μmol.m⁻².s⁻¹ PAR, 20 °C, 16-ti hodinový denní cyklus). Po 3 týdnech byl zdokumentován počet rezistentních (dlouhé kořeny) a senzitivních rostlin. Část získaných rezistentních rostlin byla poté přesazena do půdy (postup totožný s vysazením T0 generace).

Segregační test pro stanovení počtu lokusů, do kterých se začlenila T-DNA byl proveden pomocí chí-kvadrát (χ^2) testu:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^n \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i} \quad \begin{array}{l} O_i = \text{pozorovaná frekvence} \\ E_i = \text{předpokládaná frekvence} \end{array}$$

2.2.4. Elektroforéza DNA na agarózovém gelu

10×TBE pufr (1000 ml):

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

5× koncentrovaný nanášecí pufr:

0,01% xylencyanolová modř, 0,01% bromfenolová modř, 30% glycerín, 100 μg/ml EtBr, 5xTBE

Jedná se o separační metodu, kdy jsou jednotlivé fragmenty DNA odděleny v gelovitém prostředí v závislosti na jejich pohyblivosti ve stejnosměrném elektrickém poli. V tomto případě je pohyblivost fragmentů přímo úměrná jejich délce, čili kratší fragmenty se pohybují rychleji než delší.

Odvážené množství agarózy jsme přidali do odměřeného objemu pufru 1xTBE tak, abychom získali roztok agarózy o dané koncentraci. Agarózu jsme rozpustili přivedením roztoku k varu. Do roztoku ochlazeného na cca 50 °C jsme přidali ethidium bromid (na 100 ml gelu 1,7 μl zásobního roztoku EtBr – konečná koncentrace 250 ng/ml). Gel byl nalit do elektroforetické vany s upevněným hřebenem. Po ztuhnutí byl gel vložen do

elektroforetického tanku a zalit pufrem 1×TBE tak, aby hladina byla zhruba 5 mm nad gelem. Po vyndání hřebene jsme do jamek aplikovali vzorky smíchané s nanášecím pufrem v poměru. Tank s gelem a nanesenými vzorky byl připojen ke zdroji stejnosměrného napětí (OMNI-BIO BRNO Power supply model P1), přičemž vhodné napětí bylo nastaveno v závislosti na délce sledovaných fragmentů. Elektroforézu jsme nechali probíhat až do oddělení sledovaných fragmentů. Gel byl analyzován na UV transiluminátoru (Chromato-Vue TM-36, UVP) při vlnové délce 312 nm.

2.2.5. Izolace DNA fragmentu z agarózového gelu (QIAquick Gel Extraction Kit)

Tento kit byl používán při extrakci DNA fragmentů o velikosti do 1 kbp (dle výrobce lze izolovat fragmenty o velikosti 70 bp – 10 kbp).

Z agarózového gelu jsme vyřízli odpovídající fragment pod UV lampou a zvážili jsme jej (Sartorius Basic). Ke gelu jsme přidali 3× v/w pufru QG a umístili jsme jej do termobloku (OMNI-BIO Brno) nahřátého na 50 °C. Gel jsme nechali za občasného protřepání rozpustit a poté jsme přidali 1× v/w izopropanolu. Vzorek jsme rozmíchali a postupně aplikovali na kolonku Qiagen. Celý objem vzorku jsme nechali 2x protéct pomocí stolní centrifugy (HERMLE Z100M) při cca 5000 ot.min⁻¹. Následně jsme kolonku promyli 500 µl pufru QG – krátce na stolní centrifuze a poté 10 s při 13500 ot.min⁻¹ (HERMLE Z233M). Dále byla kolonka 2x promyta 650 µl pufru PE (stolní centrifuga). Promytou kolonku jsme přemístili do nové zkumavky a 5 min centrifugovali při 13 500 ot.min⁻¹ pro zbavení se zbytků pufru. Po centrifugaci jsme pomocí pipety opatrně odebrali zbytky ethanolu a do středu kolonky jsme aplikovali 50 µl předehřátého elučního pufru EB. Poté jsme provedli eluci vzorku stočením na stolní centrifuze a poté max 10 s při 13 500 ot.min⁻¹.

2.2.6. Izolace DNA fragmentu z agarózového gelu (QIAEX® II Gel Extraction Kit)

Tento kit byl používán při extrakci DNA fragmentů o velikosti nad 1 kbp (dle výrobce lze izolovat fragmenty o velikosti 40 bp – 50 kbp).

Z agarózového gelu jsme vyřízli odpovídající fragment pod UV lampou a zvážili jsme jej (Sartorius Basic). Ke gelu jsme přidali 3× v/w pufru QX₁ a 30 µl nosiče, promíchali a umístili jsme do termobloku (OMNI-BIO Brno) nahřátého na 50 °C. Gel jsme nechali za občasného protřepání rozpustit a poté jsme vzorek centrifugovali 30 s při 10 000 ot.min⁻¹ (HERMLE Z233M). Opatrně jsme odpipetovali supernatant a k sedimentu (nosič) jsme přidali 500 µl pufru QX₁ a resuspendovali. Poté jsme vzorek opět centrifugovali 30 s při 10 000 ot.min⁻¹ a supernatant odebrali. Sediment jsme 2x promyli vymraženým pufrem PE

(tzn. resuspendovat a stočit 30 s při 10 000 ot.min⁻¹) a poté jsme jej nechali 20-30 minut vyschnout v digestoři při RT. Následně jsme k vyschlému sedimentu přidali 30 µl pufru EB, resuspendovali a inkubovali 5 minut v termobloku při 50 °C. Vzorek jsme poté stočili 2 minuty při 10 000 ot.min⁻¹ a supernatant jsme přepipetovali do nové zkumavky.

2.2.7. Izolace plazmidů (QIAGEN Plasmid Purification Kit)

Přes noc narostlou bakteriální kulturu transformovaných *E. coli* v 60 ml selektivního média (kanamycin - 50 mg/l či ampicilin - 100 mg/l; inkubace při 37 °C, 120 ot.min⁻¹) jsme centrifugovali 10 min při 4000 ot.min⁻¹ (BECKMAN COULTER Avanti J-26 XPI). Po stočení jsme sediment resuspendovali v 1 ml P1 pufru (resuspendační pufr, obsahuje RNázu A). Poté jsme přidali 1,1 ml pufru P2 (lyzační pufr s NaOH a SDS) a několikrát pomalu promíchali převrácením. Lyzát jsme nechali inkubovat nejdříve 5 min při RT a poté 5 minut v ledu. Následně jsme přidali 1,2 ml P3 pufru (neutralizační pufr), několikrát jsme kyvety prudce promíchali a dali do ledu. Po 20 minutách v ledu jsme vzorek centrifugovali po 30 minut při 16 000 ot.min⁻¹ a 4 °C (BECKMAN COULTER Avanti J-26 XPI). Supernatant jsme slili do nových kyvet a aktivovali jsme kolonku (Qiagen tip-20) přidáním 1 ml pufru QBT. Poté jsme nechali přes aktivovanou kolonku 2× prokapat vzorek (slitý supernatant). Kolonka byla dále promyta 4 ml pufru QC (vymytí nečistot). Poté jsme si připravili zkumavku s 500 µl izopropanolu, do které jsme nechali promytou kolonkou prokapat 800 µl pufru QF (eluční pufr). Vzorek jsme zvortexovali a nechali nejméně 1 h stát při RT. Po inkubaci jsme vzorek centrifugovali 30 minut při 15 000 ot.min⁻¹ a 4 °C (BECKMAN COULTER Avanti J-26 XPI). Sediment jsme rozpustili ve 100 µl 0,3M octanu sodném. Poté jsme přidali 300 µl vymraženého 96% ethanolu (precipitace DNA) a nechali inkubovat nejméně 30 minut při - 80 °C. Vzorek byl posléze 30 minut centrifugován při 15 000 ot.min⁻¹ a 4 °C (BECKMAN COULTER Avanti J-26 XPI). Vzniklý sediment jsme vysušili (centrifugací ve vakuu) a rozpustili ve 20-50 µl H₂O dle velikosti sedimentu. Poté jsme změřili koncentraci izolovaného plazmidu pomocí spektrofotometru (Biotech Photometer WPA UV 1101).

2.2.8. Izolace rostlinné RNA

Rostlinná RNA byla izolována pomocí Plant RNA Purification Reagent (Invitrogen, Carlsbad, Canada). Navázili jsme si 100 mg listů z infikovaných rostlin, které jsme následně zhomogenizovali ve třech miskách pomocí tekutého dusíku. Homogenát jsme pomocí sterilní kopistky přendali do mikrozkušavky se sterilně napipetovanými 500 µl RNA

purifikačního reagens, vortexovali a nechali inkubovat 5 minut při RT v poloze nalezato. Následovaly 3 minuty centrifugace při 14 000 ot.min⁻¹ (Hettich UNIVERSAL 32R). Všechny supernatant jsme opatrně odpipetovali do mikrozkušavky se 100 µl 5M NaCl. Přidali jsme 200 µl chloroformu (denaturace proteinů) a zvortexovali. Nechali jsme vzorek 10 minut centrifugovat při 14 000 ot.min⁻¹. Poté jsme odebrali 400 µl horní vodné fáze a přendali do předem připravené zkumavky se 400 µl izopropanolu. Nechali jsme 10 minut stát při RT a pak jsme vzorek centrifugovali při 4 °C při 14 000 ot.min⁻¹ po dobu 30 minut. Suchý sediment jsme rozpustili ve 30 µl nahřáté vody (54 °C). Poté jsme změřili koncentraci izolovaného plazmidu pomocí spektrofotometru při 260 nm (Boitech Photometer WPA UV 1101).

2.2.9. Ligační reakce

Ligační reakce probíhala vždy při 25 °C přes noc ve vodní lázni (HAAKE K20-DC1).

V případě indukce viroidních dimerů byl recipient (pUC19) defosforylovaný.

recipient (pLV68, pLV07)	1 µl	recipient (pUC19)	1 µl
10x ligační pufr (Takara)	1 µl	10x ligační pufr (Takara)	1 µl
PEG 6000 (25%)	2 µl	PEG 6000 (25%)	2 µl
fragment	1 µl	fragment	5 µl
T4 DNA ligáza (Takara)	1 µl (350 U)	T4 DNA ligáza (Takara)	<u>1 µl</u> (350 U)
ddH ₂ O	<u>4 µl</u>		10 µl
	10 µl		

2.2.10. Restrikční reakce

V průběhu práce jsme provedli 2 restrikční analýzy u vybraných klonů pro stanovení orientace získaných viroidních dimerů. Pro stanovení restrikční mapy konstruktů byl použit program BioEdit (verze 7.0.5., copyright Tom Hall). Obě reakce probíhaly 3 hodiny při 37 °C.

Restrikční analýza I:

plasmid s insertem (pUC19)	1 µl (1-2 µg)
10x reakční pufr (NEB3)	1 µl
100x BSA (NEB)	0,1 µl
<i>SpyI</i>	1 µl (10 U)
ddH ₂ O	<u>6,9 µl</u>
	10 µl

Restrikční analýza II:

plasmid s insertem (pLV68)	1 µl (1-2 µg)
10x reakční pufr (NEB4)	1 µl
100x BSA (NEB)	0,1 µl
<i>XmaI</i>	1 µl (10 U)
<i>AscI</i>	1 µl (15 U)
ddH ₂ O	<u>5,9 µl</u>
	10 µl

Dále byly endonukleázy použity při manipulaci s viroidním fragmentem při vyštěpení z plazmidu či pro získání kohezivních konců pro snadnější ligaci. Reakce probíhaly při 37 °C přes noc.

