

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**  
**Přírodovědecká fakulta**

**Funkční analýza overexprese genu pro transkripční  
faktor typu Myb z rajčete, potenciálního targetu  
infekce viroidem PSTVd**

Bakalářská práce

**Jaroslav Ondruš**

Školitel: Ing. Tomáš Kocábek Ph.D.

České Budějovice 2014

**Ondruš, J.**, 2014: Funkční analýza overexprese genu pro transkripční faktor typu Myb z rajčete, potenciálního targetu infekce viroidem PSTVd. [Function analysis of overexpression of gene for a Myb transcription factor from tomato, potential target of viroid infection. Bc. Thesis, in Czech.] – 49 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

**Annotation:** The main aim of this thesis was to find out whether gene *Trifoliata*, encoding a transcription factor from Myb family could be target of viroid PSTVd and is involved in its unknown interactions with host plant molecules, responsible for PSTVd pathogenesis. For this purpose, transformation of wild type plants *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana tabacum*, and mutant *lof-1 Arabidopsis thaliana* with *Trifoliata* was made, changed anatomy and morphogenesis of transformants has been observed. Due to our research and already known facts we suggest *Trifoliata* has a great importance in regulation of specific organs development. Manipulation with expression of this gene in some cases led to triggering similar symptoms as PSTVd causes.

Prohlašuji, že jsem práci vypracoval samostatně pouze s použitím literatury uvedené 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 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.

V Českých Budějovicích dne .....

Jaroslav Ondruš

## **Poděkování**

Děkuji svému školiteli Ing. Tomáši Kocábkovi PhD. za odborné vedení práce, cenné připomínky a skvělý přístup. Jsem velmi vděčný Mgr. Anně Týcové, Ing. Janě Jehlíkové a Ing. Kristýně Siglové za čas, který mi věnovaly, jejich trpělivost se mnou, zodpovídání mých tradičních otázek, a milou spolupráci. Děkuji vám. Nemalé díky patří samozřejmě mé rodině, bez které by studium v Českých Budějovicích nebylo uskutečnitelné, za značnou finanční, a neustávající morální podporu.

# Obsah

1	Úvod.....	1
1.1	Teoretický úvod do problematiky .....	1
1.2	Viroidy .....	2
1.3	Transkripční faktory .....	5
1.4	Komplexní pochody vedoucí k determinaci částí těl rostlin.....	6
1.5	<i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh .....	8
1.6	<i>Nicotiana benthamiana</i> a <i>Nicotiana tabacum</i> .....	9
1.7	Bakterie <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	9
1.8	Transientní exprese a posttranskripční umlčování genové exprese.....	11
1.9	Metody detekce přítomnosti transgenů v transformovaných buňkách .....	12
2	Cíle práce.....	13
3	Materiál a metody.....	13
3.1	Rostlinný materiál.....	13
3.2	Kultivace rostlin.....	13
3.3	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	14
3.4	Transformace <i>A. thaliana</i> metodou infiltrace květenství.....	15
3.5	Transformace disků <i>Nicotiana benthamiana</i> a <i>Nicotiana tabacum</i> .....	17
3.6	Výsev semen <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	19
3.7	Výsev semen <i>Nicotiana benthamiana</i> a <i>Nicotiana tabacum</i> .....	19
3.8	Izolace DNA .....	20
3.9	Amplifikace pomocí PCR.....	20
4	Výsledky.....	21
4.1	<i>Arabidopsis thaliana</i> .....	21
4.2	Genetická analýza štěpných poměrů <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	22
4.3	Přítomnost transgenů v rostlinách <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	23
4.4	Fenotyp transformovaných rostlin .....	23
4.5	Komplementační analýza transgenních mutantů <i>lof1</i> .....	24
4.6	Genetická analýza štěpných poměrů <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	25
4.7	Přítomnost transgenů v rostlinách <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	26
4.8	Fenotyp transformovaných rostlin .....	28
4.9	Genetická analýza štěpných poměrů <i>Nicotiana tabacum</i> .....	31
4.10	Přítomnost transgenů v rostlinách <i>Nicotiana tabacum</i> .....	31

4.11	Fenotyp transformovaných rostlin .....	32
4.12	Transientní exprese .....	33
5	Diskuze.....	37
5.1	Testování přítomnosti transgenu.....	37
5.2	Možné příčiny projevovaných symptomů .....	37
5.3	Funkční nenahraditelnost genů <i>Tf</i> a <i>Lof1</i> .....	40
5.4	Způsobení symptomů podobných infekci viroidem PSTVd.....	41
6	Závěr.....	42
	Použitá literatura.....	44
	Použité zkratky .....	49

# 1 Úvod

## 1.1 Teoretický úvod do problematiky

Viroidy jsou velmi malé patogenní částice napadající rostliny. Jsou to molekuly cirkulární nekódující RNA bez membrány, obalu, či proteinu o velikosti přibližně od 250 do 400 nukleotidů. Způsobují škody na mnoha druzích rostlin, zahrnujících i plodiny využívané člověkem. V současnosti je známo několik druhů viroidů, které rozlišujeme podle jejich genomů a terciární struktury, které díky změně primárního kódu nabývají (Keese a Symons 1985).

Infekce některými z nich způsobují v hostitelských rostlinách prakticky žádné, či minimální symptomy, naopak jiné viroidy rostliny doslova decimují a v případě hospodářsky významných druhů způsobují velké škody a představují tedy potenciální nebezpečí a ekonomické komplikace. Ačkoliv byly od objevení viroidů (Diener 1971) publikovány představy působení viroidu a původu „nemocí“ jimi vyvolávaných (Flores *et al.*, 2004, 2005), přesné působení viroidu na molekulární úrovni je stále záhadou a kaskáda dějů zodpovědných za konečné poruchy ve vývoji, růstu a patogenezí napadených rostlin čeká na objasnění. Dle současných omezených znalostí se tak děje na základě interakce malých molekul RNA, vznikajících při kumulaci viroidu, s molekulami hostitelského organismu. Tato práce má za úkol přispět k porozumění mechanismu působení viroidu vřetenovitosti hlíz bramboru, známého jako *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd). Tento viroid napadá některé zástupce z čeledi *Solanaceae*, například *Solanum lycopersicum* L. Postih viroidem se projevuje velmi variabilními příznaky s různou mírou závažnosti, záleží na genomu viroidu i hostitele (Matoušek *et al.*, 2007).

Na základě bioinformatické analýzy provedené prof. Stegerem (Heinrich Heine Universität, Düsseldorf, Německo), ve které byly srovnávány sekvence microRNA odvozené z různých částí viroidu s částmi již zcela známého genomu *Solanum lycopersicum*, se kterými viroidem derivované molekuly mohou interagovat, bylo předpovězeno velké množství genů, které by mohly být ovlivňovány jevem známým jako RNA interference (RNAi). Navazující výzkum exprese těchto genů v infikovaných rostlinách vedl k zúžení vybraných genů, které byly považovány za potenciální geny interagující dosud přesně neobjasněným způsobem s viroidem PSTVd. Gen *Trifoliata* (*Tf*, GeneBank kód JX522478), patří mezi geny, jejichž exprese je významně snížena v případě patogenezise viroidem PSTVd, kmenem AS1. Kóduje

transkripční faktor typu R2R3 Myb a může hrát majoritní roli ve změně fenotypu napadených rostlin (Selinger 2013). Téma práce vzniklo v době, kdy o funkci genu *Tf* nebyly dostupné žádné informace a bylo možné se opřít jen o funkční studie obdobných genů z jiných rostlinných druhů.

Cílem této práce je získat co nejvíce informací o *Tf*, obsahujícím konzervovanou DNA vazebnou doménu R2R3 jeho overexpresí v rostlinách *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana benthamiana* a *Nicotiana tabacum* a využitím poznatků získaných funkčním studiem homologického genu *Lof* z *A. thaliana*.

## 1.2 Viroidy

Viroidy jsou malé infekční agens, napadající rostliny. Jsou to malé cirkulární nekódující RNA o velikosti 250 – 400 bází s charakteristickou strukturou, která jim propůjčuje vysokou stabilitu. Na rozdíl od virů nenesou, ani nekódují žádný protein, a jsou tedy zcela závislé na buněčných mechanismech hostitele. Jsou to infekční částice, které napadají některé rostliny včetně rajčat, ve kterých způsobují rozličné symptomy od (téměř) žádné změny fenotypu až po viditelné rozsáhlé poškození, trpasličí vzrůst a znehodnocení organismu pro hospodářské účely. Ty závisejí kromě kultivaru rostliny i na konkrétní sekvenci viroidu - již malé změny v sekvenci RNA jsou schopné radikálně změnit projevy infekce (Owens *et al.*, 1996, Diermann *et al.* 2010). Mají schopnost velmi rychlé evoluce (Diener 1995, Ding 2010).

Například viroid PSTVd byl detekován ve viroid sensitivním kultivaru rajčete Rutgers, kde způsoboval viditelné symptomy, oproti tomu ve viroid resistantním kultivaru Goldkugel se neprojevoval vůbec (Stark-Lorenzen *et al.*, 1997). Jak dokazují i jiní autoři, přírodní „zdravý“ fenotyp nemusí nutně znamenat nepřítomnost viroidů (Flores *et al.*, 2005), absence známek infekce tedy nemusí znamenat neschopnost rostliny hostit viroidy, ovšem stále mohou být rezervoárem viroidů.

Viroidy se skládají z určitých konzervovaných domén, které obsahují místa, kde změna i velmi malého počtu bází může ve výsledku změnit patogenitu viroidových agens (Wassenegger *et al.*, 1996, Owens *et al.*, 1996). Tyto záměny v sekvenci způsobují změnu terciální struktury viroidu, což pozměňuje vlastnosti těchto malých molekul, jejich patogenitu a umožňuje určité rozdělení viroidů právě na základě stavby těchto domén (Keese

a Symons 1985). Při infekci rostliny viroidy *Pospoviroidae* nejprve dochází ke vstupu do jádra, kde se odehrává replikace agens, po opuštění jádra se viroidy šíří na mezibuněčné úrovni plasmodesmaty rostliny, posléze cestuje vodivými pletivými spolu s asimiláty floémem (Zhu *et al.*, 2001). Replikační cyklus viroidů v rostlinných buňkách je komplexní děj, který může být sdílen některými jinými malými infekčními RNA (Branch a Robertson 1984).

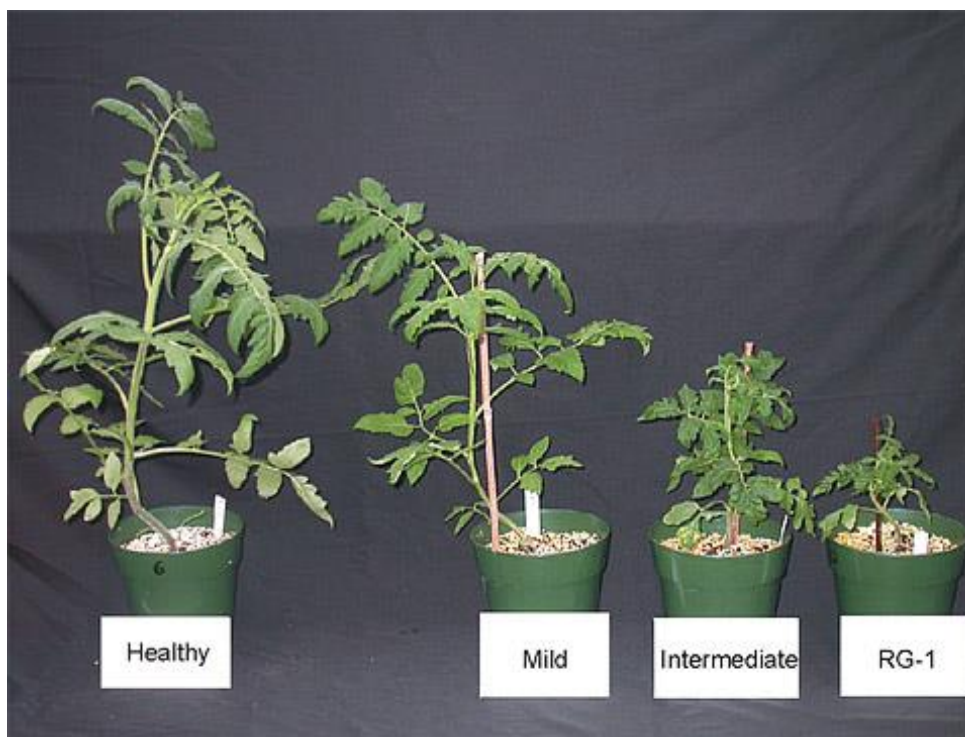
Viroidy se dělí primárně do rodin *Pospiviroidae* (pojmenované podle *Potato spindle tuber viroid* – PSTVd) a *Avsunviroidae* (pojmenováno podle *Avocado sun blotch viroid* – ASBVd). Skupiny se liší kromě lokalizace v buňce, kdy viroidy ze skupiny *Pospiviroidae* jsou přítomny v jádrech buněk, oproti tomu *Avsunviroidae* využívají chloroplasty (Lima 1994), např. i mechanismem replikace (Darós *et al.*, 1994).

Příklad symptomů způsobených PSTVd, zahrnující zakrslost, trpasličí vzrůst, vrásnění listů a jejich deformace, a *Tomato chlorotic dwarf viroidu* (TCDVd) je na obrázku 1, který srovnává fenotyp rostliny rajčat napadené těmito viroidem oproti kontrolnímu organismu. Rostliny zde byly infikovány izolátem z listů již napadených rostlin ve stádiu 4 listů. Fotografie byly pořízeny 45 dní po této inokulaci. Obrázky 2 a 3 zobrazují různé míry těchto symptomů v rostlinách *Solanum lycopersicum* kultivaru Rutgers způsobených PSTVd.

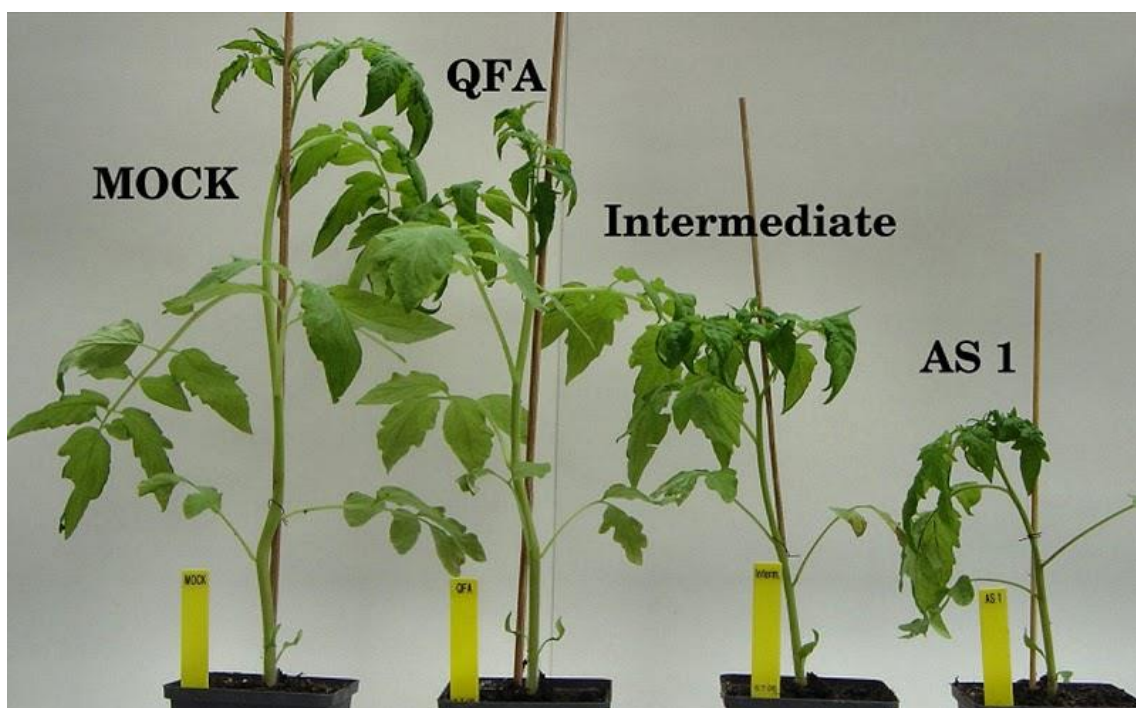


Obr. 1: Symptomy způsobené viroidy PSTVD a TCDVd rostlinám *Solanum lycopersicum* kultivaru Sheyenee ve srovnání se zdravým jedincem. Převzato z Xianzhou 2012.