Restrikční vyštěpení fragmentu:

10x pufr K (Takara)	5 μ l
plasmid (pCRscript, pUC)	25 μ l (40 μ g)
<i>Bam</i> HI (Takara)	5 μ l (75 U)
ddH ₂ O	<u>15 μl</u>
	50 μ l

Restrikční opracování fragmentu po PCR:

fragment (viroidní dimer)	50 μ l
10x pufr NEB4	7 μ l
100x BSA (NEB)	0,7 μ l
<i>Xba</i> I (Takara)	2 μ l (30 U)
<i>Xho</i> I (Takara)	2 μ l (20 U)
ddH ₂ O	<u>8,3 μl</u>
	70 μ l

2.2.11. PCR

Pomocí PCR s využitím *Taq* polymerázy jsme analyzovali vzniklé viroidní oligomery či jsme ověřovali klony selektované molekulární hybridizací transformovaných bakterií. High-fidelity *Pwo* polymerázu jsme použili na reamplifikaci viroidních dimerů společně s přidáním nových restrikčních míst.

Teplotní a časový profil reakce: 2 minuty 94 °C (úplná denaturace templátové DNA) → 35x [30 s 94 °C (denaturace DNA) – 30 s 59 °C (hybridizace primerů – annealing) – 60 s 72 °C (syntéza řetězce DNA – elongace)]. Reakce probíhala na přístroji T3 Thermocycler, Biometra.

Za sterilních podmínek na ledu byly připraveny následující reakce:

Analýza indukovaných viroidních oligomerů:

templát – bakteriální kolonie (obsahující pUC19)	
2x <i>Taq</i> master mix	12,5 μ l
primer M13r (100mM)	0,25 μ l
primer M13f (100mM)	0,25 μ l
ddH ₂ O	<u>12 μl</u>
	25 μ l

Reamplifikace viroidních dimerů:

templát - plasmid (pUC19)	2 μ l
2x <i>Pwo</i> master mix	50 μ l
primer Bpuclinkxba (100mM)	4 μ l
primer Bpuclinkxho (100mM)	4 μ l
ddH ₂ O	<u>40 μl</u>
	100 μ l

Restrikční vyštěpení fragmentu:

po štěpení *Asc*I (NEB4) sraženo EtOH, posléze přes noc štěpeno *Pac*I (NEB1)

10x pufr	5 μ l
plasmid (pLV68)	5 μ l (7,5-10 μ g)
enzym	3,5 μ l (35 U)
100x BSA	0,5 μ l
ddH ₂ O	<u>36 μl</u>
	50 μ l

Ověření selektovaných klonů trans. bakterií:

templát – bakteriální kolonie	
2x <i>Taq</i> master mix	12,5 μ l
primer Bpuclinkxba (100mM)	0,25 μ l
primer Bpuclinkxho (100mM)	0,25 μ l
ddH ₂ O	<u>12 μl</u>
	25 μ l

2.2.12. Přechistění DNA fenol-chloroformem

Fenol:chloroform (25:24:1) (100 ml):

25 fenol	50 ml fenol (v pufrovaném TE pH 8.0)
24 chloroform	48 ml chloroform
1 <i>iso</i> -amylalkohol	2 ml <i>iso</i> -amylalkohol

výsledný roztok dobře promíchat a převrstvit cca 1/3 objemu 10x TE pufru; skladovat ve tmě při 4°C

Tato metoda slouží k odstranění proteinů ze vzorku (např. po určité enzymatické reakci). Ke vzorku jsme přidali stejný objem (1:1, v/v) směsi fenol-chloroform (25:24:1). Vzorek jsme poté vortexovali a nechali stát 5 minut při RT. Následně jsme vzorek stočili 10 minut při 13 500 ot.min⁻¹ (HERMLE Z233M) a odebrali vodní fázi.

Vzorek jsme dále precipitovali pomocí etanolu, pokud jsme jej dále enzymaticky zpracovávali (např. restrikční reakce či ligace): ke vzorku jsme přidali 1/10 objemu (v/v) 3M octanu sodného (pH 5,2). Dále jsme přidali vymražený 96% etanol v poměru 3:1 - ethanol/vzorek, v/v. Vzorek jsme poté nechali inkubovat při -80 °C nejméně 1 hodinu. Po inkubaci jsme vzorek stočili 30 minut 15000 ot.min⁻¹ při 4 °C (BECKMAN COULTER Avanti J-26 XPI). Získaný sediment jsme vysušili a rozpustili v ddH₂O.

2.2.13. Metody molekulární hybridizace

Roztoky pro přípravu membrán na hybridizaci (200 ml):

roztoky 1-3 sterilizovat	
(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) 1×SSC	10 ml 20×SSC do 200 ml roztoku

Extrakční pufr AMESS (200 ml):

1M octan sodný pH 6.0	13,6 g octanu sodného do 60 ml ddH ₂ O, pH srovnat kys. octovou
26mM MgCl ₂	0,48 g MgCl ₂ ·6H ₂ O
20% etanol	40 ml 96% etanol
1M NaCl	11,6 g NaCl zvlášť rozpustit ve 40 ml ddH ₂ O a posléze přidat
3% SDS	6 g SDS přidat a rozpustit v hotovém roztoku

sterilizovat

5×FGB (500 ml) :

40mM	2,72 g octan sodný·3H ₂ O
rozpustit v H ₂ O	350 ml (DEPC / dd) H ₂ O
90mM MOPS-NaOH pH 7.0	10,3 g MOPS (C ₇ H ₁₅ NO ₄ S; kyselý, NE zásaditý)
20mM EDTA pH 7.0	100 ml 0,1M EDTA

sterilizovat, CHRÁNIT PŘED SVĚTLEM (v lahvi obalené hliníkovou fólií), skladovat při 4 °C nebo při -20 °C.

FGL (10 ml):

50% glycerol	5 ml glycerol
1mM EDTA pH 8.0	20 µl 0,5M EDTA pH 8.0
0,25% brómfenolová modř	
0,25% xyléncyanolová modř	

20×SSPE (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

Upravit pH NaOH na 7,4, filtrovat, sterilizovat

20×SSC (1000 ml):

sterilizovat	
3M NaCl	175,3g NaCl
0,3M citrát sodný pH 7.0	88,2g citrát sodný

DEPC H₂O (RNase-free):

1000 ml H ₂ O	
0,02% DEPC	0,2 ml diethylpyrokarbonát (pozor, prudký jed!)

roztok připravovat v digestoři, poté nechat inkubovat přes noc při 37 °C a sterilizovat

100×Denhardtovo činidlo (100 ml):

2% Ficoll 400 (w/v)	2 g Ficoll 400
2% BSA fraction V (w/v)	2 g BSA
2% PVP (w/v)	2 g polyvinylpyrrolidon Mw 40 000

Pre-prehybridizační pufr (1000 ml):

50mM Tris-HCl pH 8.0	6,05 g Tris
1mM EDTA	0,372 g EDTANa ₂ ·2H ₂ O
1M NaCl	58,44 g NaCl
0,1% SDS (w/v)	1 g SDS nebo 5 ml 20% SDS (w/v)

Prehybridizační pufr (100 ml):

50% formamid (v/v)	50 ml deionizovaný formamid
1,5×Denhardtovo činidlo	1,5 ml 100×Denhardtovo činidlo
0,1% SDS (w/v)	500 µl 20% SDS (w/v)
5×SSPE	25 ml 20×SSPE
20 mg/100 ml tRNA	

skladovat při -20 °C, popř. pro použití při Northernovém blotu při 4 °C.

Deionizovaný formamid

Na 200 ml formamidu přidat 3 lžičky iontoměniče Amberlite a nechat cca 3 hodiny míchat, poté přefiltrovat

Příprava tRNA

1 g kvasniční RNA se rozpustí v 10 ml TE pufru. Je třeba zahřát RNA na 50-60 °C a často promíchávat. Roztok se odstředí a rozdělí se do několika zkumavek po 750 µl. Supernatant se fenolizuje 1:1 (v/v) směsí fenol:chloroform (25:24:1). Poté se přidá 4M LiCl (1:1 v/v), RNA se umísí na 1 hodinu do ledu. Po odstředění se měří koncentrace supernatantu, sediment se vyhazuje.

Promývací roztoky pro hybridizaci

2×SSC, 0,1% SDS
1×SSC, 0,1% SDS
0,5×SSC, 0,1% SDS
0,1×SSC, 0,1% SDS

Příprava membrán pro hybridizaci bakteriálních kolonií

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 se selektivní bakteriální půdou přes noc - *A. tumefaciens* při 28 °C, LK médium, 1,5% agar, kanamycin 50 mg/l; *E. coli* při 37 °C, LB médium, 1,5% agar, ampicilin 100 mg/l či kanamycin 50 mg/l. Druhý den jsme membránu postupně inkubovali (koloniemi nahoru) na filtračních papírech nasáknutých roztoky: 0,5M NaOH (10 minut), 1,0M Tris-HCl, pH 7,4 (5

minut), 1,5M NaCl, 0,5M Tris (10 minut); při snímání membrány z nasáklých filtračních papírů se tato lehce vysušila dotykem (spodní strany) na suchý filtrační papír a posléze se přemístila do následujícího roztoku. Po inkubaci ve třetím roztoku jsme membránu umístili mezi 2 suché filtrační papíry a mírným tlakem jsme odstranili buněčný materiál. Poté jsme membránu pinzetou sejmuli a nechali zcela vyschnout na vzduchu při RT. Vysušenou membránu jsme dále inkubovali 15 minut v roztoku 1×SSC (koloniemi dolů). Membránu jsme následně zbavili nečistot inkubací ve 3 Petriho miskách s chloroformem, v každé po dobu 1-2 minut při pomalém kroužení. Membránu jsme opláchli v dH₂O a posléze inkubovali 20-30 minut v roztoku 0,15M NaCl (koloniemi dolů).

Membránu jsme vysušili mezi dvěma suchými filtračními papíry a poté ozářili UV zářením (120 mJ/cm²; fixace DNA) a zapekli po dobu 20 minut při 80 °C. Pro uskladnění byla membrána zatavena do mikrotenového sáčku uchovávána při 4 °C až do použití.

Příprava membrán pro hybridizaci viroidní RNA – dot blot

Odebrali jsme 300 mg z mladých listů. Pletivo jsme homogenizovali ve vychlazených třech miskách s trochou písku a 450 µl roztoku AMESS. Po homogenizaci jsme přidali 600 µl směsi chloroform:*iso*-amylalkohol (24:1, v/v). Po celkové homogenizaci byl vzorek přelit do předem popsané mikrozkuřavky. Následně jsme vzorky stočili 5 minut při 13 500 ot.min⁻¹ (HERMLE Z233M). Odebrali jsme cca 200-300 µl vodní fáze a přidali stejný objem (1:1) roztoku 2:3 formaldehyd:20×SSC (v/v). Poté byly vzorky ihned přendány do ledu (v této fázi mohou být vzorky uskladněny při -80 °C a aplikovány na membránu později). Těsně před denaturací (15 minut při 65 °C; termostat OMNI-BIO BRNO) byly vzorky vortexovány. Po denaturaci byl vzorek uložen do ledu.

Aplikace vzorků na RNA membránu (Biodyne A Membrane 0,2 µm, PALL) probíhala v 1×SSC (7,5 ml 20×SSC do 142,5 ml dH₂O). Porézni „spacer“ nasáklý 1×SSC jsme umístili na gumové těsnění v komůrce. Na „spacer“ jsme umístili membránu, rovněž namočenou v 1×SSC. Membránu jsme následně přeložili horní destičkou s otvory pro aplikaci jednotlivých vzorků. Množství naneseného vzorku záviselo na odhadované infikovanosti rostliny, obvykle jsme nanášeli 40-80 µl (vzorek však musel být doplněn 1×SSC na celkový objem 200 µl). Po nanesení vzorků do jamek (do prázdných jamek jsme nanесли 200 µl 1×SSC) jsme provedli blotování pomocí mírného podtlaku (max. 20 kPa). Suchou membránu jsme následně ozářili UV zářením (120 mJ/cm²; fixace DNA) a zapekli po dobu 20 minut při 80 °C. Pro uskladnění byla membrána zatavena do mikrotenového sáčku uchovávána při 4 °C až do použití.

Příprava membrán pro hybridizaci Northernový blot

Pro přípravu denaturačního gelu pro Northern blot jsme navázili 2,16 g agarózy (Sea-Kem) a rozpustili v 84 ml ddH₂O zahřátím na bod varu. Po ochlazení roztoku na cca 40-60 °C jsme přidali 24 ml 5×FGB, promíchali a pak přidali 24 ml 37% formaldehydu (p.a.). Směs jsme promíchali kroužením a ihned nalili do připravené elektroforetické vany s hřebenem. Gel jsme nechali tuhnout cca 1 hodinu při RT a poté uskladnili při 4 °C do druhého dne. Ztuhlý gel byl vložen do elektroforetického tanku a zalit pufrům 1×FGB tak, aby byl zcela ponořen. Před aplikací vzorků se provádí „předelektroforéza“ po dobu cca 5 minut a napětí >80V.

Ze vzorků s izolovanou RNA (viz kap. 2.2.8.) jsme si připravili alikvoty obsahující 15 µg RNA ve 4,5 µl (naředěním s DEPC H₂O). K připraveným alikvotám vzorků a RNA markeru (3 µl RNA markeru + 1,5 µl DEPC H₂O) jsme přidali 2 µl 5×FGB, 3,5 µl 37% formaldehydu (p.a.) a 10 µl deionizovaného formamidu. Vzorky jsme po přidání každé složky promíchali pipetou a finálně lehce vortexovali. Následně jsme vzorky denaturovali 15 minut při 65 °C a poté dali ihned do ledu. Ke vzorkům jsme přidali 2 µl FGL pufru a nanесли jsme na gel. Elektroforéza se provádí za pokojové teploty po dobu cca 4 hodin, při napětí 80-120 V. Každou hodinu se pufr v tanku promíchává. Bromfenolová modř by měla být cca 2-3 cm od spodního okraje gelu.

Po elektroforéze jsme odřízli slot s RNA markerem od zbytku vzorku a gel jsme 3× po dobu 10 minut propláchli v DEPC H₂O (popř. ddH₂O), z důvodu odstranění zbytků formaldehydu. Slot s RNA markerem jsme neproplachovali, přímo jsme přistoupili k jeho barvení - RNA marker jsme barvili přes noc v cca 80 ml ddH₂O s přidaným ethidium bromidem (2 µl zásobního roztoku). Obarvený RNA marker jsme zdokumentovali v měřítku na UV transiluminátoru (Chromato-Vue TM-36, UVP) při vlnové délce 312 nm. Gel jsme uložili na můstek z papíru 3MM Whatman smočeného v roztoku 20×SSPE, jenž má kontakt s rezervoárem stejného pufru. Na gel jsme přiložili RNA membránu (Biodyne A Membrane 0,2 µm, PALL) a 3 ks 3MM Whatman papíru smočeného ve 20×SSPE. Vše jsme převrstvili suchým filtračním papírem, buničitou vatou a zatížili cca 0,5kg závažím na skleněné destičce. Blot jsme obalili potravinovou folií z důvodu zabránění odpařování blotovacího roztoku. Blotting jsme nechali probíhat přes noc. Druhý den jsme membránu s navázanou RNA ozářili UV zářením (120 mJ/cm²; fixace RNA) a zapekli po dobu 20 minut při 80 °C. Pro uskladnění byla membrána zatavena do mikrotenového sáčku uchovávána při 4 °C až do použití.

Příprava radioaktivně značených sond (Amersham Rediprime II Random Prime Labelling System, GE Healthcare)

DNA templát byl rozpuštěn v 1×TE pufru (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1mM EDTA) do výsledné koncentrace 2,5-25 ng na objem 45 µl reakční směsi. Templát byl následně denaturován při 95-100 °C po 2 minuty. Reakční směs se prudce ochladila přendáním do ledu nejméně po dobu 5 minut. Templát byl následně aplikován do alikvoty Amersham Rediprime II Random Prime Labelling System, inkubován několik minut v ledu pro hydrataci reakční směsi a promíchán. Poté jsme do reakční směsi přidali 5 µl dCTP (s izotopem α -[³²P]dCTP, promíchali a inkubovali 1 h při 37 °C. Po ukončení značící reakce byly změřeny charakteristiky sondy – CPM (counts per minute) a procento inkorporace – na scintilačním počítači LS7000 Beckman. Na DEAE celulózu jsme aplikovali 1 µl připravené sondy a nechali jsme ve scintilační skleničce oschnout. Po přidání 2-3 ml 0,5M Na₂HPO₄ jsme na scintilačním počítači odečetli aktivitu sondy pomocí změřeného Čerenkovova záření (CPM). Pro celkovou hodnotu byly získané hodnoty vynásobeny 50 (celkový objem sondy). Pro výpočet procenta inkorporace se vyměnil roztok 0,5M Na₂HPO₄ a opět se změřila aktivita, přičemž toto bylo provedeno 2×. Procento inkorporace jsme pak vypočetli z poměru prvního a třetího měření. Aktivita sond se pohybovala v rozmezí 1,1-8.10⁷ MBq.

Před použitím při molekulární hybridizaci byla sonda denaturována při 95-100 °C po dobu 2 minut a poté prudce ochlazená přendáním do ledu.

Molekulární hybridizace

Teploty pro hybridizaci byly následující: 42 °C pro hybridizaci bakteriálních kolonií, 50-55 °C pro Northernový blot a 55 °C pro dot-blot. Připravené membrány jsme promývali cca 2 hodiny v 15-35 ml pre-prehybridizačního pufru. Poté následovala inkubace opět cca 2 hodiny ve 20 ml prehybridizačního pufru. Pro následnou hybridizaci byly membrány přendány do nového válce, bylo přidáno 20 ml prehybridizačního pufru a denaturovaná sonda. Vlastní hybridizace probíhala v izotopové laboratoři po nejméně 8 hodin, nejčastěji však přes noc.

Membránu jsme pak promývali v promývacích roztocích s rostoucí vymývací schopností:

2×SSC, 0,1% SDS
1×SSC, 0,1% SDS
0,5×SSC, 0,1% SDS
0,1×SSC, 0,1% SDS

T=teplota hybridizace; t= 10 minut; roztok nepředehřátý
druh vymývacího roztoku a jeho teplotu, teplotu a čas
vymývání určujeme podle intenzity záření na membráně

Veškeré promývání a hybridizace byly uskutečněny v hybridizérech Techne hybridiser HB-1D.

2.2.14. Aktivace *A. tumefaciens* a listová infiltrace

10xMES (100ml):

0,1M MgCl ₂	2,03g MgCl ₂ .6H ₂ O
0,1M MES	2,15g MES.H ₂ O (2-morpholino)ethanesulfonic acid

upravit pH na 5,6 pomocí NaOH; sterilizovat a skladovat při 4 °C

aktivační směs (100 ml):

1xMES	10 ml 10xMES
200µM acetosyringon	1 ml 20 µM acetosyringon (rozpuštěný v DMSO)

Bakterie *A. tumefaciens* s požadovaným konstruktem byly kultivovány v LK médiu s kanamycinem (koncentrace 25 µg/ml) po 12 h při 28 °C a 120 ot.min⁻¹ (třepačka GFL 3032). Po kultivaci jsme bakteriální kulturu sedimentovali stočením na 10 minut při 5000 ot.min⁻¹ (Hettich UNIVERSAL 32). Sediment jsme poté resuspendovali v aktivační směsi, přičemž množství přidané aktivační směsi bylo totožné s objemem kultivačního média. Bakteriální suspenzi jsme poté nechali inkubovat 16-24 h ve stínu při RT.

Bakteriální suspenze aktivovaných *A. tumefaciens* byla následně infiltrována do spodní strany listů *N. benthamiana* pomocí injekčních stříkaček bez jehel. Infiltrované rostliny byly na cca 12 hodin ponechány ve stínu (pro zabránění vyschnutí poškozených oblastí) a poté přesunuty zpět do standardních světelných podmínek.

2.2.15. Měření aktivity GUS (referenční gen pro β-glukuronidázu)

STOP pufr (100 ml):

0,2 M Na ₂ CO ₃	2,12 g Na ₂ CO ₃
---------------------------------------	--

GUS pufr (200 ml):

čerstvě připravit

50 mM NaP _i	10 ml 1M NaP pH 7 (57,7 ml 1M Na ₂ HPO ₃ , 42,3 ml 1M NaH ₂ PO ₃)
1 mM EDTA	400 µl 0,5 M EDTA
0,1 % (w/v) triton X-100	2 ml 10% triton nebo 0,2 g tritonu

150 µl 2-merkaptoethanol (přidat těsně před použitím)

MUG pufr (10 ml):

čerstvě připravený, uchovávat v chladu (4 °C) a ve tmě

10 ml GUS pufru	
1 mM MUG	4,63 mg MUG – váženo na analytických vahách (SCALTEC SBC33)

Po 3 (pVSF1) či 5 (pTBN1) dnech od infiltrace aktivovaných *A. tumefaciens* (viz kap. 2.2.14) byly z pokusných rostlin odebrány vzorky z infiltrovaných regionů pro zpracování (viz níže).

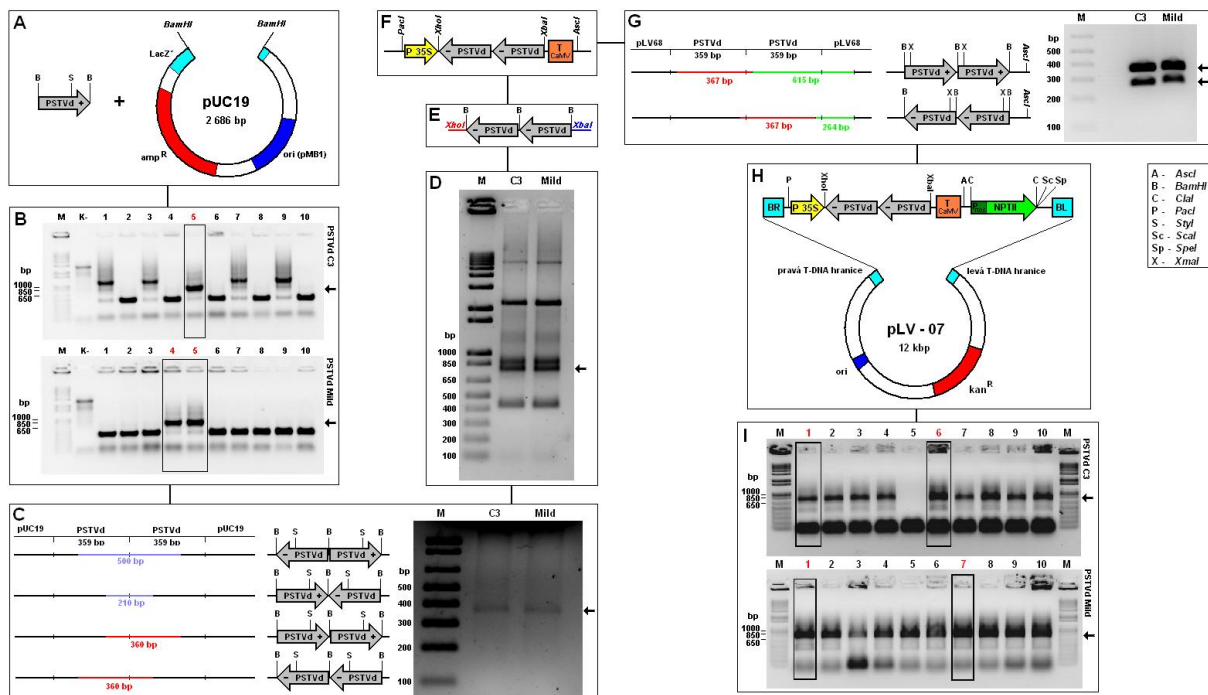
Připravili jsme si 6 sad 1,5- ml zkumavek popsaných I, II, MUG, 0, 5 a 10. Po přípravě roztoků jsme do zkumavek MUG napipetovali 500 µl MUG pufru a uložili je do tmy do 4 °C. Do zkumavek 0, 5 a 10 jsme napipetovali 900 µl STOP pufru. Pomocí korkovače