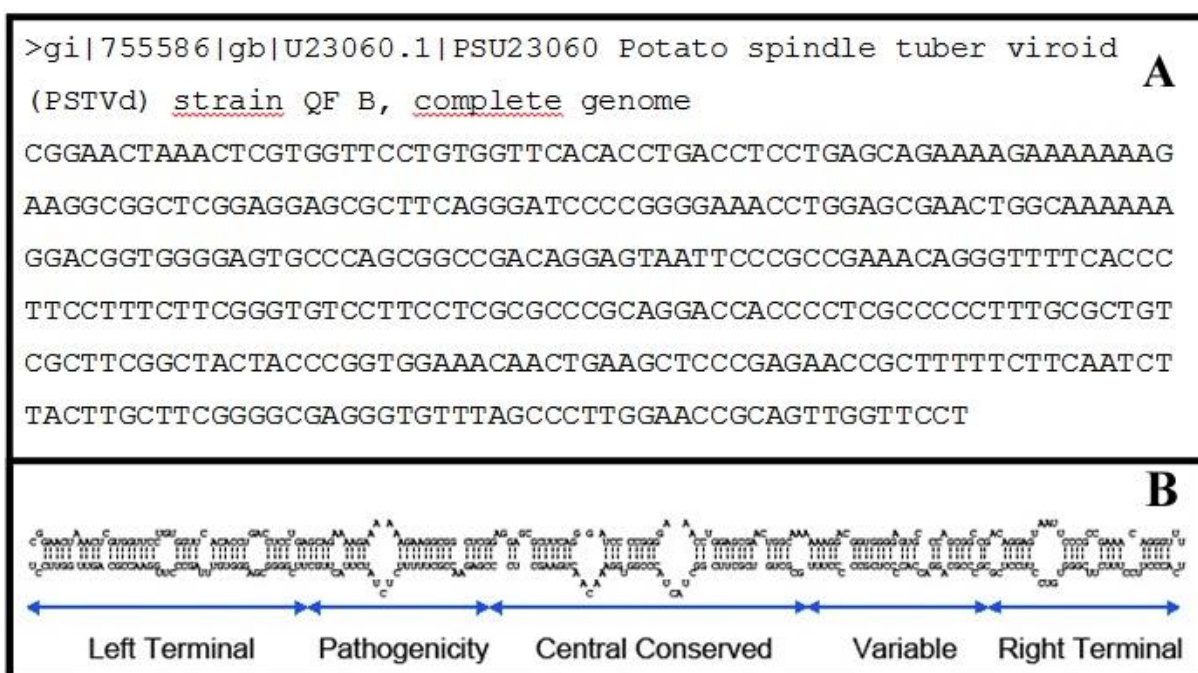


Obr. 2: Zobrazení 3 druhů symptomů způsobené viroidem PSTVd rostlinám *Solanum lycopersicum* kultivaru Rutgers. Převzato z Hammond a Owens 2006.



Obr. 3: Různá míra symptomů způsobených rozdílnými kmeny PSTVd v rostlinách *Solanum lycopersicum*. Převzato z Diermann *et al.* 2010.

Obrázek 4 přibližuje primární a sekundární strukturu viroidu. Právě vysoce komplementární struktura, kterou viroidy tvoří, je zodpovědná za velkou stabilitu viroidů proti mechanickým, chemickým či tepelným vlivům. Na sekundární struktuře lze rozlišit jednotlivé domény Left Terminal (levá koncová doména), Pathogenicity (patogenní doména), Central Conserved (centrální konzervovaná doména), Variable (variabilní doména) a Right Terminal (pravá koncová doména) podle kterých viroidy lze rozlišit, a které jsou zodpovědné za charakteristické vlastnosti a schopnosti viroidů. Každá z nich má v biologickém životě viroidu svoji specifickou roli, přičemž složení jednotlivých domén více, či méně ovlivňuje chování viroidu a defekty jím způsobené (Wassenegger *et al.*, 1996, Owens *et al.*, 1996).



Obr. 4: (A) Primární struktura viroidu PSTVd (získáno z GeneBank) a (B) jeho sekundární struktura s vyznačenými doménami LT, P, CC, V a RT. Převzato z Hammond a Owens 2006.

### 1.3 Transkripční faktory

Transkripční faktory jsou proteiny ovlivňující transkripci. Díky svým vazebným doménám jsou schopné vázat se specificky na DNA. Po navázání na řetězec ovlivní činnost RNA-polymerázy II, která posléze podle kódujícího vlákna syntetizuje mRNA, která později prodělává ještě další úpravy, než je podle jejího kódu ribozomy syntetizován protein.

Důležitou úlohu v počátku transkripce má TATA box, který podle současných znalostí nepůsobí přímo jako místo nasedání RNA polymerázy, ale jako místo, do jehož blízkosti nasedají proteiny vázající se na DNA známé právě jako transkripční faktory. Ty působí většinou v komplexu několika podjednotek a umožňují nasednutí RNA polymerázy na promotor. Kromě promotoru je transkripce ovlivňována místy známé jako zesilovače, které se mohou vyskytovat i tisíce bp od místa počátku replikace (Dam-Mieras *et al.*, 1993).

Místo, na které se na DNA váže, se nazývá promotor. Kromě „povzbuzení“ či zahájení exprese genu může transkripční faktor mít i blokační účinky, v takovém případě se nazývá represor. Transkripční faktory mohou fungovat v komplexu složeném z více podjednotek a regulace se tak účastní mohutné proteinové komplexy. Samotný jeden protein obsahuje kromě DNA vazebného místa i trans-aktivační doménu, která slouží jako vazebné místo pro další transkripční faktory, a ligand vázající doménu. Přítomnost specifických ligandů potom upravuje funkci faktoru. Právě tento variabilní a flexibilní systém umožňuje velmi jemně regulovat genovou expresi v eukaryotních organismech (Dam-Mieras *et al.* 1993).

#### **1.4 Komplexní pochody vedoucí k determinaci částí těl rostlin**

Komplexní pochody, regulované na mnoha úrovních, které vedou k determinaci listů a morfologii nejsou stále dostatečně prozkoumány, nicméně se tak děje za jemné a velmi regulované spolupráce exprese určitých genů, látek (často hormonální povahy) a jejich vzájemným působením a ovlivňováním. Uspořádání fytomerů na rostlinách a jejich samotný vývoj je řízen komplexní sítí dějů regulovaných na mnoha úrovních, přičemž z velké míry se v těchto regulačních kaskádách angažují hormony a transkripční faktory. V mnohých eukaryotních organismech existují geny kódující transkripční faktory z rodiny MYB, které dosáhly zvláštní diversity u rostlin (Dubos *et al.*, 2010).

Ve značně početné rodině transkripčních faktorů typu Myb u *Arabidopsis* bylo identifikováno 198 genů, které se podílejí na řízení vývojových procesů a reakcí na stres (Chen *et al.*, 2006). Proteiny z této rodiny jsou charakteristické konzervovanou doménou, která má schopnost vázat se specificky na DNA (Stracke *et al.*, 2001). Tyto proteiny se podílejí na regulačních systémech řídících vývoj i konečnou morfologii jednotlivých orgánů rostlin, na metabolismu a odpovědích na biotický a abiotický stres (Dubos *et al.*, 2010).

Ukazuje se, že v některých částech rostliny rajčete (*Solanum lycopersicum*) má v těchto dějích zásadní úlohu gen *Tf* (Naz *et al.*, 2012).

Velký vliv má například na uspořádání lístků, přičemž geny jemu podobné se uplatňují ve velkém množství organismů fylogeneticky vzdálených. *Tf* je exprimován v okrajích listů, při vývoji míra jeho exprese koreluje s mírou složitosti listů (Naz *et al.*, 2012). Spolupráce podobných genů, kódujících proteiny známé jako transkripční faktory, spolu s některými hormony jsou zodpovědné za obrovskou variabilitu ve fenotypu jednotlivých druhů rostlin. Gen *Tf* obsahuje sekvenci kódující do značné míry podobnou sekvenci pro protein „lateral organ fusion 1“ (LOF 1), který se vyskytuje v *Arabidopsis thaliana* (Lee *et al.*, 2009, Naz *et al.*, 2012). Gen *Lof1* kóduje protein také z rodiny MYB, který je obdobně transkripčním faktorem. Jak ukazují Lee *et al.*, (2009) ve své práci, *Lof1* je exprimován na okrajích některých orgánů, což má za následek poruchy v růstu a abnormální srůsty v oblastech, kde větve odstupují od stonku.

Geny, ovlivňující morfologii okrajů orgánů, jako je *Tf* či *Lof1*, jsou samy ovlivňovány některými látkami, například brasinosteroidy (Gendron *et al.*, 2012). Ty mohou ovlivňovat aktivací transkripční faktory BRZ1, které dále potlačují celé rodiny genů, například CUP-SHAPED COTYLEDON geny. Jelikož v rostlinách dochází k velké akumulaci BRZ1 v buňkách náležících k centrální části meristému a primordií jednotlivých orgánů, ale oproti tomu v buňkách patřících k okrajovým oblastem orgánů, dochází díky tomuto rozdílu k charakteristickému vývoji částí organismu. (Částečným) umlčením těchto genů potom dochází ke specifickým srůstům. Patří k nim kromě genů z rodiny CUP-SHAPED COTYLEDON (*Cuc1*, *Cuc2*, *Cuc3*) právě i *Lof1*, produkující transkripční faktory. Například u dvojíých mutantů *Arabidopsis thaliana cuc2cuc3*, kteří vykazují přibližně poloviční míru exprese *Lof1* oproti wild type, byly prokázány abnormální srůsty samčích pohlavních orgánů, tyčinek viz Obr. 5 (Gendron *et al.*, 2012).



Obr. 5: Srůsty tyčinek a tkáně v postranní oblasti způsobené tlumením exprese *Lof1*. Převzato z Gendron *et al.*, 2012.

### 1.5 *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh

*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh (huseníček rolní) patří do čeledi *Brassicaceae*. Je to kosmopolitně rozšířená rostlina vyskytující se v různorodých nadmořských výškách (Hoskovec 2007). Dosahuje výšky až 30 cm, z přízemní růžice listů se tyčí hlavní stonek, ze kterého časem přirůstají postranní větve. Květy sestávají ze čtyř lístků kališních a čtyř lístků korunních. Květy obsahují 6 tyčinek, 1 pestík se semeníkem. Rostlina je samosprašná. Po oplození se utváří šešule, které po dozrání praskají, měří přibližně 1 centimetr. Při dozrání se zbarví do žluta, semena se uvolňují pukáním (Hoskovec 2007).

Jedná se o modelovou rostlinu. Pro účely studia genetiky a molekulární biologie se využívá přibližně od začátku 20. století. K tomu ji předurčuje několik jejích vlastností. Je to především její krátká vegetační doba, která umožňuje pěstovat několik generací ročně. Malý vzrůst umožňuje s *Arabidopsis* manipulovat i v prostředí *in vitro*, velký počet semen umožňuje snadno selektovat transformanty. Neobvykle malý genom, který čítá přibližně 125 milionů párů bází (bp) a pouze 5 chromozomů velmi ulehčuje genetickou analýzu. Genom, jehož sekvenace jakožto první vyšší rostliny byla dokončena v roce 2000, obsahuje 25 498 genů, přičemž od značné části existují mutanti (Kaul *et al.*, 2000).

## 1.6 *Nicotiana benthamiana* a *Nicotiana tabacum*

Tabák je rostlina s velkým významem pro tabákový průmysl zásobující lidstvo kuřivem. V současnosti se pěstuje téměř po celém světě. K největším pěstitelům patří Čína, USA, Brazílie, Indie. Je ceněn zejména kvůli obsahu sekundárního metabolitu – alkaloidu nikotinu, který má charakteristické účinky zahrnující změny kardiovaskulární činnosti a pozitivní účinky na nervovou soustavu. Nikotin má bohatou historii a patří k látkám, na které vzniká extrémně silná závislost, smrtelná dávka se pohybuje okolo 100 mg pro dospělého, 70 kilového člověka, ale je silně variabilní, neboť organismus si na nikotin vytvoří velmi rychle značnou toleranci.

Tabák je jednoletá rostlina z čeledi *Solanaceae*, dorůstající výšky až 2 m. Má podlouhlé kopinaté listy, žláznaté trichomy a nálevkovité květy s červenou korunou. Tvoří latovitá květenství (Mladá a Procházka 1987).

*Nicotiana benthamiana* je podobně jako huseníček dobrým předmětem pro výzkum. Kromě citlivosti na nejrůznější patogeny, jako jsou viry, plísňe, či viroidy, je to především její dobrá transformovatelnost a vhodnost studia transientní exprese genů po infiltraci suspenze agrobakteria do listů (Goodin *et al.*, 2008). Bezpochybnou výhodou je také vynikající růst *in vitro* podmínkách, nenáročnost na substrát a přizpůsobivá struktura rostlin dovolující snadnou manipulaci. U rostlin tabáku, jak *Nicotiana benthamiana*, tak *Nicotiana tabacum* je dobře zvládnuta technika nepřímé organogeneze, která nám umožňuje získat transformované jedince po aplikaci vektoru na listové disky a iniciaci kalusu (Jones 1995). Tímto způsobem můžeme získat relativně snadno transgenní jedince. V neposlední řadě je výhodou také relativně rychlý reprodukční cyklus, vhodná velikost dospělé rostliny a nenáročnost pěstování.

## 1.7 Bakterie *Agrobacterium tumefaciens*

Bakterie *Agrobacterium tumefaciens* jsou aerobní chemoorganotropické organismy, které se vyznačují schopností předat do buněk cizího organismu část genetické informace, kterou nesou na vlastním plasmidu. Metodami rekombinantní DNA jsme plasmid schopní upravovat a vložit do něj cizorodou informaci. Tato schopnost z těchto bakterií činí účinný

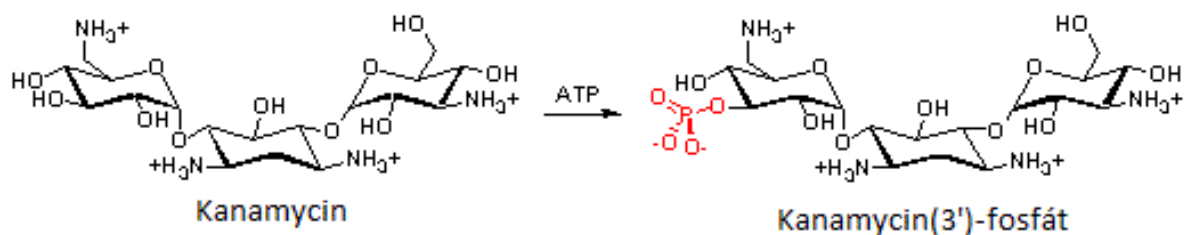


nástroj pro genetické potřeby. Bakterie rostou na jednoduchých médiích, které lze připravit v laboratorních podmínkách většiny pracovišť.

Schopnost předat genetickou informaci je podmíněna existencí bakteriálních Ti plasmidů, na kterých se nachází oblast zvaná T-DNA region, která se začlení do genomové DNA rostlinné buňky. Díky molekulární technologii rekombinantní DNA je původní obsah z oblasti T-DNA vyjmut a nahrazen sekvencí, jejíž přenos do rostliny je žádoucí. Ta se může začlenit do jádra, případně dojde k indukci transientní exprese. Vhodným výběrem pletiva rostliny a dalších faktorů může být docíleno vzniku nechimerických rostlin, které žádanou sekvenci nesou již od semene (Nečásek 1993, Jones 1995).

Pro selekci transformovaných buněk jsou používána antibiotika, nebo pesticidy. V našem případě byly GMO buňky a tedy organismy rozpoznávány díky schopnosti růst na půdě obohacené o antibiotikum kanamycin, kterou zajišťoval transgen pro neomycin fosfotransferázu II (nptII).

Gen *NptII* byl izolován z prokaryotních *Escherichia coli* a v současnosti se hojně používá pro selekci transformovaných organismů (Weigel a Glazebrook 2006). Poskytuje organismu resistenci vůči některým antibiotikům, jako je neomycin, kanamycin či geneticin. Tento gen kóduje aminoglykosid 3'-fosfotransferázu, která antibiotikum deaktivuje fosforylací, čímž razantně sníží jeho toxicitu pro organismus. Obr. 6 znázorňuje fosforylací kanamycinu (Weigel a Glazebrook 2006).