jsme z listů pokusných rostlin *N. benthamiana* vyřízli počet disků odpovídající váze 100 mg (9-11). Navážené disky jsme přesunuli do vychlazené třecí misky s pískem, přidali jsme 500 μ l GUS pufru a zhomogenizovali. Výsledný homogenát jsme přesunuli do mikrozkušavky nadepsané I a uložili do ledu. Následovala centrifugace vzorků – 15 minut 14 000 ot.min⁻¹ při 4 °C (Hettich UNIVERSAL 32R). Odebrali jsme 200 μ l supernatantu do mikrozkušavky II a opět uložili do ledu. Přepipetovali jsme 50 μ l získaného supernatantu do zkumavky s 500 μ l pufru MUG, promíchali a ihned jsme odebrali 100 μ l do zkumavky 0 a také ihned promíchali. Po 5 minutách inkubace vzorků ve zkumavkách MUG při 37 °C v termobloku (BIOSAN Thermo block TDB-120) následoval druhý odběr – opět 100 μ l vzorku do zkumavek označených 5. Po další 5-ti minutové inkubaci při 37 °C bylo odebráno 100 μ l vzorku do zkumavek 10. Odebrané vzorky byly do doby měření uchovávány při 4 °C ve tmě. Pomocí fluorimetru (Bio-Rad VersaFluor™ Fluorometer; 360 nm excitační filtr, 460 nm emisní filtr) jsme stanovili koncentraci MU vzniklého činností β -glukuronidázy a pomocí tabulkových hodnot jsme určili aktivitu zkoumaného promotoru v pmolMU.min⁻¹.mg⁻¹ odebraného pletiva. Kalibrace přístroje byla provedena pomocí 10 μ M roztoku 4-MU (stanoveno jako 14 000 jednotek).

3. Výsledky

3.1. Konstrukce vektorů pro viroidní infekce a ověření jejich infekčnosti

Během předešlých prací v laboratoři molekulární genetiky se podařilo zkonstruovat infekční vektory s dimerem silně patogenního kmene PSTVd AS1 v ++ orientaci (Selinger, 2008). Pro další pokusy však bylo nutné vytvořit infekční vektory s kmeny PSTVd C3 a PSTVd Mild, lišícími se projevem symptomů u pokusných rostlin *N. benthamiana*.



Obr. 8: Schéma konstrukce infekčních vektorů pro viroidní infekce: Za použití endonukleázy *Bam*HI jsme vyštěpili monomerní fragment z izolovaných plazmidů a religovali do defosforylovaného *Bam*HI místa vektoru pUC19 - indukce dimerů (A). Následně jsme pomocí PCR a primerů M13f a M13r selektovali klon transformované pUC19 s dimerním insertem (B). Restriktivní analýza pro stanovení orientace jednotlivých monomerů PSTVd byla provedena pomocí endonukleázy *Sty*I, byly selektovány klony s požadovanou orientací (tj. hlava-ocas, tedy ++ či --) (C). Pomocí PCR (za použití *Pwo* polymerázy a primerů BpuclinkXba a BpuclinkXho) jsme amplifikovali dimerní fragment a zároveň jsme k němu přidali *Xba*I a *Xho*I místa - délka výsledného fragmentu činila 767 bp (D, E). Fragment, opracovaný restriktázami *Xba*I a *Xho*I, byl poté ligován do *Xba*I a *Xho*I míst vektoru pLV68 se silným promotorem 35S (F). Pro rozlišení “+“ a “-“ dimerů byly konstrukty podrobeny druhé restriktivní analýze za pomoci endonukleáz *Xma*I a *Asc*I (G). Závěrečný krok spočíval v přemístění dimerního insertu s promotorem do expresního rostlinného vektoru pLV07 (pro dosažení maximální patogenezé). Dimerní insert s promotorem byl vyštěpen pomocí restriktáz *Pac*I a *Asc*I a následně religován do *Pac*I a *Asc*I míst ve vektoru pLV07 (H). Finální konstrukt byl amplifikován v bakteriích *E. coli* a po jeho izolaci jsme provedli transformaci bakterií *A. tumefaciens*; pozitivní transformované klony jsme selektovali PCR (I).

Prvním krokem bylo získání monomerních *Bam*HI fragmentů PSTVd C3 a Mild. *Bam*HI fragmenty PSTVd C3 byly získány v laboratoři Molekulární genetiky pomocí RT-PCR s primery PSTVdbI a II (Matoušek et al., 2004b) z izolované RNA biolisticky infikovaných rostlin. Získaný fragment cDNA o délce 359 bp byl izolován z agarózového gelu a následně ligován do *Srf*I místa plasmidu PCR skript SK (+), který byl v této práci použit jako výchozí konstrukt. Pro získání *Bam*HI monomeru PSTVd Mild byl jako výchozí

konstrukt použit plasmid pUC s dimerním fragmentem PSTVd Mild získaný v laboratoři profesora D. Riesnera (Heinrich Heine Universität, Düsseldorf, Germany).

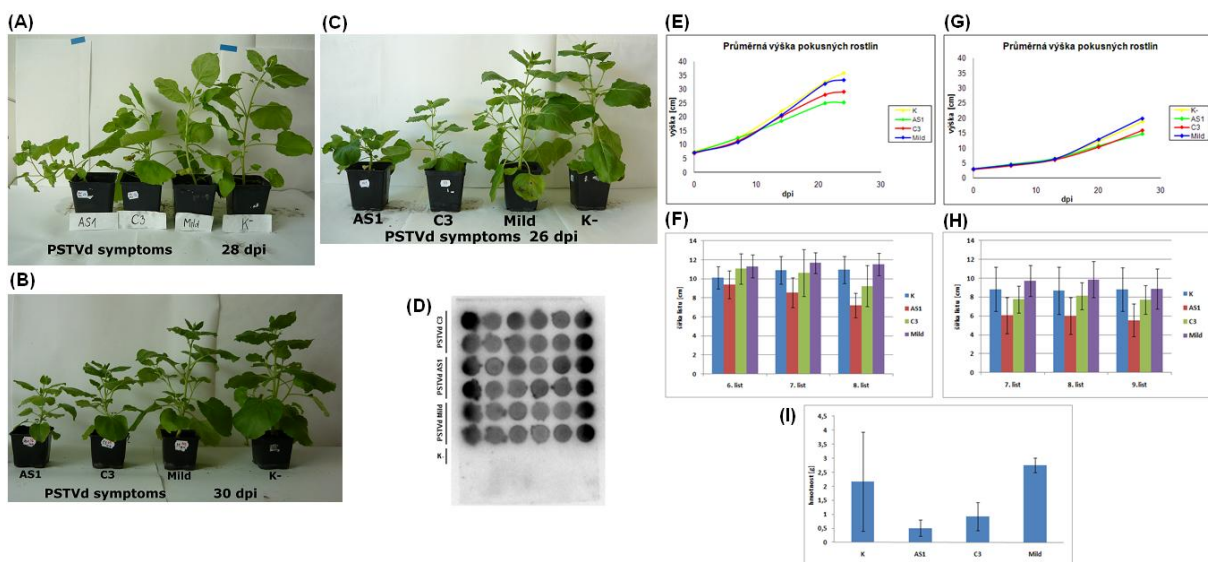
Z izolovaných plasmidů jsme vyštěpili monomerní inserty PSTVd C3 a Mild pomocí endonukleázy *Bam*HI. Reakční směs byla poté fragmentována pomocí elektroforézy a vyštěpené fragmenty o délce 359 bp s kohezivními *Bam*HI konci byly extrahovány z preparativního agarózového gelu a religovány do *Bam*HI místa vektoru pUC19 s defosforylovanými *Bam*HI konci za pomoci T4 DNA ligázy (Obr. 8-A). Při této religaci byl očekáván vznik různě orientovaných oligomerů PSTVd C3 a Mild. Následně jsme náhodně vybrali 10 kolonií *E. coli* transformovaných získanou ligační směsí a pomocí PCR a primerů M13f a M13r jsme stanovili počet viroidních jednotek integrovaných do plasmidu pUC19 (Obr. 8-B). Pro další práci byly vybrány klony označené jako č. 5 u PSTVd C3 a č. 4 u PSTVd Mild obsahující dimerní fragmenty. Po izolaci plasmidů z vybraných kolonií jsme provedli 1. restrikční analýzu pomocí endonukleázy *Sty*I pro selekci ++ či -- dimerů (Obr. 8-C).

Po kladném výsledku restrikční analýzy jsme pomocí PCR (high-fidelity polymeráza *Pwo* pro snížení pravděpodobnosti mutací) amplifikovali dimery z obou klonů. Byly použity primery Bpuclink-*Xba*I a Bpuclink-*Xho*I, do kterých byla integrována restrikční místa pro endonukleázy *Xho*I a *Xba*I (Obr. 8-D, E). Výsledná délka amplifikovaného fragmentu činila 767 bp. Tento fragment byl poté extrahován z preparativního agarózového gelu a následně opracován endonukleázami *Xba*I a *Xho*I pro vytvoření kohezivních konců. Pro zajištění čistoty byly vzorky po restrikčním opracování fenolovány a fragment následně extrahován z preparativního agarózového gelu.

Získané dimerní fragmenty byly poté pomocí T4 DNA ligázy integrovány do *Xba*I a *Xho*I míst vektoru pLV68 (odvozeného od vektoru pRT100, Töpfer et al., 1987) mezi promotor 35S a poly(A) signál viru mozaiky kvěťáku (CaMV) (Obr. 8-F). Pomocí koloniální hybridizace jsme následně selektovali kolonie *E. coli*, úspěšně transformované získanými plasmidy pLV68 s viroidními fragmenty. Byly vybrány 2 klony s nejsilnějším signálem od obou variant - PSTVd C3 (č.sb. 3181, 3183) a PSTVd Mild (č.sb. 3184, 3185). Po izolaci plasmidů z klonů 3183 a 3184 jsme pomocí 2. restrikční analýzy s použitím endonukleáz *Asc*I a *Xma*I stanovili orientaci získaných dimerů PSTVd C3 a Mild jako -- (Obr. 8-G). Následně jsme endonukleázami *Asc*I a *Pac*I vyštěpili expresní kazetu z plasmidu pLV68 (dimerní fragment PSTVd s CaMV promotorem i poly(A) signálem). Po fenolizaci jsme reakci fragmentovali pomocí elektroforézy a izolovali jsme fragment expresní kazety z gelu. Za použití T4 DNA ligázy jsme fragment religovali do *Asc*I a *Pac*I míst expresního rostlinného

vektoru pLV07 (Vrba et al., 2005) – Obr. 8-H. Koloniovou hybridizací jsme selektovali úspěšně transformované kolonie *E. coli*. Byly vybrány 3 klony s nejsilnějším signálem od obou variant - PSTVd C3 (č.sb. 3206-08) a PSTVd Mild (č.sb. 3209-11). Po izolaci finálních konstruktů (klony č.sb. 3206 a 3211) jsme provedli transformaci půdních bakterií *A. tumefaciens* (kmen LBA 4404) a následný screening transformovaných kolonií pomocí PCR za použití primerů Bpuclink-Xba a Bpuclink-Xho (Obr. 8-I). Jako finální klony vhodné pro agro-infiltraci byly vybrány 2 klony od obou variant PSTVd C3 (č.sb. 3265-66) a PSTVd Mild (č.sb. 3267-68).