Obr. 6: Fosforylace antibiotika kanamycinu pomocí aminoglykosidu 3'-fosfotransferázy. Převzato a upraveno z <[www.bioscience.org/1999/v4/d/wright/fig2.gif](http://www.bioscience.org/1999/v4/d/wright/fig2.gif)> staženo 12. 6. 2013.

## 1.8 Transientní exprese a posttranskripční umlčování genové exprese

Transientní, neboli dočasná exprese, je jev, při kterém dochází k časově omezené expresi genů, které vložíme do organismu například pomocí bakterie využívajících metod. Jednou z nich je přenos T-DNA na Ti plasmidu *Agrobacterium tumefaciens*. Zde dochází k přenosu informace, která je vložena na transfer-region bakterie, do pletiva, tedy buněk infiltrované rostliny (např. Kapila *et al.*, 1997). Transientní exprese má oproti stabilní expresi několik výhod, a to především značnou sílu transkripce, které transformovaná rostlina dosahuje. Některé zdroje uvádí až tisícinásobné zvýšení exprese (Janssen a Gardner 1989). Další bezpochybnou výhodou je, že nedochází k pozičnímu efektu, tedy působení okolních úseků a struktury chromozomů na vloženou informaci (Sager a Ryan 1968). Nevýhodou je dočasnost exprese, která trvá obvykle pouze v rámci několika dnů, než je obrannými mechanismy hostitelského organismu umlčena (Brodersen a Voinnet 2006).

Rostlina inzerovanou informací bere jako cizí a tudíž škodlivou. V průběhu evoluce byly vyvinuty mechanismy, jak takovou škodlivou informaci eliminovat. V posledních letech se jako klíčový mechanismus pro umlčování těchto informací jeví RNA silencing, který pracuje na principu hybridizace a následné degradace molekul (Fire *et al.*, 1998, Hannon 2002). Tento systém post-transkripčního umlčování genů je zodpovědný i za vyhasínání transientní exprese (Voinnet *et al.*, 2003).

Tento děj, nazývaný posttranskripční umlčování genové exprese (PTGS) je indukován například přítomností a kumulací virových částic. Spočívá v tom, že jsou vytvářeny molekuly RNA o velikosti 20 - 26 bází, jejichž sekvence jsou komplementární k mRNA rozpoznávané k terminaci (Hamilton *et al.*, 1999). Postupně se ukazuje, že malé RNA, rozdělené do dvou kategorií nazývané small-interfering RNA (siRNA) a micro RNA (miRNA) se účastní celé řady regulačních dějů. Kromě obrany svého genomu před cizorodou nukleovou kyselinou je to i regulace vlastních genů (Carthew a Sontheimer 2009).

Proti obraně rostlin byl evolucionálně postupně vyvinut mechanismus, který umožňuje zefektivnit virovou infekci a tedy v našem případě podpořit transkripci exogenní nukleové kyseliny a otevřít tak dveře potenciální výrobě a následné purifikaci proteinu z listů rostlin, které mohou sloužit podobně jako malé továrny na výrobu proteinů. Dobře znám je například protein p19 kódovaný nukleovou kyselinou viru *tomato bushy stunt virus*. Ten při ko-expresi s exogenními geny při transientní expresi potlačuje mechanismus post-transkripčního umlčování genové exprese.



interference. Ve výsledku může být transkripce zesílena více než 50krát, přičemž protein p19 je persistentní až do senescence listu (Voinnet *et al.*, 2002).

## 1.9 Metody detekce přítomnosti transgenů v transformovaných buňkách

Pro účely detekce transgenů v buňkách byly vyvinuty metody, které nám potvrdí jeho přítomnost na mnoha úrovních. Patří mezi ně PCR, kdy testujeme pomocí amplifikace (kvalitativně) přítomnost určitého specifického úseku na DNA, či derivovaná metoda qPCR, kdy jsme schopni pomocí postupného proměření intenzity fluorescence, uvolňující se z barviva reagujícího s dvouvláknovou DNA, mezi jednotlivými amplifikačními kroky stanovit i původní množství amplifikovaného úseku. Dále Southern blot, kdy můžeme přítomnost hledané DNA sekvence odhalit pomocí (radioaktivně) značené sondy, či Northern blot, pomocí kterého můžeme relativně přesně studovat expresi RNA v našem vzorku.

PCR je jedna ze základních metod molekulární biologie. Jedná se o polymerázovou řetězovou reakci, umožňující amplifikovat templátovou DNA. Její uskutečnění bylo podmíněno nalezením termostabilních bakterií obsahující enzymy, které nenedenaturují ani při extrémních teplotách. V základě je využívána pro amplifikaci libovolného úseku DNA, což krok nezbytný pro pozdější manipulaci s DNA, které se nachází v izolovaném kusu tkáně/pletiva v omezeném množství. Provedením PCR můžeme získat mnoho miliard identických molekul. Reakce probíhá v Cycleru, který po vložení vzorků mění teploty podle námi naprogramovaného schématu. Využívá se zde fyzikálně chemických vlastností DNA a enzymu zvaného polymeráza. DNA má charakter dvoušroubovice, tedy dvou vláken, která jsou za běžných (laboratorních) podmínek spojena nekovalentními vazbami a to pomocí vodíkových můstků. Tato vazba je díky působení vysoké teploty (94° C) rozrušena. V následujícím kroku je teplota snížena na 55° C (v tomto kroku teplota závisí na stavbě primerů, neboť vazba CG obsahuje 3 vodíkové můstky, AT pouze 2 – primery s vyšším počtem bazí cytosinu a guaninu vyžadují větší teplotu, ta by se neměla mnoho lišit u dvou používaných primerů) a probíhá annealing primerů. V příštím kroku je teplota změněna na 72° C, což je teplotní optimum pro polymerázu. Zde často měníme trvání tohoto kroku, a to podle velikosti očekávané sekvence. Syntetizuje se druhé vlákno. Denaturace, annealing primerů a syntéza komplementárního řetězce probíhá v kruhu po přibližně třiceti

opakováních. Při jednom opakování je počet molekul zdvojnásoben. Po tomto cyklu zpravidla následuje finální elongace.

## 2 Cíle práce

Cílem této práce bylo zjistit, zda pozměnění exprese tohoto genu je schopné vyvolat změnu fenotypu rostlin podobnou symptomům viroidu PSTVd, a to analýzou jeho overexprese v rostlinách *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana benthamiana* a *Nicotiana tabacum*, dále potvrdit či vyvrátit funkční podobnost *Tf* s transkripčním faktorem *Lof* z *A. thaliana* komplementační analýzou mutanta *lof1*, popř. dvojitého mutanta *lof1/lof2* a provést charakteristiku *in silico* kódujících sekvencí *Tf* a podobného genu z *A. thaliana* lateral organ fusion (*Lof1*, At1G26780).

Cílem komplementační analýzy bylo zjistit, zda podobnost genů je natolik velká, že geny jsou zaměnitelné, tedy zda *Tf* dokáže v *Arabidopsis thaliana* nahradit funkci standardně zajišťovanou podobným genem *Lateral organ fusion*, a tedy adaptovat některé z funkcí *Lof* na *Tf*. Pro účely studia účinků změny exprese toho genu byla využita i transientní exprese pomocí agroinfiltrace *Nicotiana benthamiana*.

## 3 Materiál a metody

### 3.1 Rostlinný materiál

Pro účely této bakalářské práce jsme použili rostliny *Arabidopsis thaliana* ekotypu *Columbia*, dále mutanty *Arabidopsis thaliana lof1* a *lof1/lof2* (dar od prof. Patricie Springer, University of California, Riverside, USA), *Nicotiana benthamiana* a *Nicotiana tabacum* odrůdy *Samsun*.

### 3.2 Kultivace rostlin

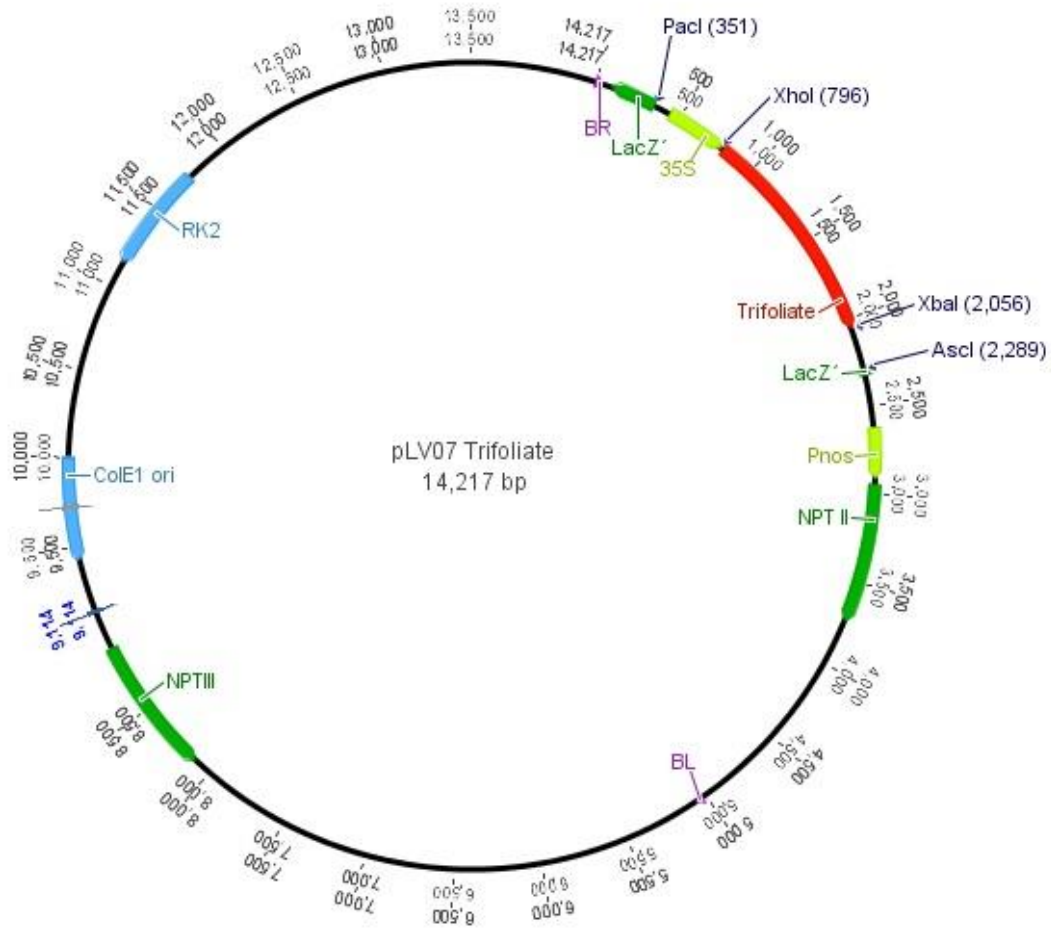
Kultivace rostlin probíhala v několika fázích. Semena vysetá na médium za sterilních podmínek nejprve klíčila v k tomu určených kultivačních komorách. Zde také byly po celou

dobu pokusů udržovány *in vitro* klony rostlin *Nicotiana benthamiana* a *Nicotiana tabacum*. V *in vitro* podmínkách panují specifické podmínky – vysoká vlhkost, ideální, nekolísající teplota (pro *Arabidopsis* nastaveno 22° C, pro *Nicotiana benthamiana* a *Nicotiana tabacum* 25° C) Větší rostliny, ovšem stále před reprodukční fází životního cyklu byly pěstovány v kultivačních přístrojích – fytotronech (Snijders-scientific, Microclima 1000, intenzita osvětlení 150 – 200  $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ ).

Prostřednictvím fytotronů byla rostlinám dána možnost přizpůsobit se na *in vivo* podmínky z *in vitro*. Zde již nepanují sterilní podmínky. Ve fytotronech mají rostliny prostor pro adaptaci na *in vivo* prostředí, byly sem vkládány ve velmi vlhké půdě, na podnosech napuštěných vodou. Fytotrony mají velkou výhodou oproti skleníkům, a to možnost regulace teploty, vlhkosti a délky denní periody. Na závěrečnou fázi životního cyklu jsou rostliny přenášeny do skleníků, kde mají plnohodnotný kontakt s okolním světem, a je tedy napodoben růst v divoké přírodě.

### 3.3 *Agrobacterium tumefaciens*

Pro tuto práci byl pro transformaci květenství *Arabidopsis thaliana*, docílení transienční exprese v listech *Nicotiana benthamiana*, a transformaci disků tabáků *Nicotiana benthamiana* a *Nicotiana tabacum* kultivaru *Samsun* použit kmen LBA 4404 bakterií *Agrobacterium tumefaciens* s binárním vektorem pLV07 obsahující technikami rekombinantní DNA vložené transgeny *Tf*, kódující transkripční faktor z rodiny Myb, a *NptII*, zajišťující resistenci vůči použitému selekčnímu antibiotiku kanamycinu. *Tf* byl přidán za 35S promotor, *NptII* za promotor genu nopalín syntázy. Znázornění sekvence s vyznačenými anotacemi uvádí obrázek 7. Jedná se o klon uložený ve sbírce Oddělení molekulární genetiky na Ústavu molekulární biologie BC AVČR pod číslem 3907.



Obr. 7: Plasmid pLV07 s vyznačenými geny *Tf*, *NptII*. Vyrobeno v Geneious® (Biomatters Ltd., USA).

### 3.4 Transformace *A. thaliana* metodou infiltrace květenství

Metoda infiltrace *Arabidopsis* nám umožňuje získat transgenní, nechimerické jedince, kteří vnášenou sekvenci obsahují již od semene a je tedy přítomná ve všech jeho buňkách (Clough a Bent 1998). Na rozdíl od metod nepřímé organogeneze nevzniká genetická variabilita v rámci jednoho organismu. Jedná se o zjednodušenou metodu infiltrace bakterií, kdy používáme vodní vývěvu a smáčedlo pro zefektivnění transformace. Do připraveného roztoku obsahujícího smáčedlo Silwet L-77 o koncentraci 200 µl na litr média, 5% roztok sacharózy a suspenzi *Agrobacteria* je ponořena rostlina *Arabidopsis* tak, aby ponořena byla celá část obsahující květenství, na kterém probíhá meióza, tedy nadzemní část rostliny. Přítomnost cukru a surfaktantu je pro úspěšnou infiltrace klíčová (Clough a Bent 1998).

Z tohoto důvodu je nutné správně určit dobu vhodnou pro infiltraci, kdy se teprve tvoří semena. V opačném případě, tedy v případě rostliny pokročilejšího stádia vzniká nežádoucí slepý materiál. Výtěžky transformantů jsou velmi variabilní a pohybují se obvykle v rozmezí 0,1 – 1,0 %. Jelikož je pro účely maximálního počtu transformantů je nutné sladit ideální stav, tedy „připravenost“ *Arabidopsis* a bakteriální růst, je možné bakterie skladovat 1 týden při 4°C (Logemann *et al.*, 2006).

V roztoku obsahujícím *Agrobacterium* byla rostlina za sníženého tlaku ponechána 20 minut, po vytažení byla vodorovně položena do vhodné nádoby, obalena potravinovou fólií pro udržení vysoké vlhkosti a nechána jeden den za sníženého osvětlení. Poslední krok byl nezbytný pro navození ideálních podmínek bakteriím a zvyšuje výtěžnost transformantů přibližně dvojnásobně (Clough *et al.*, 1998).

*Agrobacterium tumefaciens* bylo vzato ze sbírky bakteriálních klonů udržované v mrazícím boxu při -80°C. Bakterie jsme inokulovali do 20 ml LK média a po šestnácti hodinách obsah přelili do 1 litru LK média, kde narostl dostatečný počet bakterií postačující pro infiltraci. Bakterie jsme zcentrifugovali při 5000 otáčkách za minutu po dobu 20 minut při 20°C. Bakteriální pelet byl rozpuštěn v 0,5 l infiltračního média.

LK kultivační médium bakterií, složení 500 ml roztoku (Langley, Kado 1972, modifikováno)

5 g sacharózy  
4,0 g kazein – tryptone  
2,0 g kvasničný extrakt  
1,0 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
150 mg MgSO<sub>4</sub>  
pH = 6,8

Infiltrační médium bakterií, složení 500 ml roztoku (Clough 1998, modifikováno)

1,1g MS  
0,25g MES  
25g sacharózy  
100 µl Silwet L-77 (Crompton Corp., USA)  
pH = 5,8

### 3.5 Transformace disků *Nicotiana benthamiana* a *Nicotiana tabacum*

Při transformaci disků *Nicotiana benthamiana* a *Nicotiana tabacum* bylo postupováno podle protokolu podle Jonese (1995).