Vysokou infekčnost získaných konstruktů jsme potvrdili Dot-Blot hybridizací infiltrovaných rostlin *N. benthamiana* (Obr. 9-D). Rozdílnou míru projevu symptomů jednotlivých kmenů PSTVd u *N. benthamiana* dokumentuje obrázek 9: Jako nejvíce patogenní se ukázal být kmen PSTVd AS1, u kterého dochází k silné zakrslosti infikovaných *N. benthamiana* – v průměru dosahovaly 68,75% výšky zdravých rostlin mezi 26-30 dpi (Obr. 9-A, B, C); negativní vliv na celkový habitus rostliny lze vyvodit i z průměrné šířky listů infikovaných rostlin, kde u kmene AS1 dochází k největší redukci (Obr. 9-F, H). U kmene PSTVd C3 byla rovněž pozorována inhibice růstu infikovaných *N. benthamiana*, ovšem ne tak výrazná jako u kmene AS1 - v průměru dosahovaly 80,65% výšky zdravých rostlin mezi 26-30 dpi (Obr. 9-A, B, C).



Obr. 9: Symptomy pozorované u rostlin *N. benthamiana* infikovaných kontrastními kmeny PSTVd: (A) symptomy rostlin použitých na pokus č. 1 měření aktivity pVSF1 – viz kap. 3.2. (B) symptomy rostlin použitých na pokus č. 2 měření aktivity pVSF1– viz kap. 3.2. (C) pokus 2011/03 - 26 dpi. (D) Dot-Blot hybridizace infikovaných *N. benthamiana* (29 dpi). (E) zaznamenání výšky *N. benthamiana* z pokusu č. 1 měření aktivity pVSF1 – viz kap. 3.2. (F) zaznamenání průměrné šířky listů rostlin *N. benthamiana* z pokusu č. 1 měření aktivity pVSF1– viz kap. 3.2. (G) zaznamenání výšky *N. benthamiana* z pokusu č. 2 měření aktivity pVSF1– viz kap. 3.2. (H) zaznamenání průměrné šířky listů rostlin *N. benthamiana* z pokusu č. 2 měření aktivity pVSF1– viz kap. 3.2. (I) zaznamenaná průměrná váha kořenů infikovaných rostlin *N. benthamiana* (35 dpi).

Kmen PSTVd Mild se ukázal být asymptomatickým (Obr. 9-A, B, C). Byl také pozorován negativní vliv viroidní infekce na vývoj kořenového systému, kdy kmen AS1 opět dosahoval nejsilnější redukce (4,3× menší hmotnost oproti zdravým rostlinám), následován kmenem C3 (2,4× menší hmotnost oproti zdravým rostlinám); kmen Mild opět neměl výraznější vliv (Obr. 10-I).

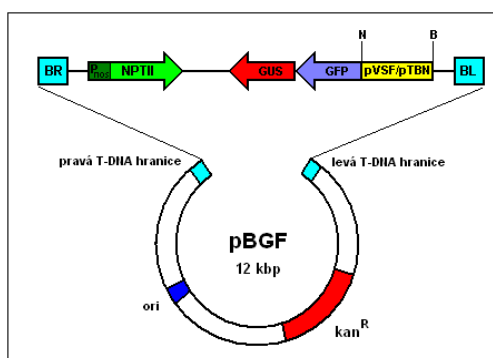
3.2. Měření aktivity vybraných promotorů

Pro výběr promotorů vhodných pro studium aktivace v přítomnosti kontrastních kmenů PSTVd jsme zvolili promotory regulující expresi genů, jejichž produkty prokazovaly určitou změnu aktivity při infekci PSTVd. Pro pokus byly vybrány následující:

1. **promotor apoptotické nukleázy TBN1** (tomato bifunctional nuclease 1) – byla pozorována zvýšená exprese této nukleázy v cévních svazcích listů u rostlin rajčete (*L. esculentum*, cv. Rutgers) infikovaných kmenem PSTVd AS1 (Matoušek et al., 2007). Jedná se však pouze o proximální část promotoru dlouhou cca 1 kbp.
2. **promotor transkripčního faktoru VSF1** (*vs-1* binding factor) – tento TF nasedá na 28 bp dlouhý DNA element zvaný *vs-1* (vein-specific) nacházející se v promotoru genu *grp1.8* (glycine-rich protein). Gen *grp1.8* je činností VSF-1 a dalších faktorů specificky exprimován pouze v buňkách xylému a výsledný strukturní protein GRP1.8 je zabudováván do buněčných stěn vznikajících tracheí (Torres-Schumann et al., 1996). Teoretická souvislost mezi biogenezí cévních svazků a patogenezí PSTVd byla potvrzena zjištěním, že rostliny rajčete (*L. esculentum*) infikované kmenem PSTVd AS1 mají silně redukováné xylémové části cévních svazků v řapících listů – viz Obr. 7 (Matoušek et al., 2007).
3. **promotor kinázy TPK** (tomato protein kinase) – exprese této kinázy je indukována v PSTVd-infikovaných rostlinách rajčete (*L. esculentum*, cv. Rutgers), díky čemuž byla autory označena PKV – protein kinase yiroid-induced (Hammond et al., 2000). Funkce PKV v rajčeti není dosud zcela jasná, existují však důkazy o jejím zapojení v signálních drahách giberelinů (Hammond et al., 2009).

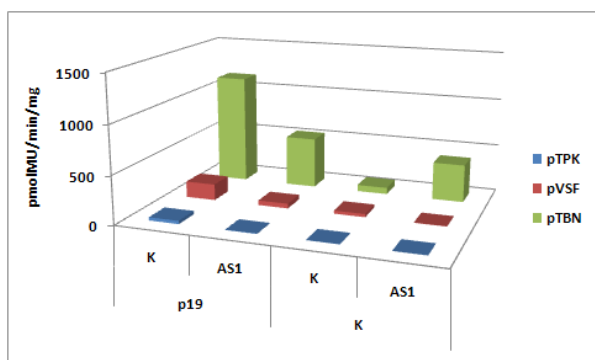
Všechny analyzované promotory byly integrovány do vektoru pBGF-0 (expresní rostlinný vektor s referenčními geny GUS a GFP; Kan^R, obr. 10; Chytilová et al., 1999). Veškerá stanovení aktivity promotorů v této práci byla provedena pomocí měření aktivity referenčního genu GUS (viz kap. 2.2.15.).

Pro experiment byly použity rostliny *N. benthamiana* infikované kmenem PSTVd AS1 pomocí agro-infiltrace (21 dpi). Jednotlivé promotory byly koinfiltrovány společně či bez supresoru silencingu p19, který potlačuje PTGS vyvolané infiltrací experimentálních rostlin a tím umožní vyšší míru aktivace sledovaných promotorů. Po analýze aktivace jednotlivých promotorů v závislosti na infekci PSTVd a přítomnosti supresoru silencingu p19 jsme jako experimentální promotor vybrali pTBN1. Ten dosahoval nejvyšší aktivace a zároveň byla pozorovaná rozdílná aktivita u zdravých a PSTVd infikovaných rostlin – bez p19 byla aktivita pTBN1 u PSTVd-infikovaných rostlin 5,82× vyšší než u zdravých a v přítomnosti p19 byla aktivita u zdravých rostlin 2,15× vyšší než u PSTVd-infikovaných, což naznačovalo možné ovlivnění aktivace pTBN1 přítomností viroidu (Obr. 11).

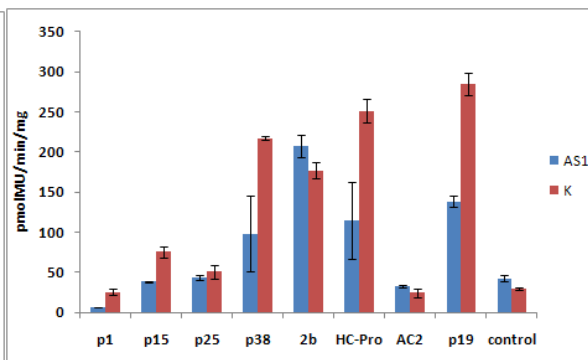


Obr. 10: Schématická mapa vektoru pBGF-0 s integrovanými promotory TBN1 a VSF1; N – *NcoI*; B – *BamHI*.

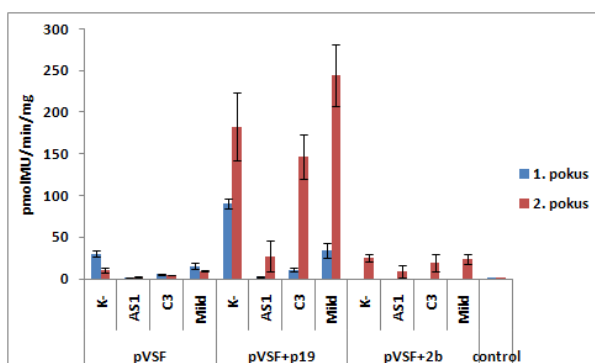
Další krok spočíval ve výběru supresoru silencingu vhodného pro náš systém. Provedli jsme opět infiltraci rostlin *N. benthamiana* infikovaných kmenem PSTVd AS1 (24 dpi). pTBN1 byl koinfiltrován společně s následujícími supresory silencingu: p1, p15, p25, p38, 2b, HC-Pro, AC2 a p19. Po vyhodnocení aktivace pTBN1 v závislosti na infekci PSTVd a přítomnosti supresorů silencingu jsme pro další experimenty vybrali supresory p19 a 2b. Supresor p19 se ukázal být nejvíce aktivujícím (9,7× vyšší aktivace u zdravých rostlin, 3,25× vyšší aktivace u AS1-infikovaných rostlin), přičemž aktivita pTBN1 v přítomnosti p19 byla u zdravých rostlin 2,05× vyšší než u PSTVd-infikovaných. Supresor 2b dosáhl rovněž vysoké míry aktivace (6× vyšší aktivace u zdravých rostlin, 4,85× vyšší aktivace u AS1-infikovaných rostlin), ovšem poměr aktivace zdravá rostlina/infikovaná rostlina byl překvapivě téměř rovný jedné (Obr. 12).



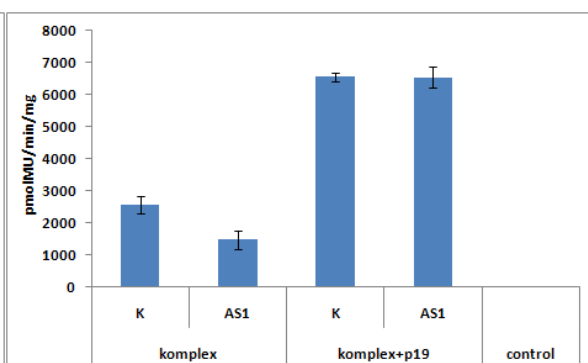
Obr. 11: Aktivace vybraných promotorů u rostlin *N. benthamiana* v závislosti na přítomnosti supresoru silencingu p19 a viroidní infekci (21 dpi).



Obr. 12: Aktivace pTBN1 v závislosti na přítomnosti specifického supresoru silencingu a viroidní infekci (24 dpi). Chybové úsečky vyjadřují směrodatnou odchylku.



Obr. 13: Aktivace pVSF1 v závislosti na přítomnosti supresorů silencingu p19 a 2b a viroidní infekci kontrastními kmeny PSTVd (I-24 dpi, II-27 dpi). Chybové úsečky vyjadřují směrodatnou odchylku.



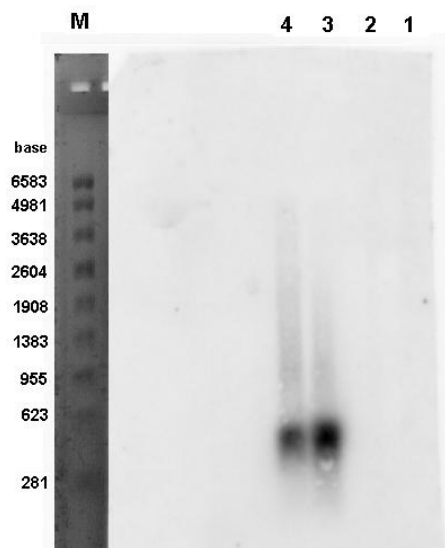
Obr. 14: Aktivace pCHS_H1 v závislosti na přítomnosti supresoru silencingu p19 a viroidní infekci (16 dpi). Chybové úsečky vyjadřují směrodatnou odchylku. **komplex** = pCHS_H1+bHLH2+JMyb2+HLWD40

Protože při následujících experimentech jsme však dosahovali neprůkazných výsledků vzhledem k poměrně slabé interakci pTBN1, jež navíc nebyl kompletní, zaměřili jsme se na podrobnou analýzu promotoru VSF1, jehož aktivita dle našich předběžných výsledků korelovala se silou projevů viroidních symptomů.

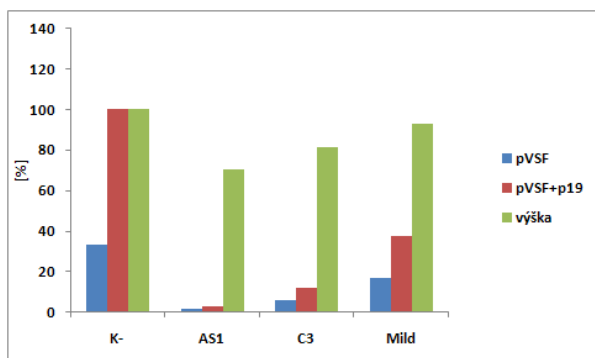
Analýza aktivace pVSF1 byla opět provedena v rostlinách *N. benthamiana* infikovaných kontrastními kmeny PSTVd (AS1, C3 a Mild). Společně s pVSF1 byly do rostlin koinfiltrovány supresory silencingu p19 a 2b. Byly provedeny 2 totožné pokusy (Obr. 13). Nejvyšší aktivace pVSF1 dosahují zdravé rostliny a asymptomatické rostliny infikované PSTVd Mild, zatímco silně zakrslé rostliny infikované kmenem PSTVd AS1 dosahují naprosto minimální aktivity i v přítomnosti supresoru silencingu p19 (3% aktivity a 15% aktivity zdravých rostlin v pokusu č. 1 a 2, v uvedeném pořadí). Supresor 2b, narozdíl od supresoru p19, ovlivnil aktivaci pVSF1 jen minimálně.

Pro porovnání aktivace pVSF1 jsme provedli pokus v definovaném systému promotoru chalkonsyntázy a jeho aktivátorů bHLH2, JMyb2 a HLWD40 (tento systém byl popsán v Oddělení molekulární genetiky, ÚMBR, BC AV ČR, v.v.i.). Získaná data ukazují,

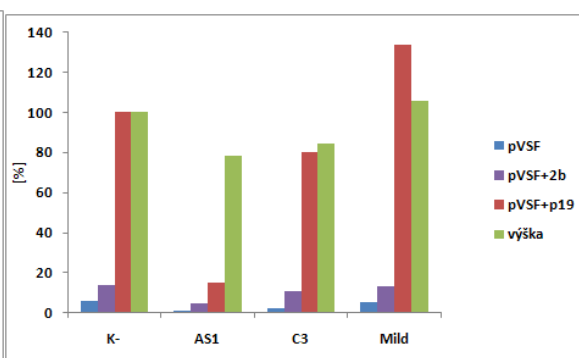
že narozdíl od systému pVSF1, je aktivita systému pCHS_H1 v přítomnosti p19 plně obnovována i u PSTVd AS1-infikovaných rostlin (Obr. 14). Pomocí Northernového blotu jsme potvrdili přítomnost PSTVd AS1 v rostlinách použitých při tomto pokusu (Obr. 15).



Obr. 15: Northernový blot rostlin *N. benthamiana* použitých při stanovování aktivity systému pCHS_H1 s PSTVd sondou. (1) směsný vzorek zdravých rostlin infiltrovaných komplexem. (2) směsný vzorek zdravých rostlin infiltrovaných komplexem a p19. (3) směsný vzorek AS1-infikovaných rostlin infiltrovaných komplexem. (4) směsný vzorek AS1-infikovaných rostlin infiltrovaných komplexem a p19. (M) RNA marker.



Obr. 16: Relativní aktivace pVSF1 v závislosti na přítomnosti supresoru silencingu p19 a projevu symptomů viroidní infekce v pokusu č. 1; faktor viroidní infekce zastoupen výškou infikovaných rostlin 24 dpi.



Obr. 17: Relativní aktivace pVSF1 v závislosti na přítomnosti supresorů silencingu p19 a 2b a projevu symptomů viroidní infekce v pokusu č. 2; faktor viroidní infekce zastoupen výškou infikovaných rostlin 27 dpi.

Po vynesení relativní aktivity pVSF1 a relativní výšky pokusných rostlin (Obr. 16 a 17) je patrná korelace aktivace pVSF1 s mírou projevených symptomů, kdy u nejvíce patogenního kmene AS1 dochází v porovnání se zdravými rostlinami k minimální aktivaci pVSF1 i v přítomnosti supresorů p19 a 2b, zatímco u asymptomatických *N. benthamiana* infikovaných kmenem Mild dochází k nejmenší změně aktivace pVSF1.

3.3. Analýza pVSF *in silico*

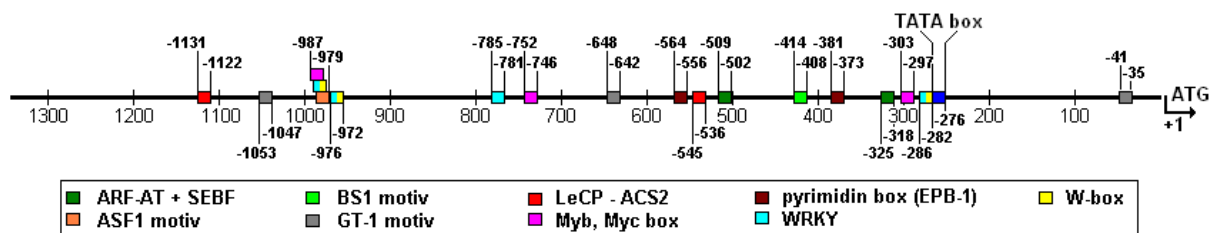
Pomocí internetové databáze PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/htdocs/PLACE/>) jsme analyzovali sekvenci promotoru VSF1, kdy jsme hledali specifické boxy potencionálně

odpovědné za jeho regulaci. Přehled vyhledaných boxů je uveden v Tabulce I. Pro názornost jsme vypracovali schéma promotoru s nalezenými boxy (Obr. 18).

Tab. I: Přehled boxů v promotoru VSF1 vyhledaných pomocí databáze PLACE:

název boxu	sekvence	orien- tace	pozice od ORF		charakteristika
			od	do	
ARFAT	TGTCTC	FW	318 552	321 558	vazebné místo ARF (auxin response factor) nalezeno v promotorech genů primární/rané odezvy na auxin
ASF1MOTIFCAMV	TGACG	FW	979	984	ASF1-vazebné místo nacházející se v promotoru 35S; tento motiv je přítomen v promotorech, které jsou aktivovány auxinem či salicylovou kyselinou
BS1EGCCR	AGCGGG	FW	408	414	BS-1 vazebné místo nalezené v promotoru genu pro Cinnamoyl-CoA reduktázu (CCR); nutný k vaskulárně-specifické expresi
LeCP-ACS2	TAAAATAT	FW	536 1122	545 1131	vazebné místo transkripčního faktoru LeCP (tomato Cysteine Protease) v promotoru genu LeAcs2 (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase) – klíčového enzymu při syntéze ethylenu
GT1GMSCAM4	GAAAAA	FW	642 1050	648 1056	GT-1 motiv nalezný v promotoru calmodulinu (SCaM-4); tento motiv hraje roli při indukci exprese v přítomnosti patogenů či NaCl
MYB2CONSENSUSAT	YAACKG	FW	297	303	Myb-rozpoznávací místo nalezeno v promotoru genu rd22 reagujícího na dehydrataci
MYCCONSENSUSAT	CANNTG	FW	297 746 981	303 752 987	Myc-rozpoznávací místo nalezeno v promotoru genu rd22 reagujícího na dehydrataci
PYRIMIDINEBOXHVEPB1	TTTTTTCC	FW	373 556	381 564	„pyrimidinový box“ nalezný v promotoru genu EPB-1 (cystein proteáza)
SEBFCONSSTPR10A	YTGTCWC	FW	318 502	325 509	vazebné místo SEBF (silencing element binding factor) nalezeno v promotoru genu PR-10a (pathogenesis-related protein)
WRKY71OS	TGAC	FW	282 781 972 980	286 765 976 984	vazebné místo WRKY71, transkripčního represoru gibberelinové signální kaskády
WBOXATNPR1	TTGAC	FW	282 972 980	287 977 985	element rozpoznávaný WRKY DNA vazebnými proteiny, které jsou indukovány salicylovou kyselinou

Pozn.: Y = C/T , W = A/T, K = G/T

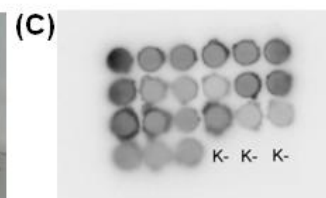


Obr. 18: Schéma promotoru pVSF1 s vyznačenými vazebnými elementy nalezenými pomocí databáze PLACE.

3.4. Charakterizace *N. benthamiana* transformovaných PSTVd AS1

Bylo získáno 26 regenerantů, z nichž v přítomnosti kanamycinu (50 mg/l) 16 bylo kořenicích (61,5%). Z 16 do půdy vysazených rostlin 4 odumřely a 7 bylo sterilních. Semena jsem tedy získal z 5 rostlin (č. 1, 3, 4, 12 a 14). Rostliny T0 generace byly charakteristické nižším vzrůstem a hustějším olistěním; jakékoliv další abnormální znaky nebyly pozorovány (Obr. 19-A).

(A)



(B)



Obr. 19: Charakterizace transformovaných rostlin a T1 generace: (A) fenotyp rostlin vzešlých z transformovaných explantátů; vyznačená délka = 10 cm (B) Fenotyp rostlin T1 generace; vyznačená délka = 10 cm (C) dot-blot hybridizace rostlin T1 generace potvrzující přítomnost viroidních částic. (D) Pozorovaná nekróza a odumírání řapíků listů u T1 generace.

Abychom stanovili počet lokusů, kde došlo k začlenění T-DNA, vyseli jsme semena T0 generace a stanovením počtu senzitivních a rezistentních jedinců jsme určili štěpný poměr (segregační test, kde selektivním znakem byla rezistence na kanamycin). Ani jedna z variant však při 5% hladině průkaznosti nedosahovala štěpného poměru 3:1 (1 kopie), 15:1 (2 kopie) či 63:1 (3 kopie) – viz Tab. II. Úspěšnost transformace však byla prokázána pomocí dot-blot

hybridizace, kdy jsme potvrdili přítomnost viroidu PSTVd AS1 v transformovaných rostlinách (Obr. 19-C).

Ze získaných transformantů jsme do půdy převedli 1 rostlinu linie 2554/1, 6 rostlin linie 2554/3, 4 rostliny linie 2554/4, 6 rostlin linie 2554/12 a 5 rostlin linie 2554/14. Rostliny T1 generace byly rovněž zakrslé v porovnání s kontrolami, docházelo k vrásnění listů (Obr. 19-B). U rostlin linie 2554/3 a 2554/12 (12 rostlin z 21 vysazených) byla navíc pozorována nekróza řapíku listů (Obr. 19-D).