Z wild type *Nicotiana benthamiana* rostlin pěstovaných *in vitro* bylo vykrojeno 20 disků z přibližně 5 - 6 týdnů starých listů, které byly po dobu 20 minut zkultivovány v připraveném infiltračním médiu se suspenzí bakterií *Agrobacterium tumefaciens*. Práce probíhala za aseptických podmínek ve flow boxu. Bakterie se dostaly řeznými ranami a průduchy do listových disků, a zde v některých případech došlo k transformaci buněk. Nebylo třeba kultivovat bakterie v acetosyringové směsi jako v případě transientní exprese, neboť látky uvolňované z poraněného pletiva sloužily jako dostatečný budící signál, podobně jako při transformacích odehrávajících se přirozeně v přírodě.

Disky jsme posléze umístili za sterilních podmínek do petriho misek s médiem obsahujícím agar, sacharózu a směs minerálů a vitamínů MS (Murashige a Skoog 1962) bez antibiotik i hormonů, kde byly disky ko-kultivovány s bakteriemi. Po dvou dnech byly disky přemístěny do misek s médiem již obsahující antibiotika kanamycin o koncentraci 100mg/l pro selekci transgenních buněk, a tikarcilinu o koncentraci 250 mg/l, pro postupnou eliminaci přežívajících bakterií. Půdy obsahovaly také hormony pro podporu tvorby kalusu.

Pro vyvolání kalusu byly použity hormony BAP a NAA. První dvě pasážování disků jsme uskutečnili na média s koncentrací BAP = 1,0 mg/l, NAA = 0,1 mg/l. Další pasážování proběhla ve stádiu, kdy již byl vytvořen dostatečně velký kalus, skládající se z drtivé většiny transgenními buňkami, proto nebylo již třeba aplikovat BAP, ale pouze NAA o koncentraci 0,1 mg/l. Koncentrace hormonů i antibiotik použitých při postupných pasážováních je přehledně uveden v tabulce I.

Tab. I: Koncentrace hormonů a antibiotik použitých na jednotlivá pasážování.

Pasážování	Km [mg/l]	Ti [mg/l]	BAP [mg/l]	NAA [mg/l]	Účel
1	0	0	0	0	kokultivace s <i>Agrobacteriem</i>
2	100	250	1	0,1	regenerace prýtů
3	100	250	1	0,1	„-“
4	100	250	0,5	0,1	„-“
5	100	250	0	0,1	„-“
6	100	250	0	0,1	„-“
7	100	250	0	0	elongace prýtů a zakořenění
8	100	250	0	0	

Díky nepřímé organogenezi se objevovala malá embrya, která byla skalpelem vyříznuta a přesazena do čerstvých regeneračních médií obsahující MS, sacharózu a agar. Některé z nich byly chimerické, čili neměly ve všech buňkách identickou genetickou informaci. K tomuto jevu dochází v důsledku tvorby rostlinného jedince z většího množství buněk, kdy každá může obsahovat zčásti odlišnou genetickou informaci. Tato skutečnost se v důsledku projevila částí sensitivní vůči použitému antibiotiku. V průběhu růstu rostliny po jednom týdnu docházelo k pasážování na čerstvá média obsahující selekční agens proti netransformovaným buňkám kanamycin, a proto byla drtivá část chimérických rostlin eliminována.

U získávání transgenních jedinců *Nicotiana tabacum* jsme vycházeli z rostlin pěstovaných v nesterilních podmínkách. Postup probíhal analogicky jako v případě *Nicotiana benthamiana*, ovšem kvůli odebrání disků z nesterilních rostlin byl přidán mezikrok povrchové sterilizace. Při kroku povrchové sterilizace byly listy omyty mýdlovou vodou a posléze vystaveny působení 70% ethanolu po dobu 5ti minut. Po tomto kroku byly listy sterilizovány zředěným (9:1) přípravkem SAVO obsahujícím chlornan sodný o koncentraci 0,47% po dobu deseti minut. Listy byly posléze řádně propláchnuty a omyty sterilní destilovanou vodou.

Tekuté ko-kultivační médium

10 mM MgSO<sub>4</sub>

Regenerační médium – 500 ml

1,1g MS

7,5g sacharózy

4g agaru

pH = 5,8

Antibiotika a hormony viz Tab. I.

### **3.6 Výsev semen *Arabidopsis thaliana***

Semena *Arabidopsis thaliana* ekotypu *Columbia* byla před výsevem na médium vysterilizována roztokem chlornanu sodného o koncentraci 0,47% (SAVO 1:9). V 800 µl tohoto roztoku byla semena ponechána 10 minut, průběžně byla vortexována pro zajištění ošetření celého povrchu. Práce s vysterilizovanými semeny probíhala dále za aseptických podmínek v laminárním boxu. Všechna semena byla 3x promyta sterilní destilovanou vodou, posléze v roztoku 0,1% agarózy jednotlivě vysévána pomocí mikropipety na médium. Na rozdíl od semen *Nicotiana benthamiana* a *Nicotiana tabacum* jsou semena *Arabidopsis* dostatečně malá, aby prošla špičkou mikropipety. Médium, na které byl výsev prováděn v našem případě, obsahovalo agar, sacharózu, směs minerálů a vitaminů MS (o poloviční koncentraci) a specifická antibiotika v případě selekce semen již transformovaných rostlin.

### **3.7 Výsev semen *Nicotiana benthamiana* a *Nicotiana tabacum***

Postup ošetření semen z *in vivo* byl analogický s výsevem semen *Arabidopsis*. Semena byla nejprve vysterilizována 10% roztokem Sava, řádně promyta a vysévána na připravená média obsahující agar, sacharidy a směs minerálů s vitamíny MS. Semena tabáku bylo nutné kvůli větší velikosti vysévat pomocí upravených špiček, jimž bylo před započítím práce vhodně rozšířeno ústí. Semena *Nicotiana tabacum* obsahují hodně velké množství, proto plavou, voda při promývání byla tedy odsávána opatrně pomocí malých špiček používaných pro pipetování do 200 µl.



### 3.8 Izolace DNA

DNA byla izolována z transformovaných GMO *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana benthamiana* a *Nicotiana tabacum* následujícím způsobem (převzato a upraveno z Roger a Bendich 1988). 100 mg tkáně bylo odebráno a zhomogenizováno sterilním tloučkem. Následně bylo ke zhomogenizované tkáni přidáno 400  $\mu$ m extrakčního pufru. Směs jsme zvortexovali po dobu 5 sekund. Následovala centrifugace (15000 ot/min), po dobu 3 minut. Posléze jsme 300  $\mu$ l vzniklého supernatantu obsahujícího DNA přepipetovali do nové zkumavky tak, aby nebyl porušen pelet skládající se z odpadních zbytků a nedošlo ke kontaminaci. Přidali jsme 300  $\mu$ l isopropanolu (poměr vůči supernatantu by měl být 1:1). Směs jsme pomalu zamíchali, aby nedošlo rychlým pohybem k fragmentaci DNA. 2 minuty jsme roztok inkubovali při pokojové teplotě. Dalším krokem byla centrifugace (15000 ot/min) po dobu 5 minut. Došlo k peletování DNA. Supernatant jsme odsáli, pelet vysušili. Přidali jsme 100  $\mu$ l TE pufru, pelet rozpustili velmi jemným třepáním.

Extrakční pufř

200mM Tris HCl  
250mM NaCl  
25mM EDTA  
0,5% SDS  
pH = 7,5 - 8

TE pufř

10mM Tris HCl  
1mM EDTA  
pH = 8,0

### 3.9 Amplifikace pomocí PCR

Pro amplifikaci genu npt II a úseku příslušícímu vir oblasti na plasmidu *Agrobacteria tumefaciens* byl použit termocykler nastavený dle schématu uvedeným v tab. II.

Tab. II: Nastavení cyklu pro PCR s annealingovou teplotou 55 stupňů.

Cyklus	Teplota[°C]	Čas [min]	
1	95	2:00	
2c	94	0:30	cykly 2c-4c opakovány 34x
3c	55	0:45	
4c	72	1:20	
5	72	3:00	

Pro amplifikaci genu npt II byly použity specifické primery (Bříza *et al.*, 2008):

NPT1 5'-ACG CAG GTT CTC CGG CCG CTT G-3'

NPT2 5'-GAA GCG GTC AGC CCA TTC GCC G-3'

Amplifikovaný fragment měl velikost 699 bp, neměly vznikat žádné nespecifické produkty.

Pro amplifikaci vir oblasti *Agrobacterium tumefaciens* byly použity specifické primery o následující sekvenci (primery byly poskytnuty doc. J. Břízou z ÚMBR BC AVČR):

virA1: 5'- AAT TCA CCG ACG CGG CAG GAT TTT AAG ACA G -3'

virA2: 5'- AGC TTT GGT ACG AGA GAC TAT TTC GCG TAG -3'

Amplifikovaný fragment měl velikost 1093 bp, neměly vznikat žádné nespecifické produkty.

## 4 Výsledky

### 4.1 *Arabidopsis thaliana*

Po transformaci wild type rostlin *Arabidopsis thaliana* metodou floral dip (Clough a Bent, 1998) jsme získali semena, u kterých jsme předpokládali, že je mezi nimi malý podíl semen obsahující genom *Arabidopsis* obohacený o gen *Tf*, spolu s genem pro resistenci vůči antibiotiku kanamycinu. Geny se do rostlin dostaly díky činnosti *Agrobacteria*, do jehož plasmidu byl technikou rekombinantní DNA vložen konstrukt obsahující námi navrženou sekvenci. Tyto GMO jedince jsme byli schopni identifikovat díky jejich schopnosti růstu na médiu obohaceném o kanamycin. Přírodní, netransformované rostliny tuto schopnost nemají, a tak jde obě skupiny dobře rozlišit. Proto byla semena vyseta na půdu obohacenou o

selekční marker – antibiotikum kanamycin (50 mg.l<sup>-1</sup>). Transformovány byly kromě wild type i mutanti *lof1* a *lof1/lof2* pro účely komplementační analýzy.

#### 4.2 Genetická analýza štěpných poměrů *Arabidopsis thaliana*

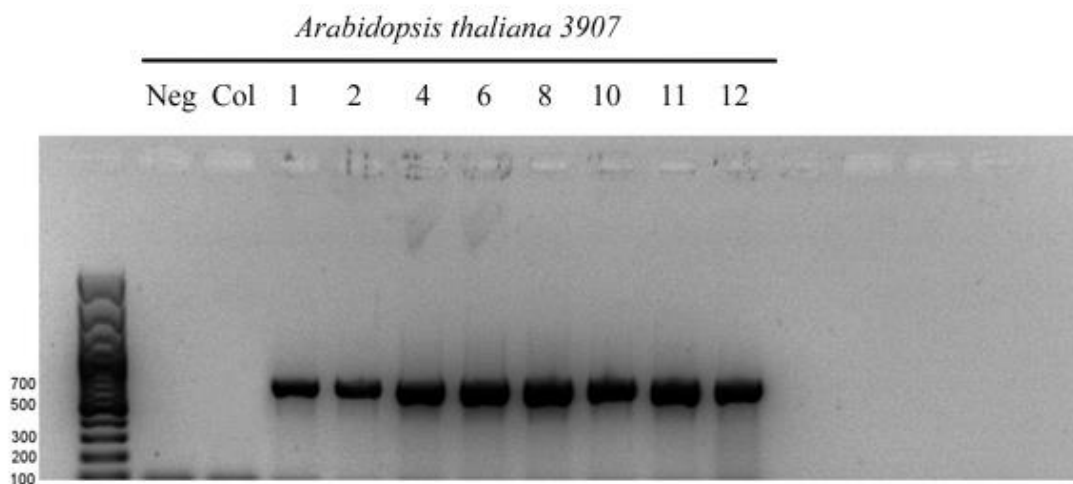
Po transformaci rostlin a sklizení jejich semen jsme provedli plošné výsevy. Transformace *Arabidopsis thaliana* proběhla u 19 rostlin. Ukázalo se, že z tohoto počtu u 12 jedinců úspěšně, tedy u 12 rostlin byly získány resistentní potomci. Počet kanamycin resistentních (neinhibovaných, GMO) a sensitivních (inhibovaných, wt) rostlin uvádí tabulka III. Byl spočítán chi kvadrát testující štěpný poměr potomstva pro každého jedince, tři rostliny byly vybrány jako nejvíce odpovídající štěpnému poměru 3:1. Tab. III uvádí tyto štěpné poměry i chi kvadrát transgenních rostlin *Arabidopsis thaliana* obsahujících gen *Tf*. Červeně vyznačené rostliny nejlépe odpovídají tomuto poměru. Jsou to rostliny č. 4 (p=0,394), č. 8 (p=0,186), č. 11 (p=0,081).

Tab. III: Štěpné poměry T2 generace *Arabidopsis thaliana* se spočítaným chi kvadrátem a s červeně vyznačenými rostlinami, které nejlépe odpovídají poměru 3:1.

Rostlina č.	Km <sup>R</sup>	Km <sup>S</sup>	$\chi^2$
1	564	145	7,82
2	41	222	495,09
3	520	0	173,33
4	62	18	0,27
5	113	26	2,94
6	170	0	56,67
7	96	5	21,65
8	73	23	0,06
9	36	3	6,23
10	107	7	21,63
11	98	32	0,01
12	42	18	0,80

### 4.3 Přítomnost transgenů v rostlinách *Arabidopsis thaliana*

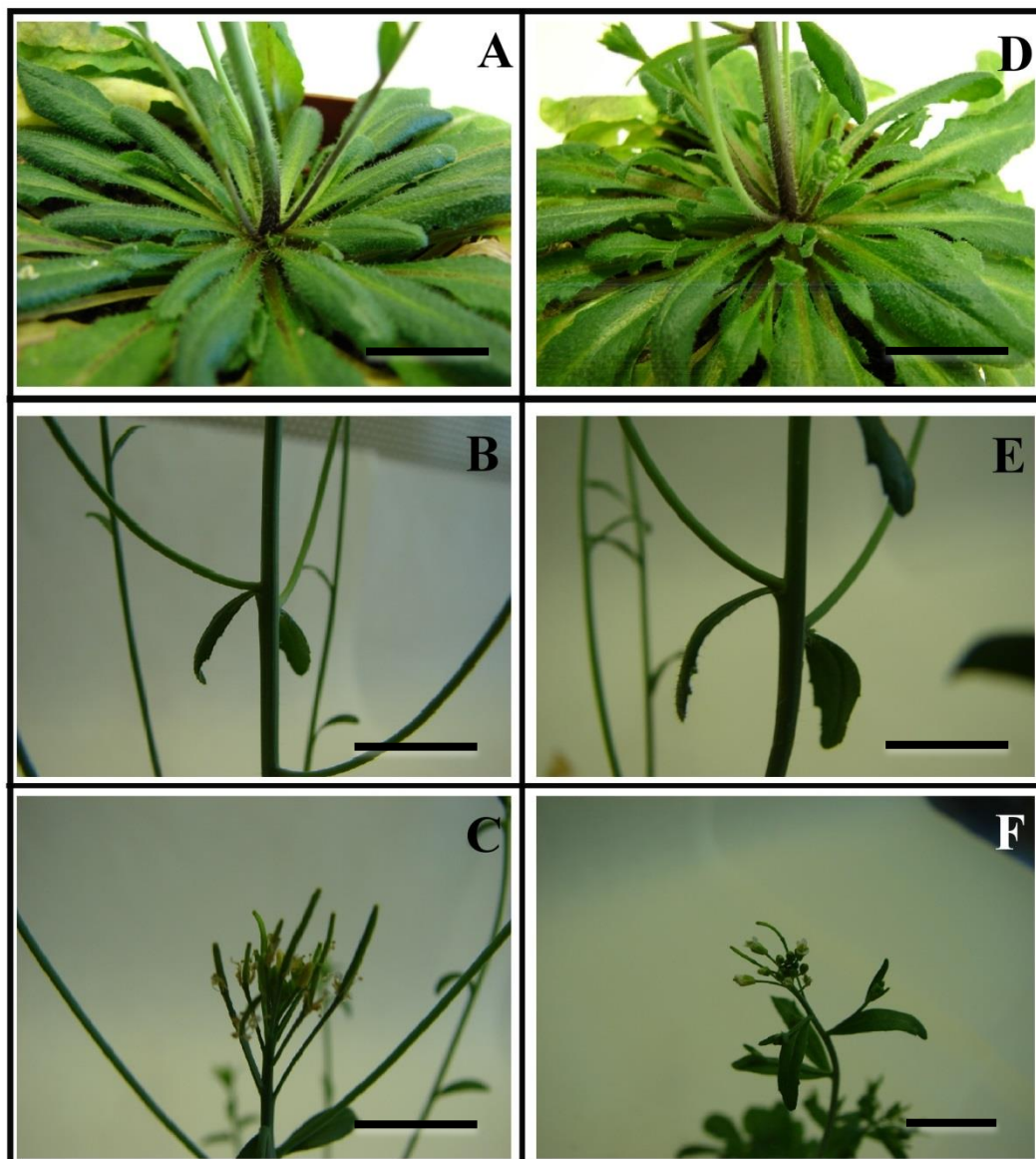
Samotný růst rostliny na médiu obsahujícím kanamycin není dostatečným důkazem, že byl do rostliny vložen náš konstrukt, proto byl proveden PCR test na přítomnost genu *nptII*. Výsledek tohoto testu zobrazuje obrázek 8. Při pokusu nevznikly žádné nespecifické produkty a byla dokázána přítomnost sekvence *NptII* v rostlinách.