Tab. II: Výsledky selekce transformantů T1 generace na selekčním MS médiu s kanamycinem.

linie	selektivní antibiotikum	rezistentní	citlivé	poměr	χ^2 (3:1)	χ^2 (15:1)	χ^2 (63:1)
2554/1	Ka	1	78	0,01	229,07	1153,22	4849,82
2554/3	Ka	27	51	0,53	67,85	465,51	2065,65
2554/4	Ka	4	36	0,11	93,08	493,66	2096,37
2554/12	Ka	32	24	1,33	9,52	128,08	620,86
2554/14	Ka	6	30	0,20	65,33	365,07	1565,02

Pozn.: hraniční hodnota při DF=1 a $\alpha=0,05$ je 3,84.

4. Diskuze

Indukce viroidních symptomů pomocí infiltrace a transformace *N. benthamiana*

Získáním kmenů *A. tumefaciens* nesoucích expresní rostlinné vektory s kontrastními kmeny PSTVd jsme vytvořili nástroj vhodný pro infekci metodou agro-infiltrace, která je aplikovatelná u modelových rostlin *N. benthamiana* (Voinnet et al., 2003). Tento druh byl dříve považován za tolerantního hostitele PSTVd (Hadidi et al., 2003), ovšem pomocí agro-infiltrace získaných vektorů s dimery PSTVd jsme schopni indukovat symptomy i u rostlin *N. benthamiana*, kdy v přítomnosti PSTVd dochází zejména k výrazné inhibici růstu (68,75% PSTVd AS1 a 80,65% PSTVd C3) a redukci listové plochy. Inokulace rostlin PSTVd pomocí *A. tumefaciens* byla používána již dříve (Salazar et al., 1988), v současnosti se k infekci *N. benthamiana* používá mechanické inokulace pomocí karborunda (Itaya et al., 2007; Kalantidis et al., 2007) či biolistická inokulace (Matoušek et al., 2004a; Matoušek et al., 2004b, Matoušek et al., 2007).

S cílem zesílit projevené symptomy jsme se zaměřili na transformaci *N. benthamiana* kmenem PSTVd AS1, který se u infikovaných *N. benthamiana* projevil jako nejvíce patogenní. Získání transformanti by byli velice užitečným nástrojem pro studium viroidní patogenese. Pro transformované rostliny *N. benthamiana* T0 i T1 generace byl typický malý vzrůst, u T1 generace navíc doprovázený vrásněním listů a u několika rostlin i nekrózou řapíků. Tyto fenologické projevy společně s dot-blot hybridizací potvrdily přítomnost viroidních molekul v transformovaných rostlinách. Příčina pozorované nekrózy u řapíků listů může souviset se zvýšením aktivity apoptotické nukleázy TBN1 vlivem PSTVd AS1 (Matoušek et al., 2007).

Pomocí segregačního testu se nám nepodařilo stanovit počet lokusů s integrovanou T-DNA. Počet rezistentních rostlin v poměru k senzitivním byl u všech variant oproti očekávání dosti nízký. Tato situace však byla pozorována i u rostlin *A. thaliana* obdobně transformovaných PSTVd AS1 (ing. Tomáš Kocábek, PhD., osobní sdělení). Získané rostliny budou dále využity v laboratoři Molekulární genetiky, zejména při studiu viroidní patogenese.

Vliv viroidní patogenese na aktivaci vybraných rostlinných promotorů

Rozdíl v projevených symptomech u rostlin *N. benthamiana* infikovaných jednotlivými kmeny PSTVd byl klíčový pro studium aktivace promotorů TBN1 a VSF1, kdy jsme byli schopni stanovit vztah mezi mírou aktivace promotorů a mírou projevených symptomů, který by popisoval možný vliv viroidní infekce na expresi vybraných genů.

pTBN1 byl vybrán z důvodu zjištění, že přítomnost kmene PSTVd AS1 zvyšuje hladinu apoptotické nukleázy TBN1 v cévních svazcích listů rajčete - *L. esculentum*, cv. Rutgers (Matoušek et al., 2007). Provedené pokusy v systému leaf factory potvrdily tento trend, kdy pTBN1 byl více aktivován u rostlin infikovaných PSTVd AS1. Protože při následujících pokusech byla pTBN1 interakce poměrně slabá a promotor byl nekompletní, zaměřili jsme se dále na podrobnou charakteristiku pVSF1, jehož aktivita dle našich předběžných experimentů korelovala se silou projevů viroidních symptomů. Tento transkripční faktor ovlivňuje tkáňově-specifickou expresi proteinu GRP1.8 (glycine-rich protein), který je zabudováván do buněčných stěn vznikajících tracheí (Torres-Schumann et al., 1996).

Souvislost projevu viroidní patogeneze skrze ovlivnění biogeneze cévních svazků napadené rostliny byla potvrzena nejen zvýšenou hladinou TBN1, ale i pozorováním redukce xylémové části cévních svazků v řapících (Matoušek et al., 2007). Abychom potvrdili ovlivnění biogeneze cévních svazků jako projev viroidní patogeneze na molekulární úrovni, analyzovali jsme aktivaci promotoru transkripčního faktoru VSF1.

Analýza pVSF1 prokázala silnou korelaci aktivace pVSF1 s mírou projevených symptomů, kdy nejvyšší aktivace dosahuje pVSF1 u zdravých a asymptomatických rostlin infikovaných PSTVd Mild, zatímco u silně zakrslých rostlin infikovaných kmenem PSTVd AS1 dosahuje pVSF1 minimální aktivace i v přítomnosti supresoru silencingu p19. Z těchto výsledků můžeme usuzovat, že pVSF1 ztrácí schopnost aktivace v přítomnosti patogenního PSTVd AS1, což může vést k poruše biogeneze cévních svazků a tím k projevu pozorovaných symptomů, zejména inhibice růstu (Obr. 20). Nabízí se zde možnost ovlivnění funkce či snížení/zvýšení hladiny neznámého transkripčního faktoru, který se podílí na aktivaci pVSF1, v průběhu viroidní infekce, přičemž míra narušení funkce či hladiny koreluje s mírou projevených symptomů.



Obr. 20: Schéma možného působení viroidní patogeneze na expresi VSF1 a tím vyvolaný projev symptomů. Přítomnost PSTVd může ovlivnit funkci či hladinu určitého TF či fytohormonu, což má za následek trvalou inhibici aktivace pVSF1.

Zjištění, že PSTVd inhibuje aktivaci pVSF1 a tudíž i expresi faktoru VSF1, tak potvrzuje pozorovaný trend, kdy viroidní infekce ovlivňuje expresi určitých genů v hostitelské rostlině (Hammond et al., 2000; Itaya et al., 2003; Matoušek et al., 2007; Vida et al., 2003).

Analýza pVSF1 *in silico* odhalila BS-1 motiv, který je zodpovědný za vaskulárně-specifickou expresi. Dále však zejména několik vazebných boxů pro transkripční faktory, které reagují na fyziologický stres (Myb a Myc boxy), přítomnost patogenů (GT-1 motiv) či jsou regulovány fytohormony (ARF, ASF1, WRKY71 a W-box). Přítomnost těchto boxů naznačuje, že funkce pVSF1 může být ovlivněna stresem či změnou hladiny určitého fytohormonu. Tuto možnost podporuje fakt, že přítomnost viroidu v rostlině mění hladinu určitých fytohormonů, například giberelinů (Vida et al., 2003). Transkripční faktor LeCP reguluje expresi genu *Acs2*, jehož produkt je klíčovým enzymem při syntéze ethylenu (Matarasso et al., 2005). Pokud by inhibice aktivace pVSF1 byla spojena s narušením funkce LeCP, jehož 2 vazebná místa byla v pVSF1 nalezena, byla by zároveň negativně ovlivněna exprese genu *Acs2* a tím i biosyntéza ethylenu.

Prokázáný vliv PSTVd na aktivaci pVSF1 může být realizován skrze ovlivnění specifických transkripčních faktorů. Naším dalším cílem je tedy pokusit se charakterizovat systém pVSF1 a jeho transkripčních faktorů. Dále pak získat kompletní promotor TBN1 a podrobit ho totožné analýze jako pVSF1.

Mechanismus vlivu supresorů silencingu na aktivaci promotorů v průběhu patogeneze

Koinfiltrací supresorů silencingu jsme dosáhli vyšší aktivace analyzovaných promotorů, neboť jsme potlačili PTGS v infiltrovaných oblastech vyvolané přítomností cizorodé cDNA (Voinnet et al., 2003). V průběhu pokusů byla pozorována schopnost PSTVd AS1 a částečně i PSTVd C3 inhibovat aktivaci pVSF1 i v přítomnosti supresoru silencingu p19. To může být vysvětleno buďto přímým ovlivněním funkce p19 v přítomnosti PSTVd AS1 anebo možností, že PSTVd AS1 nevratně ovlivňuje funkci či hladinu určitého TF regulujícího expresi VSF1 - supresor silencingu p19 sice potlačuje PTGS v infiltrované oblasti, ale k aktivaci pVSF1 nedochází vzhledem k absenci či disfunkci zmiňovaného TF. Fakt, že p19 plně aktivuje systém pCHS_H1 a jeho aktivátorů (bHLH2, JMyb2 a HLWD40) i u PSTVd AS1 infikovaných rostlin podporuje spíše druhou variantu a také poukazuje na vyšší specifitu interakce systému pVSF1 a viroidní infekce. Naproti tomu přítomnost PSTVd AS1 aktivovala pTBN1 a koinfiltrovaný p19 měl větší aktivační vliv na pTBN1 u zdravých rostlin oproti infikovaným, což naznačuje negativní ovlivnění funkce p19 v PSTVd AS1 infikovaných rostlinách.

V porovnání s p19 může být malá schopnost supresoru 2b aktivovat pVSF1 ve zdravých i infikovaných rostlinách připisována jinému funkčnímu principu, neboť na rozdíl od vysoce aktivujícího p19, který váže siRNA molekuly (Silhavy et al., 2002), 2b inhibuje restriční funkci AGO1 enzymu, který je součástí RISC komplexu (Zhang et al., 2006).

5. Závěr

(1) Byly zkonstruovány infekční vektory, obsahující dimerní fragment kontrastních kmenů PSTVd C3 a Mild v orientaci (--) pod promotorem 35S v expresním rostlinném vektoru pLV07, vhodné pro inokulaci rostlin *N. benthamiana* pomocí agro-infiltrace. Tyto vektory spolu s dříve připraveným vektorem pro PSTVd AS1 umožnily studovat projevy patogeneze u druhu *N. benthamiana*.

(2) Symptomy u rostlin *N. benthamiana* inokulovaných zkonstruovanými vektory se lišily v míře projevu v závislosti na kmeni PSTVd, kdy nejvíce patogenní byl PSTVd AS1, následován PSTVd C3 a PSTVd Mild byl asymptomatický. Dále jsme získali a charakterizovali rostliny *N. benthamiana* transformované viroidem PSTVd AS1, u kterých byly v porovnání s agro-inokulací pozorovány výraznější projevy viroidní patogeneze (silná zakrslost, nekróza řapíků).

(3) Aktivace pTBN1 byla v souladu s dřívějšími pozorováními pozitivně ovlivněna přítomností PSTVd AS1. Naproti tomu aktivace pVSF1 byla negativně ovlivněna přítomností PSTVd, kdy míra inhibice pVSF1 korelovala s mírou projevu symptomů u infikovaných rostlin *N. benthamiana*. Supresor silencingu p19 výrazně zvýšil aktivaci pTBN1 i pVSF1 ve zdravých rostlinách, zatímco u silně symptomatických PSTVd AS1 infikovaných rostlin byl vliv p19 na aktivaci obou promotorů minimální. Supresor silencingu 2b v porovnání s p19 neprokazoval výraznější aktivaci pVSF1.