Obr. 8: PCR test na přítomnost genu *NptII* v rostlinách *Arabidopsis thaliana*. Neg – vzorek bez templátové DNA; Col – DNA wt rostliny ekotypu Columbia; 1-12 rostliy rezistentní ke kanamycinu, T2 generace.

### 4.4 Fenotyp transformovaných rostlin

Změny fenotypu v těchto rostlinách nebyly pozorovány, potvrdil se nám tedy fakt, že *Arabidopsis thaliana* není pro naše účely ideálním studijním organismem. Detail růstu těchto rostlin zobrazuje obrázek 9.



Obr. 9: A, B, C zobrazuje wt *A. thaliana*, D, E, F 35S:*Tf* *A. thaliana*. Jedná se o srovnání standardní přizemní růžice (A), stonku (B) a květenství (C) s růžicí (D), stonkem (E) a květenstvím (F) transgenního jedince (č. 15) obsahující transgen *Tf*. Měřítko 2 cm.

#### 4.5 Komplementační analýza transgenních mutantů *lof1*

Mutanti *Arabidopsis thaliana lof1* se vyznačují atypickými srůsty buněk. Tito jedinci byli transformováni vektorem *Agrobacterium tumefaciens* obsahující vloženou kazetu s geny *Tf* a *NptII*. Metodou infiltrace květenství bylo získáno 12 transformantů, ovšem ani u jednoho fenotyp nenabyl charakteristik wild type rostlin. Srovnání oblastí odstupujících větví ze

stonku, tedy místem, v němž dochází k viditelnému srůstu okrajů orgánů wild type, je na obrázku 10.



Obr. 10: Porovnání abnormálního srůstu mutantu *lofl* (A), transformovaného mutantu *lofl*(C) a wild type (B) rostliny. Měřítko 2 cm.

#### 4.6 Genetická analýza štěpných poměrů *Nicotiana benthamiana*

Po získání 14ti transgenních rostlin *Nicotiana benthamiana* metodou transformace listových disků jsme sklídili a vyseli semena pro odhadnutí počtu insertů v genomech jednotlivých mateřských rostlin. Počet kanamycin resistantních (neinhibovaných, GMO) a sensitivních (inhibovaných, wt) rostlin uvádí tabulka IV. Byl spočítán chi kvadrát, testující štěpný poměr potomstva 3:1, pro každého jedince, tři rostliny byly vybrány jako nejvíce odpovídající tomuto štěpnému poměru. Tabulka IV uvádí tyto štěpné poměry a chi kvadrát transgenních rostlin *Nicotiana benthamiana* obsahujících gen *Tf*. Vyznačené rostliny nejlépe odpovídají tomuto poměru. Jsou to rostliny č. 1 ( $p=0,242$ ), č. 6 ( $p=0,292$ ), č. 13 ( $p=0,524$ ). Rostlina 14 ač byla transgenní, neposkytla resistantní potomstvo. Rostliny označené čísly 4 a 5 byly transgenem ovlivněny nejvíce a vykazovaly nejvážnější narušení vývoje, byly zakrslé, s pozměněnou morfologií listů, sterilní. Okraje koruny a kalichu vykazovaly srůsty postranních oblastí, samy květy nedosahovaly ani desetiny velikosti květů kontrolních rostlin.

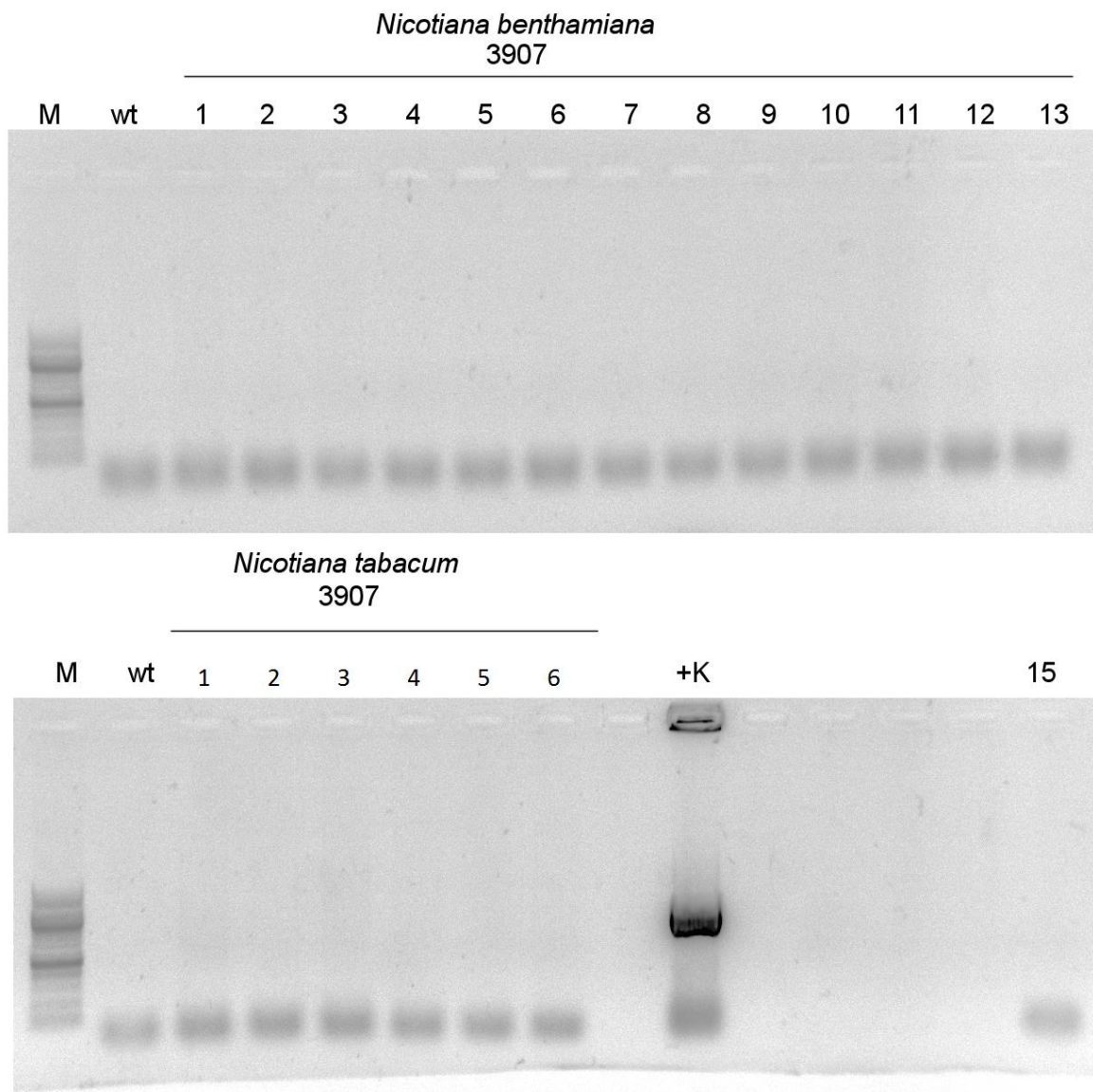
Tab. IV: Štěpné poměry T2 generace *Nicotiana benthamiana* se spočítaným chi kvadrátem a s červeně vyznačenými rostlinami, které nejlépe odpovídají poměru 3:1.

Rostlina č.	Km <sup>R</sup>	Km <sup>S</sup>	$\chi^2$
1	93	33	0,09
2	212	113	16,54
3	133	59	3,36
4*	0	0	-
5*	0	0	-
6	218	69	0,14
7	217	58	2,24
8	97	25	1,32
9	102	39	0,53
10	194	82	3,27
11	183	79	3,71
12	75	32	1,37
13	80	31	0,51
14	0	143	429,00

\* Pozn. rostliny č. 4 a 5 byly zcela sterilní, nebylo tedy možné analyzovat jejich potomstvo

#### 4.7 Přítomnost transgenů v rostlinách *Nicotiana benthamiana*

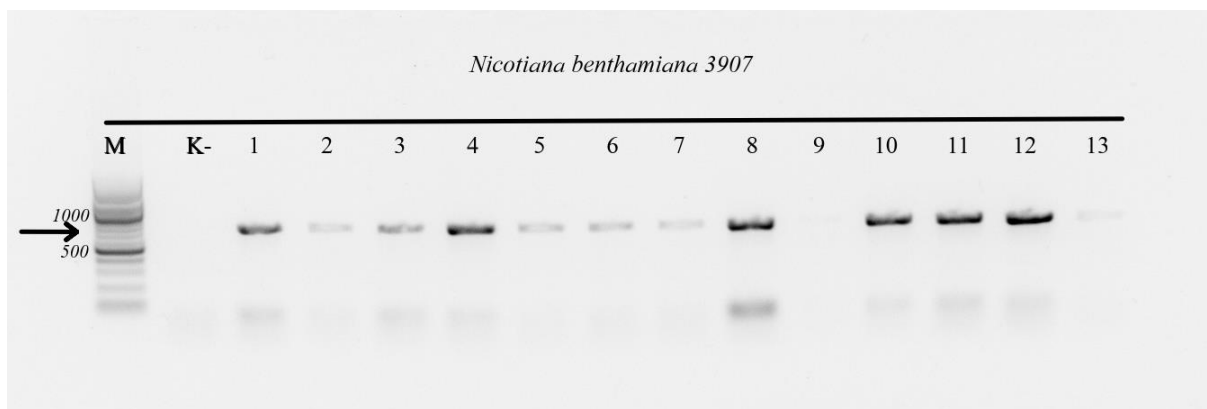
Test na nepřítomnost bakterií *Agrobacterium tumefaciens* zobrazuje obr. 11. Jako pozitivní kontrola byly použity buňky kmene GV3101 *Agrobacterium tumefaciens*.



Obr. 11: PCR test na nepřítomnost buněk *Agrobacterium tumefaciens* v rostlinách *Nicotiana benthamiana* a *Nicotiana tabacum*. wt- DNA z netransformované rostliny; 1-13 (*N. benthamiana*), resp. 1-6 (*N. tabacum*) rostliny regenerované na médiu s antibiotikem kanamycinem 100mg.l<sup>-1</sup>; +K DNA z bakterií *A. tumefaciens* obsahující plasmid pLV-07 35S:Tf, č. sbírky 3907

Stejně jako v případě *Arabidopsis* byl po získání transformantů proveden PCR test na přítomnost genu *NptII*. Výsledek PCR zobrazuje obrázek č. 12. Nevznikaly žádné nespecifické produkty.

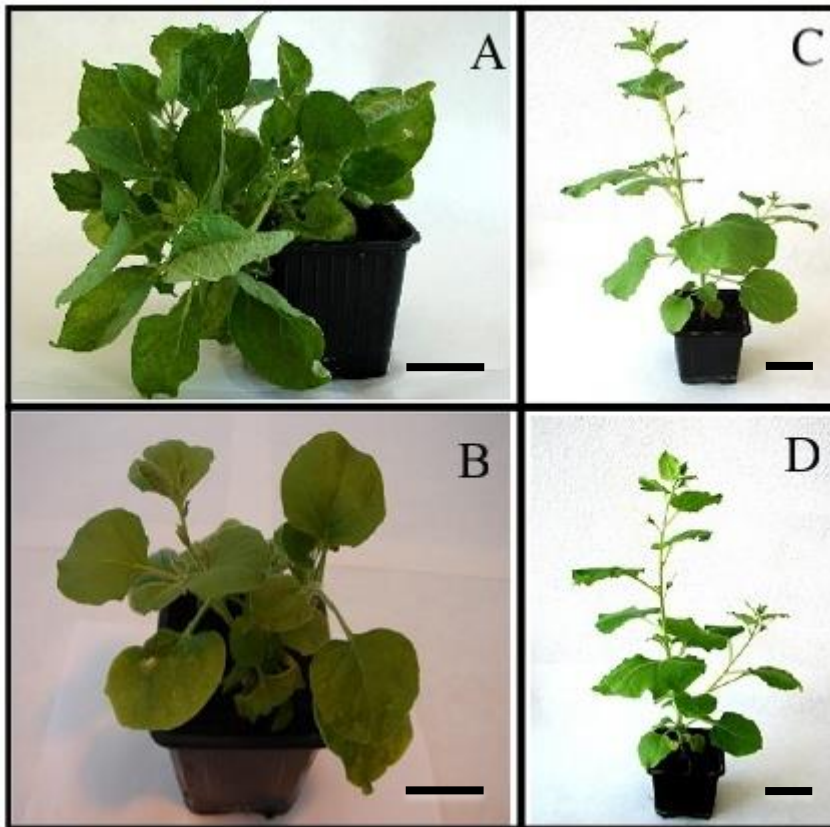




Obr. 12: PCR test na přítomnost genu *NptII* v rostlinách *Nicotiana benthamiana*. K- negativní kontrola (DNA z netransformované rostliny); 1-13 rostliny regenerované na médiu s antibiotikem kanamycinem  $100\text{mg.l}^{-1}$ ,  $T_0$  generace.

#### 4.8 Fenotyp transformovaných rostlin

U rostlin *Nicotiana benthamiana* odpovídající štěpnému poměru 3:1 byla pozorována zakrslost, pozměněný povrch listů, hrubý, kadeřavý, a kratší, ztlustělý stonek. Obrázek č. 13 srovnává zakrslost a opožděný vývoj transgenní rostliny č. 6 s wild type jedincem. Na náhodných místech rostliny, zahrnující některé listy a květenství se objevovaly nekrózy, viz Obr. 14. Oproti tomu u rostliny s číslem 13, taktéž vykazující štěpný poměr 3:1, nebyly pozorovány odlišnosti oproti wild type, viz Obr. 15. Obrázek 16 znázorňuje detaily kalichu a koruny transformanta 35S:*Tf* a srovnání s wt. Kromě výrazné zakrslosti těchto orgánů byly pozorovány srůsty na okrajích kalichu a koruny, počet blizen i tyčinek s prašníky zůstal zachován.



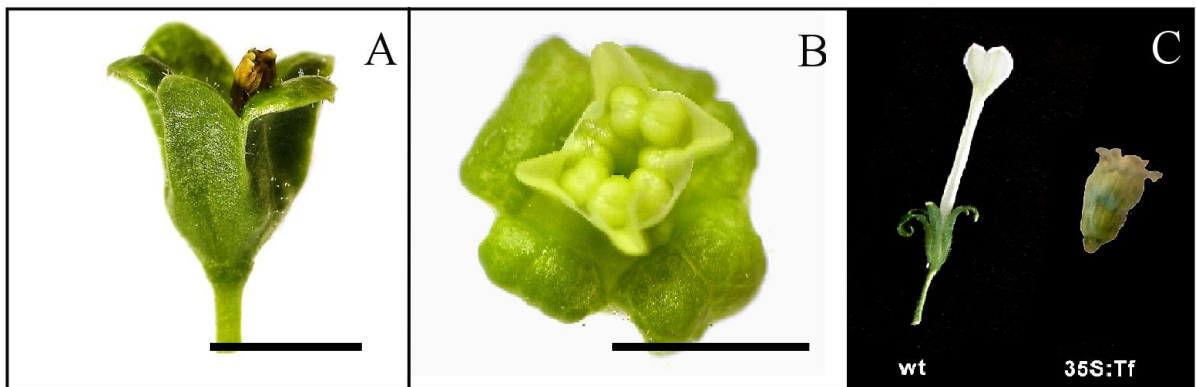
Obr. 13: Porovnání zakrslé transformované (č. 6) *Nicotiana benthamiana* (A, B) s wild type rostlinou (C, D). Měřítka 5 cm.



Obr. 14: Listy transformovaných *Nicotiana benthamiana* s vyvíjejícími se nekrotizacemi.



Obr. 15: Srovnání wild type (A) *Nicotiana benthamiana* s transformovanou rostlinou č. 13 (B). Měřítka 5 cm.



Obr. 16: Detail kalichu transformované *Nicotiana benthamiana* 35S:Tf (A), pohled do vnitřních prostor koruny 35S:Tf *N. benthamiana* s pěti tyčinkami a jednou bliznou (B), srovnání wt květu s květem transformanta (C). Měřítka 0,25 cm.

#### 4.9 Genetická analýza štěpných poměrů *Nicotiana tabacum*

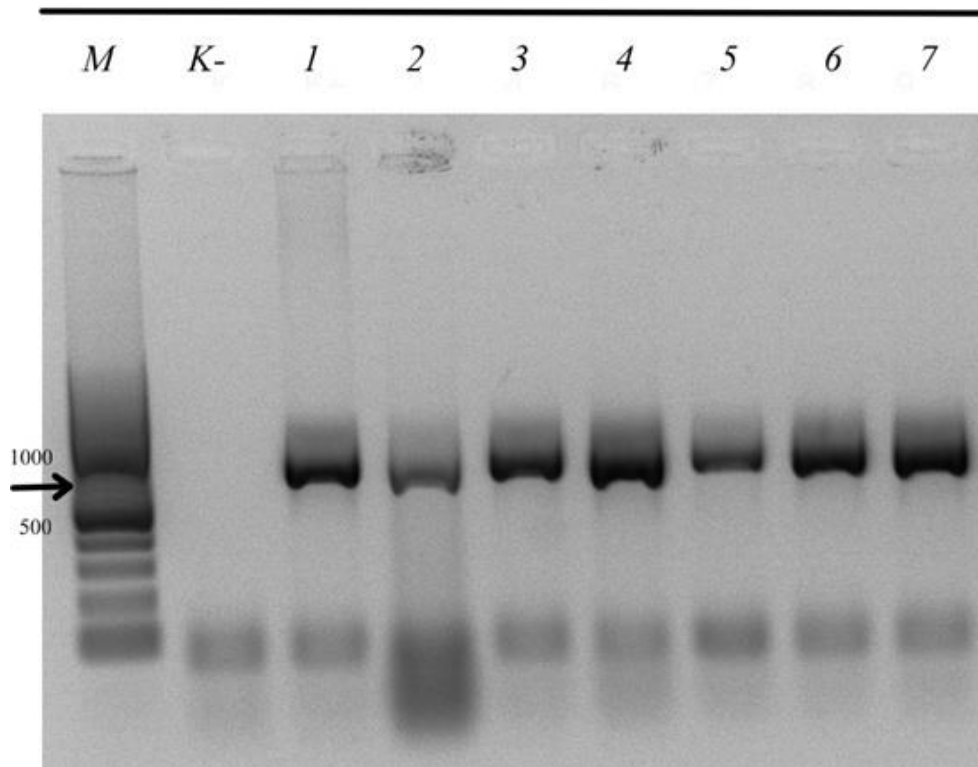
Po získání 10ti transgenních rostlin *Nicotiana tabacum* metodami tkáňových kultur jsme sklídili a vyseli semena pro odhadnutí počtu insertů v genomech jednotlivých mateřských rostlin. Počet kanamycin resistantních (neinhibovaných, GMO) a sensitivních (inhibovaných, wt) rostlin uvádí tabulka V. Byl proveden chí kvadrát test, testující štěpný poměr potomstva 3:1, pro každého jedince, tři rostliny byly vybrány jako nejvíce odpovídající tomuto štěpnému poměru. Tab. V uvádí tyto štěpné poměry a chí kvadrát transgenních rostlin *Nicotiana tabacum* obsahujících gen *Tf*. Vyznačené rostliny nejlépe odpovídají tomuto poměru. Jsou to rostliny č. 1 ( $p=0,280$ ), č. 6 ( $p=0,549$ ), č. 9 ( $p=0,302$ ).

Tab. V: Štěpné poměry T2 generace *Nicotiana tabacum* s provedeným chí kvadrát testem a s červeně vyznačenými rostlinami, které nejlépe odpovídají poměru 3:1.

Rostlina č.	Km <sup>R</sup>	Km <sup>S</sup>	$\chi^2$
1	97	30	0,13
2	219	86	1,67
3	106	14	11,38
4	105	50	4,36
5	164	20	19,59
6	189	70	0,57
7	230	65	1,38
8	181	14	33,03
9	132	47	0,15
10	101	12	12,46

#### 4.10 Přítomnost transgenu v rostlinách *Nicotiana tabacum*

Nepřítomnost bakterie *Agrobacterium tumefaciens* v GMO *Nicotiana tabacum* použitou pro transformaci zobrazuje obr. 11. Stejně jako v případě *Arabidopsis* a *Nicotiana benthamiana* byl po získání transformantů proveden PCR test na přítomnost genu *NptII*. Výsledek PCR zobrazuje obrázek č. 17. Amplifikovaný fragment měl velikost 699 bp a nevznikaly žádné nespecifické produkty.

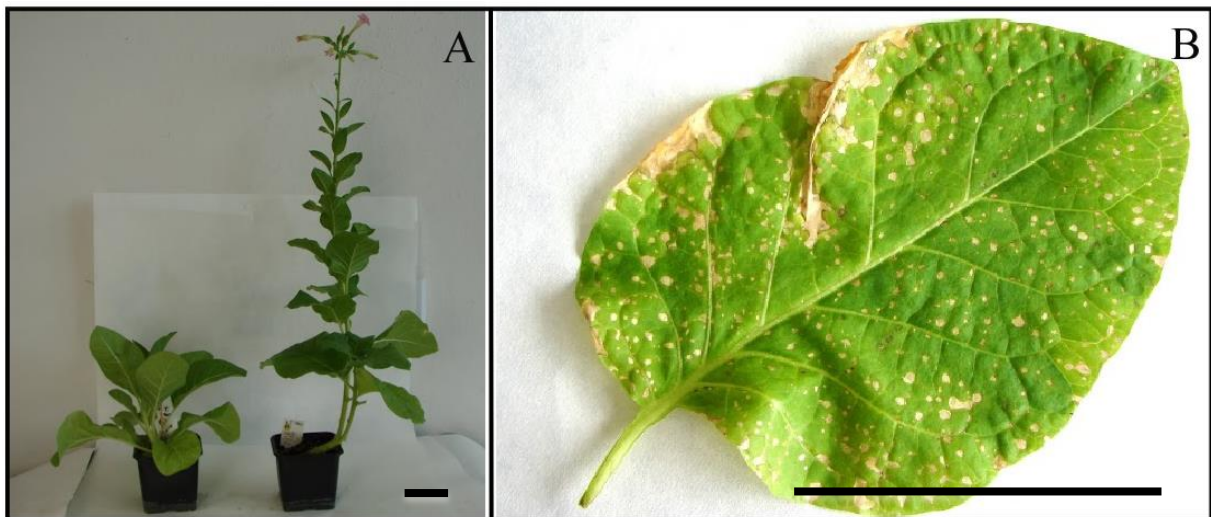


Obr. 17: PCR test na přítomnost genu *NptII* v rostlinách *Nicotiana tabacum*. K- jako templát použita DNA netransformované rostliny *N. tabacum*; 1-7 rostliny regenerované na médiu obsahujícím 100mg.l<sup>-1</sup> kanamycinu

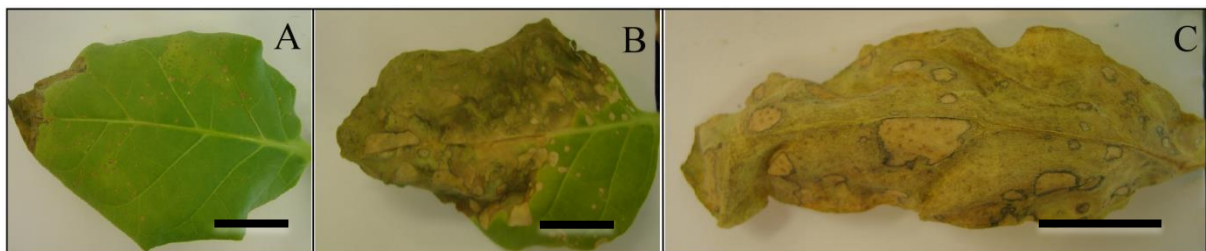
#### 4.11 Fenotyp transformovaných rostlin

U transformovaných rostlin *Nicotiana tabacum* byly pozorovány podobně jako v případě *Nicotiana benthamiana* nekrózy a zakrslý vzrůst. Nebyly pozorovány atypické srůsty buněk. Na obrázku č. 18 je patrný rozdíl mezi wild type tabákem a transformovanou rostlinou, vykazující trpasličí vzrůst, spolu s detailem listu této rostliny. Na obr. 19 nekrózy vznikající na stárnoucích listech a jejich postupná devastace listu.





Obr. 18: Srovnání transformanta *Nicotiana tabacum* č. 6 s wild type tabákem (A) a detail listu této rostliny (B). Měřítko 5 cm.



Obr. 19: Nekrózy vznikající na listech transformovaných *Nicotiana benthamiana*, s postupnou časovou progresí – foceno s odstupem 2 týdnů postupně ve sledu A, B, C. Měřítko 2 cm.

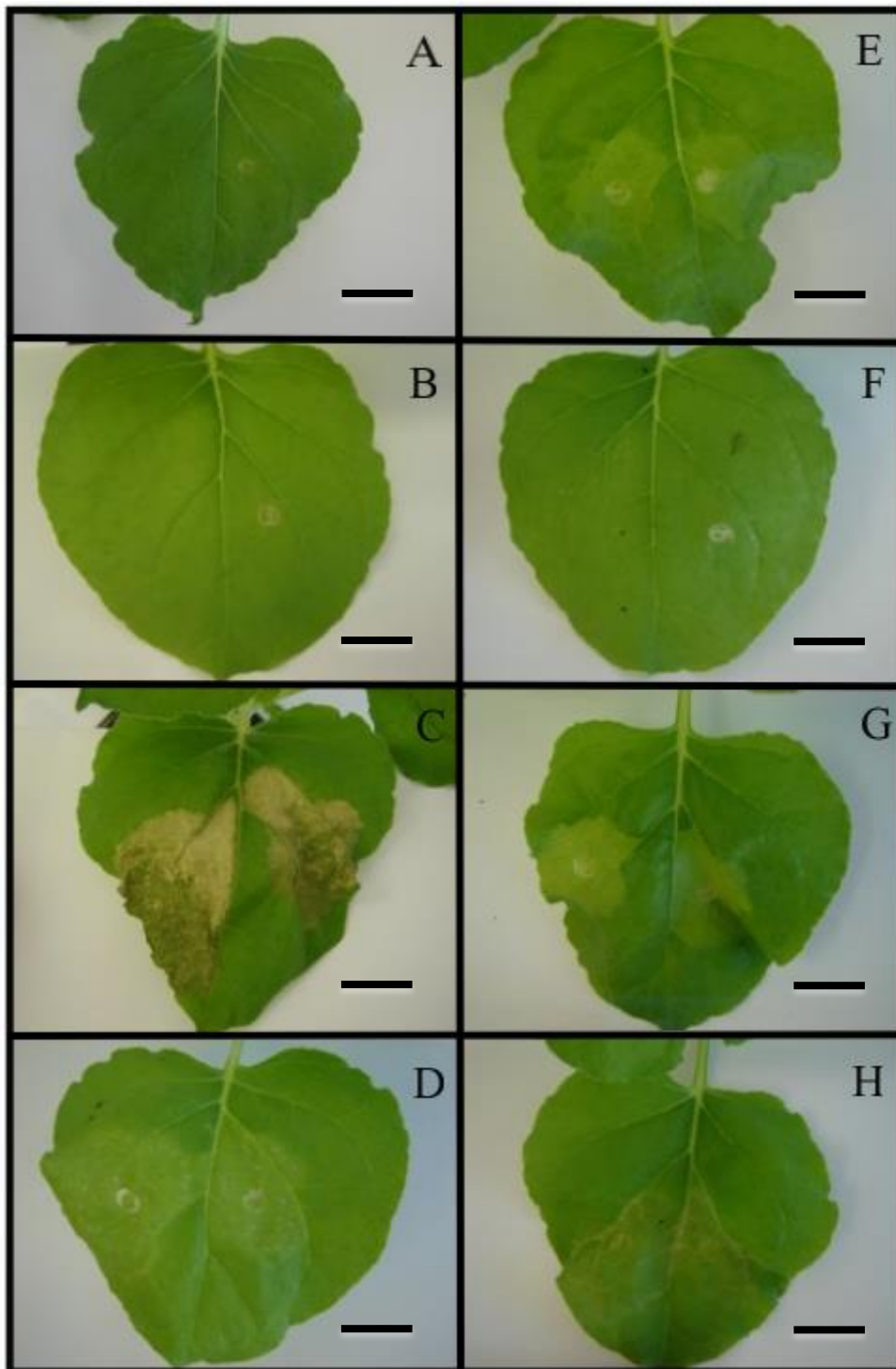
#### 4.12 Transientní exprese

Pro docílení transientní exprese byly použity listy *in vivo* wild type rostlin *Nicotiana benthamiana* před reprodukční fází života. Infiltrace probíhala ráno po 14ti hodinové inkubaci bakterií v acetosyringonovém roztoku (10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MES, 150 μM acetosyringon, pH 5.6). Využili jsme na ni bakterie, jejichž specifikaci uvádí tabulka VI. Jednalo se o kombinace rozdílných kmenů, které obsahovaly rozdílné sekvence v T-DNA regionu. *Agrobacterium tumefaciens* kmenu LBA 4404 obsahující *Tf*, které bylo použito pro docílení stabilní exprese ve všech pokusech cílící na stabilní expresi je označena číslem 3.

Konstrukt *HIWDR1* je gen z rostliny chmele *Humulus lupulus* kódující transkripční faktor z rodiny WD40, protein, který má schopnost vázat na sebe další proteiny a tento celek dále funguje jako transkripční faktor. *s-HIMYB3* a *HIMYB7* jsou taktéž chmelové geny, příslušící podobně jako *Tf* do rodiny Myb. Použito bylo 8 kombinací, z důvodu nutné kontroly a potvrzení, zda jakékoliv vyvolané změny v listu jsou způsobené vnášenými geny. Bakterie čísla 1 neobsahovaly Ti plasmid, po jejich infiltraci tedy nebyla očekávána žádná reakce, podobně v případě bakterií č. 2. Bylo nutné prokázat, že případné změny v listech nezpůsobující samy bakterie svým metabolismem, případně vnesení jakéhokoliv genu nezávisle na jeho produktu. Kombinace č. 3 a 4, kmeny LBA 4404 a GV 3101 obsahovaly gen *Tf*, a způsobily téměř totožné symptomy, pouze v případě kmenu GV 3101 časově opožděnější. To bylo způsobeno rozdíly mezi jednotlivými kmeny. Kombinace č. 7 a 8 pro obsahovaly geny z rodiny Myb, již z dřívějších pokusů bylo známo, že *s-HIMYB3* způsobuje po infiltraci tvorbu nažloutlých skvrn a odumírání konců listů, *HIMYB7* podobně malé bílé lokální nekrózy souběžně s žilnatinou. Na základě získaných výsledků se dá říci, že nekrózy, které se objevily po inokulaci konstruktem s genem *Tf* byly způsobeny právě přítomností tohoto transgenu. Obrázek 20 zobrazuje listy wild type *Nicotiana benthamiana* 3 dny po inokulaci bakteriemi *Agrobacterium tumefaciens* v kombinaci 1 (A), 2 (B), 3 (C), 4 (D), 5 (E), 6 (F), 7 (G), 8 (H). Obrázky 21, 22, 23 posléze vývin příznaků po 3 (A), 5 (B) a 6 (C) dnech od inokulace.