6. Použité zkratky

bp	„base pairs“ – páry bází
BSA	„bovine serum albumine“ – hovězí sérový albumin
cDNA	„complementary“ DNA
cv.	kultivar
ddH ₂ O	deionizovaná voda
dpi	„days post infection“ – dny po infekci
dsDNA/RNA	„double-stranded“ DNA/RNA – dvouřetězcová DNA/RNA
EtBr	ethidium bromid
MUG	4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronid
PCR	„polymerase chain reaction“ – polymerázová řetězová reakce
RT	„room temperature“ (pokojová teplota)
ssDNA/RNA	„single-stranded“ DNA/RNA – jednořetězcová DNA/RNA
TF	„transcription factor“ – transkripční faktor
v/w	„volume/weight“ ratio – poměr objem/váha

7. Citovaná literatura

- Baulcombe D.** (2004) RNA silencing in plants. *Nature* 431: 356–63
- Carrington, J.C., Ambros, V.** (2003) Role of microRNAs in plant and animal development. *Science* 301: 336–38
- Chiu, M-H, Chen, I-H, Baulcombe, D.C., Tsai, Ch-H** (2010) The silencing suppressor P25 of *Potato virus X* interacts with Argonaute1 and mediates its degradation through the proteasome pathway. *Molecular Plant Pathology* 11 (5): 641–649
- Daros, J.A., Elena, S.F., Flores, R.** (2006) Viroids: An Ariadne’s thread into the RNA labyrinth. *EMBO Rep.* 7: 593-588
- Deleris, A., Gallego-Bartolome, J., Bao, J., Kasschau, K.D., Carrington, J.C., Voinnet, O.** (2006) Hierarchical Action and Inhibition of Plant Dicer-Like Proteins in Antiviral Defense. *Science* 313: 68-71
- Diener, T.O.** (1971) Potato spindle tuber “virus” : IV. A replicating, low molecular weight RNA. *Virology* 45: 411-428
- Ding, B., Kwon, M-O., Hammond, R., Owens, R.A.** (1997) Cell-to-cell movement of potato spindle tuber viroid. *Plant Journal* 12: 931–36
- Ding, B., Itaya, A.** (2007) Viroid: A useful model for studying the basic principles of infection and RNA biology. *Mol. Plant-Microbe Inter.* 20: 7-20
- Flores, R., Delgado, S., Gas, M.E., Carbonell, A., Molina, D., Gago, S., Pena, M.** (2004) Viroids: the minimal non-coding RNAs with autonomous replication. *FEBS Letters* 567: 42-48
- Flores, R., Hernández, C., Martínez de Alba, A.E., Daròs, J.-A., Di Serio, F.** (2005) Viroids and viroid-host interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43: 117-139
- Gelvin, B.G.** (2003) *Agrobacterium*-Mediated Plant Transformation: the Biology behind the “Gene-Jockeying” Tool. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67 (1): 16–37
- Goldfarb, A.N., Lewandowska, K.** (1994) Nuclear redirection of a cytoplasmic helix-loop-helix protein via heterodimerization with a nuclear localizing partner. *Exp. Cell Res.* 214: 481-485.
- Gómez, G., Martínez, G., Pallás, V.** (2008) Viroid-induced symptoms in *Nicotiana benthamiana* plants are dependent of RDR6 activity. *Plant Physiol.* 148: 414–423
- Góra-Sochacka, A.** (2004) Viroids: unusual small pathogenic RNAs. *Acta Biochimica Polonica* 51 (3): 587-607

- Hadidi, A., Flores, R., Randles, J.W., Semancik, J.S.** (2003) *Viroids*, CSIRO publishing, ISBN 0643067892, p.126-127
- Hammond, R.W., Zhao, Y.** (2000) Characterization of a tomato protein kinase gene induced by infection by *Potato spindle tuber viroid*. *Mol Plant-Microbe Interact* 13: 903-910
- Hammond, R.W., Zhao, Y.** (2009) Modification of tobacco plant development by sense and antisense expression of the tomato viroid-induced AGC VIIIa protein kinase PKV suggests involvement in gibberellin signaling. *BMC Plant Biology* 9: 108 (doi:10.1186/1471-2229-9-108)
- Chytilova, E., Macas, J., Galbraith, D.W.** (1999) Green Fluorescent Protein Targeted to the Nucleus, a Transgenic Phenotype Useful for Studies in Plant Biology. *Annals of Botany* 83: 645-654
- Itaya, A., Folimonov, A., Matsuda, Y., Nelson, R.S., Ding, B.** (2001) Potato spindle tuber viroid as inducer of RNA silencing in infected tomato. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14: 1332-1334
- 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. *Mol Plant Microbe Interact* 10: 990-999
- Itaya, A., Zhong, X., Bundschuh, R., Qi, Y., 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. *J. Virol.* 81 (6): 2980-2994
- Kalantidis, K., Denti, M.A., Tzortzakaki, S., Marinou, E., Tabler, M., Tsagris, M.** (2007) Virp1 is a host protein with a major role in *Potato Spindle Tuber Viroid* infection in *Nicotiana* plants. *J Virol.* 81 (23): 12872–12880
- Lakatos, L., Csorba, T., Pantaleo, V., Chapman, E.J., Carrington, J.C., Liu, Y-P, Dolja, V.V., Calvino, L.F., López-Moya, J.J., Burgyán, J.** (2006) Small RNA binding is a common strategy to suppress RNA silencing by several viral suppressors. *The EMBO Journal* 25: 2768–2780
- 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.
- Maniataki, E., Tabler, M., Tsagris, M.** (2003) Viroid RNA systemic spread may depend on the interaction of a 71-nucleotide bulged hairpin with the host protein VirP1. *RNA* 9: 346-354

- Martínez de Alba, A.E., Flores, R., Hernández, C.** (2002) Two chloroplastic viroids induce the accumulation of small RNAs associated with posttranscriptional gene silencing. *J. Virol.* 76: 13094-13096
- Mérai, Z., Kerényi, Z., Kertész, S., Magna, M., Lakatos, L., Silhavy, D.** (2006) Double-Stranded RNA Binding May Be a General Plant RNA Viral Strategy To Suppress RNA Silencing. *J. Virol.* 80 (12): 5747–5756
- Matarasso, N., Schuster, S., Avni, A.** (2005) A Novel Plant Cysteine Protease Has a Dual Function as a Regulator of 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid Synthase Gene Expression. *The Plant Cell* 17: 1205–1216
- Matoušek, J., Orctová, L., Steger, G., Škopek, J., Moors, M., Dědič, P., Riesner, D.** (2004a) Analysis of thermal stress-mediated PSTVd variation and biolistic inoculation of progeny of viroid „thermomutants“ to tomato and *Brassica* species. *Virology* 323: 9-23
- Matoušek, J., Orctová, L., Steger, G., Riesner, D.** (2004b) Biolistic inoculation of plants with viroid nucleic acids. *J. Virol.* 122: 153-164
- Matoušek, J., Kozlová, P., Orctová, L., Schmitz, A., Pešina, K., Bannach, O., Diermann, N., Steger, G., Riesner, D.** (2007) Accumulation of viroid-specific small RNAs and increase in nucleolytic activities linked to viroid-caused pathogenesis. *Biol. Chem.* 388: 1-13
- Matoušek, J., Stehlik, J., Orctová, L., Duraisamy, G. S., Selinger, M., Füßy, Z., Steger, G.** (2010) The sequence differences between potato spindle tuber viroid variants PSTVd-C3, evolved in *Chamomilla recutita*, and PSTVd-AS1 suggest diverse primary targets of viroid pathogenesis. In: *EMBO/EMBL Symposium: Non-Coding Genome*, Heidelberg, Germany, October 13-16, p. 208
- Nečásek, J.** (1993) Genetika. *Scientia*, 1. vydání, ISBN 80-85827-04-2, 76-77
- Owens, R.A., Hammond, R.W.** (2009) Viroid Pathogenicity: One Process, Many Faces. *Viruses* 1: 298-316
- Papaefthimiou, I., Hamilton, J.H., 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 Res.* 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 hop (*Humulus lupulus* L.). *Biol. Plant.* 44: 579-585
- Selinger, M.** (2008) Infekční systém pro studium mechanismů viroidní patogeneze. Středoškolská odborná činnost 2007/2008, Obor – biologie

- Schauer, S.E., Jacobsen, S.E., Meinke, D.W., Ray, A.** (2002) DICER-LIKE1: blind men and elephants in Arabidopsis development. *Trends Plant Sci.* 7: 487-491
- Silhavy, D., Molnar, A., Lucioli, A., Szittyá, G., Hornyik, C., Tavazza, M., Burgyan, J.** (2002) A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21- to 25-nucleotide double-stranded RNAs. *EMBO J.* 21: 3070–3080
- Strachan, T., Read, A.P.** (1999) Human Molecular Genetics, 2nd edition, New York: Wiley-Liss; NCBI Bookshelf (Bookshelf ID: NBK7588). A service of the National Library of Medicine, National Institutes of Health. ISBN-10: 1-85996-202-5
- Tabler, M., Tsagris, M.** (2004) Viroids: petite RNA pathogens with distinguished talents. *Trends Plant Sci.* 9: 339-348
- Töpfer, R., Matzeit, V., Gronenborn, B., Schell, J., Steinbiss, H.H.** (1987) A set of plant expression vectors for transcriptional and translational fusions. *Nucleic Acids Res* 15: 5890
- Torres-Schumann, S., Ringli, Ch., Heierli, D., Amrhein, N., Keller, B.** (1996) *In vitro* binding of the tomato bZIP transcriptional activator VSF-1 to a regulatory element that controls xylem-specific gene expression. *The Plant Journal* 9 (3): 283-296
- Trinks, D., Rajeswaran, R., Shivaprasad, P.V., Akbergenov, R., Oakeley, E.J., Veluthambi, K., Hohn, T., Pooggin, M.M.** (2005) Suppression of RNA Silencing by a Geminivirus Nuclear Protein, AC2, Correlates with Transactivation of Host Genes. *J. Virol.* 79 (4): 2517–2527
- Vaucheret, H.** (2004) Post-transcriptional small RNA pathways in plants: mechanisms and regulations. *Genes & Development* 20: 759–771
- Vidal, A.M., Ben-Cheikh, W., Talón, M., García-Martínez, J.L.** (2003) Regulation of gibberellin 20-oxidase gene expression and gibberellin content in citrus by temperature and citrus exocortis viroid. *Planta* 216: 442-448
- Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P., Baulcombe, D.** (2003) An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J.* 33: 949-956
- Vrba, L., Matoušek, J.** (2005) Expression of modified 7SL RNA gene in transgenic *Solanum tuberosum* plants. *Biologia Plantarum* 49 (3): 371-380
- Wang, M.B., Bian, X.Y., Wu, L.M., Liu, L.X., Smith, N.A., et al.** (2004) On the role of RNA silencing in the pathogenicity and evolution of viroids and viral satellites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 3275–80

- Wassenegger, M., Spieker, R.L., Thalmeir, S., Gast, F.U., Riedel, L., Sanger, H.L.** (1996) A single nucleotide substitution converts potato spindle tuber viroid (PSTVd) from a noninfectious to an infectious RNA for *Nicotiana tabacum*. *Virology* 226: 191–97
- Wray, G.A., Hahn, M.W., Abouheif, E., Balhoff, J.P., Pizer, M., Rockman, M.V. and Romano, L.A.** (2003) The Evolution of Transcriptional Regulation in Eukaryotes. *Mol. Biol. Evol.* 20 (9): 1377–1419.
- Zhang, X., Yuan, Y-R., Lin, S-S., Tuschl, T., Patel, D.J., Chua, N-H.** (2006) *Cucumber mosaic virus*-encoded 2b suppressor inhibits *Arabidopsis* Argonaute1 cleavage activity to counter plant defense. *GENES & DEVELOPMENT* 20: 3255–3268
- Zhong, X., Archual, A.J., Amin, A.A., Ding, B.** (2008) A Genomic Map of Viroid RNA Motifs Critical for Replication and Systemic Trafficking. *The Plant Cell* 20: 35-47