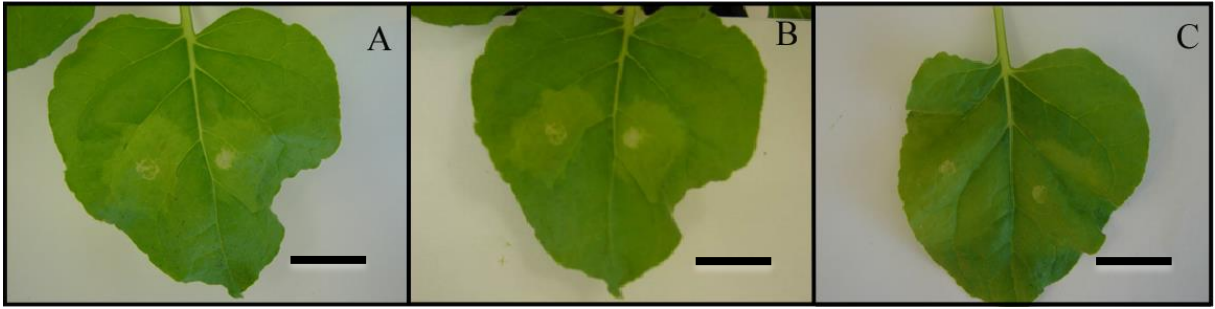
Tab. VI: Specifikace bakterií (kmen, konstrukt a resistance proti antibiotiku) *Agrobacterium tumefaciens* použitých pro docílení transientní exprese v listech *Nicotiana benthamiana*.

	kmen	konstrukt	č. sbírky	resistance
1	LBA 4404	-	106	-
2	GV 3101	35S: <i>HIWDR1</i>	3233	Km
3	LBA 4404	35S: <i>Tf</i>	3907	Km
4	GV 3101	35S: <i>Tf</i>	4118	Km
5	LBA 4404	35S: <i>Lof1</i>	4121	Sm
6	GV 3101	35S: <i>Lof1</i>	4119	Sm
7	EHA 101	35S: <i>s-HIMYB3</i>	1773	Km
8	LBA 4404	35S: <i>HIMYB7</i>	2816	Km

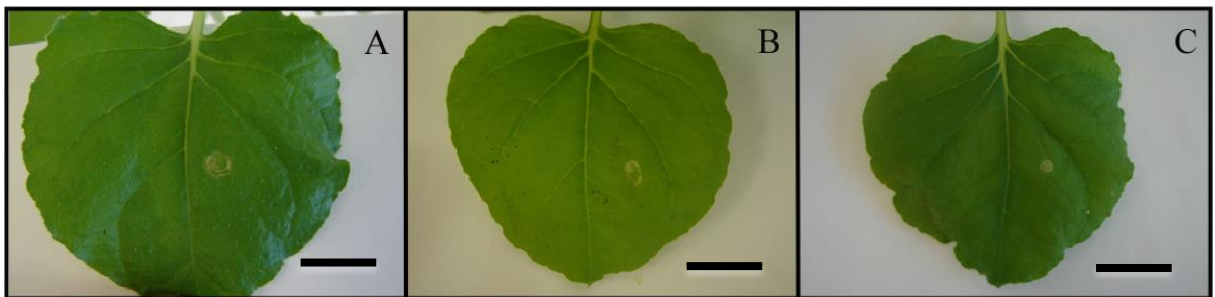


Obr. 20: Listy wild type *Nicotiana benthamiana* 3 dny po infiltraci bakteriemi *Agrobacterium tumefaciens* v kombinaci (dle Tab. VI) 1 (A), 2 (B), 3 (C), 4 (D), 5 (E), 6 (F), 7 (G), 8 (H). Měřítko 2 cm.





Obr. 21: Časový průběh vývoje listu po inokulaci *Agrobacterium tumefaciens* kmene LBA 4404 s prázdným transfer regionem. 3 dny po inokulaci (A), 5 dní (B) a 6 dní (C). Měřítko 2 cm.



Obr. 22: Časový průběh vývoje listu po inokulaci *Agrobacterium tumefaciens* kmene LBA 4404 s genem *Lof1* v T-DNA oblasti. 3 dny po inokulaci (A), 5 dní (B) a 6 dní (C).



Obr. 23: Časový průběh vývoje listu po inokulaci *Agrobacterium tumefaciens* kmene LBA 4404 s genem *Tf* v T-DNA oblasti. 3 dny po inokulaci (A), 5 dní (B) a 6 dní (C).

## 5 Diskuze

### 5.1 Testování přítomnosti transgenu

Pokud je rostlina schopná tolerovat přítomnost antibiotika a vyrůst na médiu jím obohaceném, pak obsahuje gen kódující protein zprostředkovávající resistenci vůči tomuto antibiotiku. Tento fakt ale nevypovídá o počtu vložení konstruktů. Pro tyto důvody byly vyhodnocovány štěpné poměry následující (T2) generace. V této fázi také nevíme, zda se zkopíroval konstrukt celý (tedy od levé hranice k pravé), nebo pouze jeho část. (Při přenosu informace je pravidlem, že pokud v některých případech chybí část konstruktů, je to ta blíže k levé hranici (Jen a Chilton 1986). V našem případě je u levé hranice *NptIII*, takže tento případ u rostlin, v nichž je detekován gen *NptIII* nehrozí.) Proto je nutné udělat další analýzu. Počet kopií jsme schopni odhadnout ze štěpného poměru následující generace, přítomnost transgenů molekulární metodou PCR, která spočívá v amplifikaci úseku pomocí primerů, které se specificky naváží na část sekvence. Pro účely studia funkční analýzy genu je vhodné, aby organismus obsahoval pouze jednu jeho kopii, neboť více kopií může zapříčinit umlčení genu díky komplementaritě vznikajících RNA (Hannon 2002). Míru exprese je posléze možné určit pomocí analýzy qPCR (Heid *et al.*, 1996).

U rostlin tabáku bylo nejprve nutné provést navíc test na nepřítomnost bakterií, které mohly přežít na původních transformovaných discích z wt rostlin. Tento test nebyl u *Arabidopsis* proveden, protože odebírané pletivo patřilo rostlinám příslušících k dceřiné generaci transformovaných jedinců, což poskytuje dostatečnou záruku nepřítomnosti bakterií. Jelikož se při izolaci DNA pracuje s veškerou informací přítomnou v homogenizovaném vzorku, není nijak rozlišeno mezi bakteriálními a rostlinnými buňkami. Pokud by bez testu nepřítomnosti *Agrobacteria* byla potvrzena přítomnost genu *NptIII*, nemohli bychom říci, zda pochází z rostliny tabáku, nebo tohoto prokaryota.

### 5.2 Možné příčiny projevovaných symptomů

Podle očekávání nevyvolala přítomnost transgenu *Tf* v modelové rostlině *Arabidopsis thaliana* žádné změny fenotypu, jelikož není vhodným subjektem ke studiu potenciálních targetů viroidu PSTVd. Je to dáno vysokou repetitivností genomu, kdy vypnutí genu, případně jeho overexprese často nezpůsobí žádné změny. Proto byly jakožto další objekty

výzkumu zvoleny rostliny tabáku druhů *Nicotiana benthamiana* a *Nicotiana tabacum*. *Nicotiana benthamiana* je vhodným objektem ke studiu, díky své sensitivitě k patogenům, možnosti docílit transientní exprese agroinfiltrací a možností transformace a získávání transformantů pomocí nepřímé organogeneze technikou mikropropagace (Jones 1995).

Symptomy nabyté po přenosu genu *Tf* se lišily jak u skupin rostlin příslušící druhu *Nicotiana benthamiana* a *Nicotiana tabacum*, tak v rámci těchto druhů, avšak vykazovaly určité společné znaky, což implikuje společný původ, právě díky společnému faktoru, transgenu *Tf*. Tato myšlenka byla potvrzena po docílení transientní exprese. Odlišnosti u různých druhů jsou způsobeny mírně diversifikovanými genomy a odlišným metabolismem, v rámci druhu jsou to potom různé počty insertů a pozice na chromozómech (Sager a Ryan 1968), do kterých byla T-DNA vložena. *Tf* je transkripční faktor, a tedy v rostlinách jiného druhu může mít odlišnou afinitu k promotorům, na které nasedá. Přesná místa interakce tohoto proteinu s DNA v rostlinách *Solanum lycopersicum* nejsou známa.

Po transformaci organismu nemusí být změna přírodního fenotypu způsobena bezpodmínečně vnášeným genem. Jelikož je proces vložení informace víceméně náhodným dějem, může dojít k insertu a porušení důležité ať už kódující, či regulační sekvence, v důsledku čehož může být změněn fenotyp bez ohledu na vnášenou sekvenci. Uplatnit se zde může i tzv. position efekt, kdy na expresi genu má vliv struktura chromozomu v jeho bezprostřední blízkosti. Kromě „posuvu“ na DNA, čili pozměněním ohybů a tedy možným zneprístupnění některých míst buněčné mašinerii může být ovlivněn sám transgen, a je nutno tedy rozlišovat mezi „funkční“ a „nefunkční“ vloženou sekvencí, což může být také důsledek pozičního efektu (Matzke a Matzke 1998).

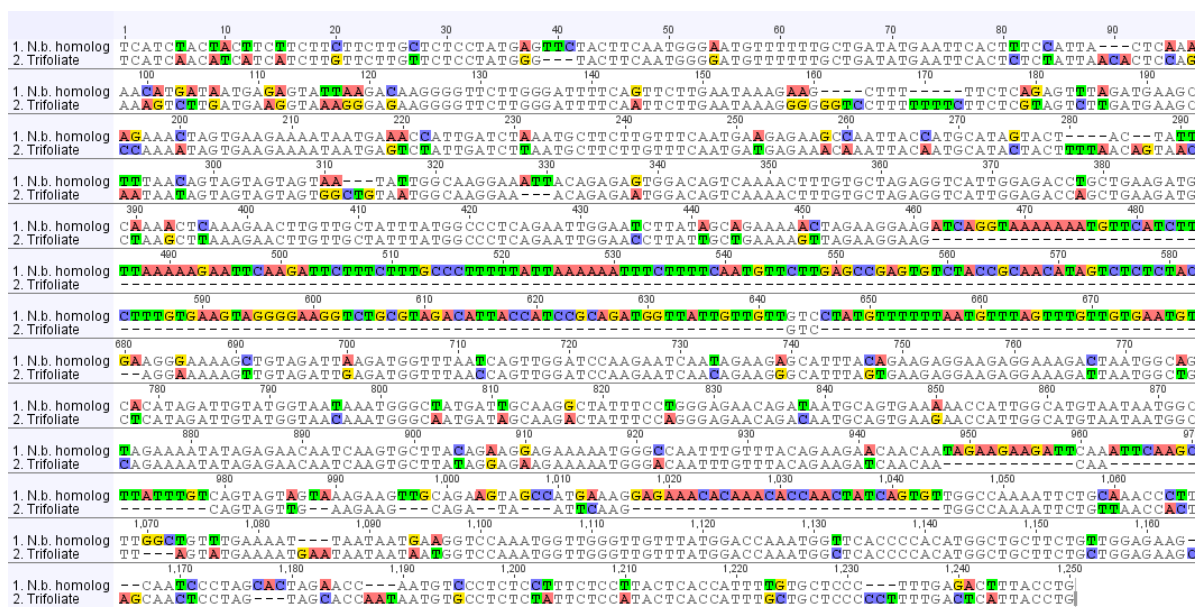
Molekulární metodou PCR jsme byli schopni ve vyizolované celkové DNA zjistit přítomnost vložené sekvence, ovšem o její aktivitě jsme informaci nezískali. Pro tento účel by bylo vhodné použít Northern blot, popřípadě vyizolovat RNA, přepsat tyto molekuly reverzní transkripcí do cDNA, pomocí qPCR stanovit míru exprese genu a získat tak další informace o roli genu *Tf* ve vývoji rostliny, například nalezením korelace mezi množstvím přítomné mRNA *Tf* a úrovní narušení standardního vývoje rostliny. Pro pochopení patogeneze PSTVd je objasnění role tohoto transkripčního faktoru potenciálně důležité.

Při tomto řešení pomocí qPCR stanovení hladiny exprese bude nutné dbát na správnou sekvenci primerů, které je potřeba navrhnout do míst lišících se od podobného genu standardně obsaženého v tabáku, ekvivalentu *Tf*, který obsahuje velké množství shodných

úseků. Bylo by taktéž žádoucí proměřit míry exprese v jednotlivých rostlinách obsahující různý počet insertů s odlišnými symptomy, a pokusit se mezi těmito veličinami najít korelaci.

Tyto informace by mohly přispět k hlubšímu porozumění patogenese viroidu PSTVd a interakci vdRNA s molekulami hostitelského organismu.

Při vložení sekvence *Tf* do genomu tabáku je nutné vzít v potaz možnou interferenci mRNA vznikající z transgenu *Tf* s mRNA vznikající jako produkt originálního genu z *Nicotiana benthamiana* kódující vlastní transkripční faktor, ekvivalentní rajčatovému *Tf*. Sekvenci tohoto genu a jeho podobnost s *Tf* na nukleotidové úrovni zobrazuje obrázek 24. K dispozici je v tuto chvíli pouze sekvence DNA i s introny, které se nám nepodařilo přesně vystříhnout, proto shodu na aminokyselinové úrovni nebylo možné stanovit, neboť je narušen čtecí rámec. Vezmeme-li ovšem v potaz možnost přítomnosti těchto pravděpodobně velmi podobných mRNA v buňkách rostliny ve stejný čas, můžeme dojít k závěru, že výsledné symptomy v rostlině po transformaci *Tf* mohou být způsobeny umlčením, nikoli overexpresí *Tf*.

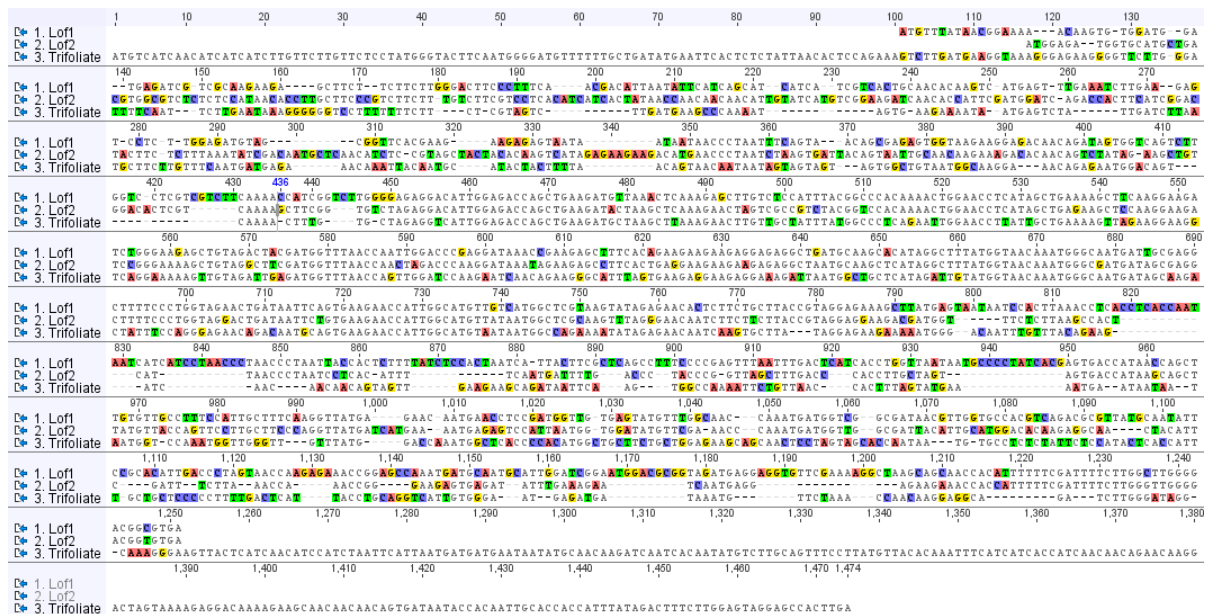


Obr. 24: Srovnání genů *Tf* a homologického genu z *Nicotiana benthamiana* na nukleotidové úrovni vykazující 64,4% shodu. Vyrobeno v Geneious® (Biomatters Ltd., USA).

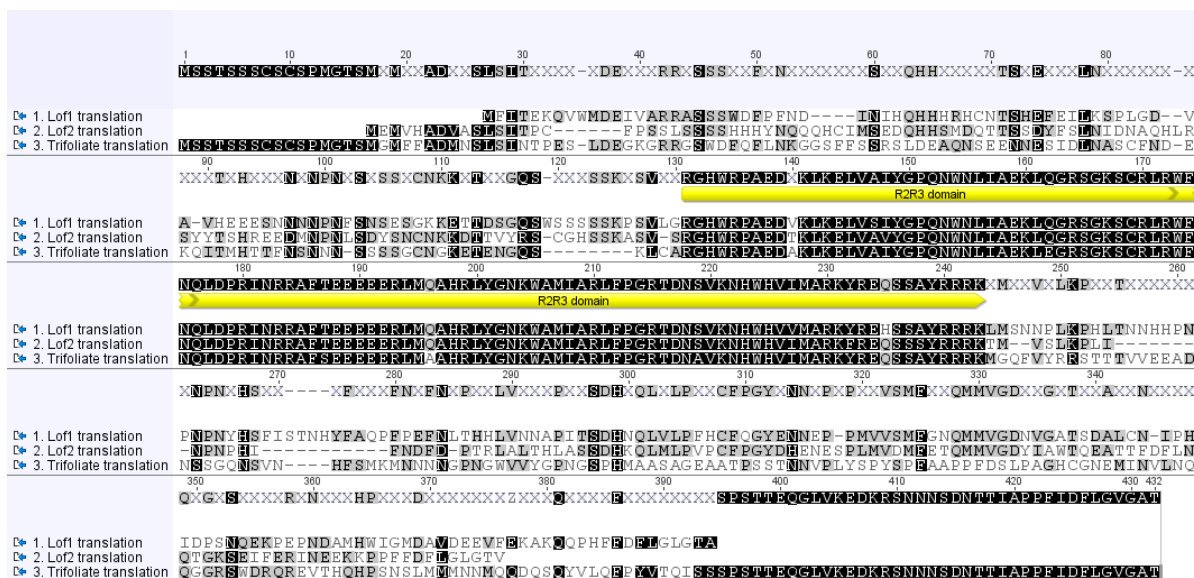
### 5.3 Funkční nenahraditelnost genů *Tf* a *Lof1*

I přes předpokládanou podobnost genu původem z *Arabidopsis thaliana Lof1* s genem *Tf* z rostliny rajčete *Solanum lycopersicum* nenapovídají výsledky pokusů založených na transienční expresi v listech *Nicotiana benthamiana* a komplementační analýza funkční podobnost a tedy vzájemnou nahraditelnost v regulaci pochodů účastnících se drah vedoucích k postupnému vývoji částí těl rostlin a konečné determinaci sestavení jednotlivých fytoemerů.

Ačkoliv na nukleotidové úrovni vykazují *Lof1* s *Tf* shodu 63 %, v konzervované doméně R2R3 zodpovědné za navázání na DNA a vlastnosti enzymu coby transkripčního faktoru je na aminokyselinové úrovni shoda 93%. Podobnost genů *Tf*, *Lof1* na nukleotidové úrovni zobrazuje obr. 25, na aminokyselinové úrovni obr. 26. Na tomto schématu je anotovaná R2R3 doména s dobře patrnou vysoce konzervovanou doménou. Pro názornost je uveden i příbuzný gen *Lof2* (původem z *Arabidopsis thaliana*), taktéž vykazující vysokou homologii.



Obr. 25: Srovnání nukleotidových sekvencí genů *Tf*, *Lof1* a *Lof2*. Vyrobeno v Geneious® (Biomatters Ltd., USA).



Obr. 26: Srovnání aminokyselinových sekvencí genů *Tf*, *Lof1* a *Lof2* s anotovanou R2R3 vazebnou doménou. Vyrobeno v Geneious® (Biomatters Ltd., USA).

## 5.4 Způsobení symptomů podobných infekci viroidem PSTVd

Mezi způsobené defekty, které manipulace s genem *Tf* přinesla, patřil častý výskyt nekrotů, které se vyskytly u stabilní exprese v rostlinách *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana tabacum* i po docílení transientní exprese v listech *Nicotiana benthamiana*. Dalšími projevy byla zakrslost jak *Nicotiana benthamiana*, tak *Nicotiana tabacum*, velmi podobná inhibici růstu způsobenou infekcí viroidem PSTVd (viz Obr. 27). Při infekci viroidem dochází k umlčení exprese *Tf*, zde naopak došlo k overexpresi. Pro účely studia tohoto potenciálního targetu PSTVd by bylo ideální gen naopak i umlčet, například pomocí RNAi (Hannon 2002) nebo pomocí techniky TALENs (Boch 2011, Joung a Sander 2013).





Obr. 27: Wild type (A) *Nicotiana benthamiana* ve srovnání s *Nicotiana benthamiana* nakaženou viroidem PSTVd (B). Měřítko 5 cm. Převzato a upraveno z Selinger 2008.

## 6 Závěr

Genem, potenciálním targetem viroidu PSTVd, kódující transkripční faktor z rodiny myb, obsahující DNA vazebnou doménu R2R3, vysoce konzervovanou v mnoha eukaryotních organismech, známý jako *Tf*, byly transformovány *Arabidopsis thaliana* wt, mutant *lof1*, *Nicotiana benthamiana* a *Nicotiana tabacum* a pozorovány způsobené změny vyvolané overexpresí *Tf*.

V případě rostlin *Arabidopsis thaliana* nebyly pozorovány změny fenotypu a *Tf* nebyl schopen funkčně nahradit podobný gen *Lateral organ fusion 1*. Všichni transformovaní jedinci vykazovali defektní fenotyp způsobený abnormálním srůstáním okrajů některých orgánů, způsobený umlčením *Lof1*. U rostlin *Nicotiana benthamiana* a *Nicotiana tabacum* způsobila overexprese výrazné změny morfologie a vývoje jednotlivých organismů.

Z pokusů zakládajících se na vyvolání transienční exprese *Tf* agroinfiltrací v tabáku, po kterém vznikaly rozsáhlé nekrózy a odumírání rozsáhlých úseků rostliny, které se podobají symptomům vyvolaným při stabilní expresi, je pravděpodobná role *Tf* v přímém či nepřímém ovlivňování některých enzymů podílejících se na degradaci buněk, např. nukleáz. Z důvodu rozdílných a velmi mírných symptomů v listech v pokročilých stádiích senescence

je pravděpodobná zvýšená důležitost *Tf* v raných vývojových stádiích rostliny, neboť exprese genů jím ovládaných je v tomto období života rostliny potlačena (Naz *et al.*, 2012). Při dočasné expresi genu *Lof1* při agroinfiltraci nebyly pozorovány výraznější změny, což spolu s pokusy založené na stabilní expresi nenaznačuje funkční nahraditelnost těchto dvou genů, i přes předpoklad získaný na základě *in silico* analýzy, kdy shoda v konzervované doméně činí 92%.

Kvůli těmto novým poznatkům přisuzujeme *Tf* důležitou úlohu v řízení kaskády drah, vedoucí ve výsledku k typické morfologii listů a stavby jednotlivých částí rostliny, přičemž manipulace s expresí tohoto genu je schopná způsobit v rostlině nepřírozené defekty vedoucí k příznakům podobným těm způsobovaným viroidem PSTVd. Interakce vdRNA s molekulami hostitele nebyla vyloučena a je tedy možná. Pro odhalení přesné role *Tf* v životě viroidu PSTVd bude potřeba dalších analýz a výzkumu.



## Použitá literatura

Boch, J. (2011) "TALEs of genome targeting". *Nature Biotechnology* 29: 135–136.

Branch, A., Robertson, H. (1984) A replication cycle for viroids and other small infectious RNA's. *Science* 223: 450–455.

Brodersen, P., Voinnet, O. (2006) The diversity of RNA silencing pathways in plants. *Trends in Genetics* 22: 268-280.

Bříza, J., Pavingerová, D., Přikrylová, P., Gazdová, J., Vlasák, J., Niedermeierová H. (2008) Use of phosphomannose isomerase-based selection system for *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato and potato. *Biologia Plantarum* 52: 453-461.

Carthew, R., Sontheimer, E. (2009) Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 136: 642-655.

Chen, Y. H. *et al.* (2006) The MYB transcription factor superfamily of *Arabidopsis*: Expression analysis and phylogenetic comparison with the rice MYB family. *Plant Molecular Biology* 60: 107-124.

Clough, S. J., Bent, A. F. (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 6: 735-743.

Dam-Mieras, M.C.E., Jeu W.H., Vries, J., Currell, B.R., James, J.W., Leach, C.K., Patmore, R. A. (1993) Genome Management in Eucaryotes. Publikoval Butterworth-Heinemann Ltd., Oxford (UK).

Daròs, J., Marcos, J., Hernández, C., Flores, R. (1994) Replication of *avocado sunblotch viroid*: evidence for a symmetric pathway with two rolling circles and hammerhead ribozyme processing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 12813–12817.

Diener, T.O. (1971) Potato spindle tuber virus .4. Replicating, low molecular weight RNA. *Virology* 45: 411-428.

Diener, T.O. (1995) Origin and evolution of viroids and viroid-like stellite RNAs. *Virus Genes* 11: 119-131.

- Diermann, N., Matoušek, J., Junge, M., Riesner, D., Steger, G. (2010) Characterization of plant-miRNAs and small RNAs from *potato spindle tuber viroid* (PSTVd) in infected tomato. *Biological Chemistry* 391: 1379–1390.
- Ding, B. (2010) Viroids: self-replicating, mobile, and fast-evolving noncoding regulatory RNAs. *Wiley Interdisciplinary Reviews-RNA* 1: 362–375.
- Du, H., Feng, B.R., Yang, S.S., Huang, Y.B., Tang, Y.X. (2012) The R2R3-MYB Transcription Factor Gene Family in Maize. *Plos One* 7: e37463.
- Dubos, C., Stracke, R., Grotewold, E., Weisshaar, B., Martin, C., Lepiniec, L. (2010) MYB transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science* 15: 573-581.
- Fire, A., Xu, S.Q., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., Mello, C.C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391: 806-811.
- 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. *Annual Review of Phytopathology* 43: 117-139.
- Gendron, J.M., Liu, J.S., Fan, M., Bai, M. Y., Wenkel, S., Springer, P.S., Barton, M.K., Wang, Z.Y., (2012) Brassinosteroids regulate organ boundary formation in the shoot apical meristem of *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109: 211152-21157.
- Goodin, M., Zaitlin, D., Naidu, R., Lommel, S. (2008) *Nicotiana benthamiana*: Its history and future as a model for plant-pathogen interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21: 1015-1026.
- Hammond, R., W., Owens, R., A. (2006) Viroids: New and Continuing Risks for Horticultural and Agricultural Crops. Online. APSnet Features. doi: 10.1094/APSnetFeature-2006-1106.
- Hannon, G. J. (2002) RNA interference. *Nature* 418: 244-251.

- Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J., Williams, P.M. (1996) Real time quantitative PCR. *Genome Research* 6: 986-994.
- Hoskovec, L. (2007) *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Dostupné z WWW: <<http://botany.cz/cs/arabidopsis-thaliana/>> staženo 19. 3. 2014.
- Janssen, R., Gardner L. (1989) Localized transient expression of GUS in leaf discs following cocultivation with *Agrobacterium*. *Plant Molecular Biology* 14: 61-72.
- Jen, G. C., Chilton, M. D. (1986) The right border region of PTIT37 T-DNA is intrinsically more active than the left border region in promoting T-DNA transformation. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 83: 3895-3899.
- Jones, H. (1995) Plant gene transfer and expression protocols. *Methods in Molecular Biology* 49: 39-48.
- Joung, J. K., Sander, J. D. (2013) Innovation TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 14: 49-55.
- Kapila, J., DeRycke, R., VanMontagu, M., Angenon, G. (1997) An *Agrobacterium*-mediated transient gene expression system for intact leaves. *Plant science* 122: 101-108.
- Kaul, S., Koo, H. L., Jenkins, J. *et al.* (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 796-815.
- Keese, P., Symons, R. H. (1985) Domains in viroids: Evidence of intramolecular RNA rearrangements and their contribution to viroid evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82: 4582-4586.
- Langley, R. A., Kado, C. I. (1972) Studies on *agrobacterium-tumefaciens* - conditions for mutagenesis by n-methyl-n'-nitro-n-nitrosoguanidine and relationships of a *tumefaciens* mutants to crown-gall tumor induction. *Mutation Research* 14: 277-286.
- Lee, D. K., Geisler, M., Springer, P., (2009) LATERAL ORGAN FUSION1 and LATERAL ORGAN FUSION2 function in lateral organ separation and axillary meristem formation in *Arabidopsis*. *Development* 136: 2423-2432.

- Lima, M. I., Fonseca, M. E. N., Flores, R., Kitajima, E. W. (1994) Detection of *avocado sunblotch viroid* in chloroplasts of avocado leaves by *in-situ* hybridization. *Archives of Virology* 138: 385-390.
- Logemann, E., Birkenbihl, R.P., Ulker, B., Somssich, I.E. (2006) An improved method for preparing *Agrobacterium* cells that simplifies the *Arabidopsis* transformation protocol. *Plant Methods* 2: 16.
- 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. *Biological Chemistry* 388: 1-13.
- Matzke, A.J., Matzke, M.A. (1998) Position effects and epigenetic silencing of plant transgenes. *Current Opinion in Plant Biology* 1: 142-148.
- McSteen, P., Leyser, O. (2005): Shoot branching. *Annual Review of Plant Biology* 56: 353-374.
- Mladá, J., Procházka F. (1987) Atlas cizokrajných rostlin. Státní zemědělské nakladatelství, Praha.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Naz, A.A., Raman, S., Martinez, C.C., Sinha, N.R., Schmitz, G., Theres, K. (2013) Trifoliolate encodes an MYB transcription factor that modulates leaf and shoot architecture in tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 110: 2401-2406.
- Nečásek, J. (1993) Genetika. Scientia, Praha.
- Owens, RA., Steger, G., Hu, Y., *et al.* (1996) RNA structural features responsible for potato spindle tuber viroid pathogenicity. *Virology* 222: 144-158.
- Roger, S. O., Bendich, A. J. (1988) Extraction of DNA from plant tissue. *Plant Molecular Biology Manual* A6: 1-10.
- Sager, R., Ryan. F. (1968) Cell Heredity. John Wiley and Sons, London.

Selinger, M. (2008) Infekční systém pro studium mechanismů viroidní patogeneze. Středoškolská odborná činnost 2007/2008, Obor – biologie.

Selinger, M. (2013) Studium exprese cílových mRNA při pospiviroidní patogenezi v systému „leaf factory.“ Diplomová práce, PřF JU České Budějovice.

Stark-Lorenzen, P., Guitton, M., Werner, R., Mühlbach, H. (1997) Detection and tissue distribution of potato spindle tuber viroid in infected tomato plants by tissue print hybridization. *Archives of Virology* 142: 1289–1296.

Stracke, R., Werber, M., Weisshaar, B. (2001) The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Current Opinion in Plant Biology* 4: 447-456.

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 Journal* 33: 949-956.

Wassenegger, M., Spieker, R. L., Thalmeir, S., Gast, F. U., Riedel, L., Sängler, 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: 191–197.

Weigel, D., Glazebrook, J. (2006) Kanamycin selection of transformed *Arabidopsis*. *CSH Protocols*. doi: 10.1101/pdb.prot4669.

Xianzhou, N. (2012) Analysis of sequence polymorphism and population structure of Tomato chlorotic dwarf viroid and potato spindle tuber viroid in viroid-infected tomato plants. *Viruses* 4: 940-953.

Zhu, Y.L., Green, L., Woo, Y.M., Owens, R., Ding, B. (2001) Cellular basis of potato spindle tuber viroid systemic movement. *Virology* 279: 69-77.

## Použité zkratky

ASBVd – avocado sun blotch viroid  
BAP - 6-benzylaminopurin  
Bp – base pair  
BRZ1 – brassinosteroid activated factor  
CUC1, CUC2, CUC3 – cup-shaped cotyledon  
DNA – deoxyribonucleic acid  
EDTA - ethylenediaminetetraacetic acid  
GMO – genetically modified organism  
Km - kanamycin  
LB – médium pro růst bakterií  
LK – médium pro růst *Agrobacteria* (Langley, Kado)  
Lof1, lof2 – lateral organ fusion  
mRNA – mediator RNA  
MYB – rodina genů, odvozeno z „myeloblastosis“  
*nptII* – neomycin phosphotransferase II  
PCR – polymerase chain reaction  
pLV07 – plasmid s konstruktem s geny *Tf* a *nptII*  
PSTVd – potato spindle tuber viroid  
qPCR – quantitative PCR  
RNA – ribonucleic acid  
SDS - sodium dodecyl sulfate  
Sm - spektinomycin  
TE – TRIS/EDTA buffer  
TRIS - tris(hydroxymethyl)aminomethane  
T-DNA – transfer DNA  
Tf - trifoliolate  
UV lampa – ultra violet lampa  
Wt – wild type, kontrolní rostlina