

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra experimentální biologie rostlin**



**Transformace lilku bramboru genem kódujícím  
proteázový inhibitor SPI-2**

Transformation of potato with protease inhibitor gene SPI-2

**Barbora Říhová**

Diplomová práce

Praha 2013

**Školitel:** RNDr. Lukáš Fischer, Ph.D.

**Konzultant:** RNDr. Lenka Dvořáková, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně, s použitím citované literatury, pod vedením mého školitele RNDr. Lukáše Fischera, Ph.D. a za konzultace s RNDr. Lenkou Dvořákovou, Ph.D. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu. Souhlasím se zveřejněním jejího obsahu.

V Praze, dne 15.8.2013

Barbora Říhová

## PODĚKOVÁNÍ

Na prvním místě upřímně děkuji svému školiteli RNDr. Lukáši Fischerovi, Ph.D., za odborné vedení, korektury textu, trpělivost, ochotu a především jeho porozumění a lidskost, které mi velmi pomohly diplomovou práci dokončit.

Také moc děkuji RNDr. Lence Dvořákové, Ph.D., za zaškolení v metodách, cenné rady a milý přístup.

Mé díky patří i dalším kolegům z Laboratoře buněčné biologie a biotechnologie rostlin, především RNDr. Miroslavu Srbovi, Mgr. Dymitriji Tyčovi, Mgr. Miloši Duchoslavovi a Mgr. Vojtěchovi Čermákovi za odborné rady i přátelské prostředí. Halce Hrabákové, DiS děkuji za udržování laboratoře v chodu. RNDr. Janě Krtkové, Ph.D., děkuji za její čas a pomoc při optimalizaci proteinové elektroforézy.

Děkuji i dalším členům Katedry experimentální biologie rostlin za jakoukoliv pomoc, mezi nimi například Mgr. Ivanu Kulichovi za zaškolení při infiltraci tabáku i za jeho povzbuzující úsměv.

A na závěr vyjadřuji obrovské díky a úctu svým rodičům, za velkou psychickou podporu, porozumění a zázemí.

Diplomová práce byla financována z Výzkumného záměru MŠMT Signalizace a molekulární mechanizmy buněčné odpovědi (MSM 0021620858).

## OBSAH

Poděkování.....	3
Obsah .....	4
Seznam použitých zkratk .....	7
Abstrakt.....	8
Abstract.....	9
1. Úvod.....	10
2. Cíle.....	12
3. Literární přehled.....	13
3.1. Faktory negativně ovlivňující produkci hlíz bramboru.....	13
3.1.1. Bakteriální choroby lilku bramboru .....	14
3.1.2. Houbové choroby lilku bramboru .....	14
3.1.3. Virové choroby lilku bramboru.....	15
3.2. Obranné mechanismy rostlin proti škůdcům .....	15
3.3. Strategie boje se škůdci a patogeny lilku bramboru.....	18
3.3.1. Chemická ochrana.....	18
3.3.2. Biologická ochrana .....	18
3.3.3. Klasické šlechtění .....	19
3.3.4. Genové inženýrství .....	21
3.3.4.1. Inhibitory serinových proteáz .....	22
3.3.4.2. Gen <i>SPI-2</i> .....	23
4. Materiál a metody .....	24
4.1. Biologický materiál.....	24
4.1.1. Bakterie .....	24
4.1.1.1. Příprava kompetentních buněk <i>E. coli</i> .....	24
4.1.1.2. Elektroporace <i>E. coli</i> .....	25
4.1.1.3. Příprava kompetentních buněk <i>A. tumefaciens</i> .....	26
4.1.1.4. Elektroporace <i>A. tumefaciens</i> .....	27
4.1.2. Vektory .....	27

4.1.2.1.	<i>pDrive Cloning Vector</i> .....	27
4.1.2.2.	<i>pCP60</i> .....	28
4.1.3.	Rostliny .....	29
4.1.3.1.	Kultivace tabáku .....	29
4.1.3.2.	Transformace tabáku.....	29
4.1.3.3.	Kultivace bramboru.....	30
4.1.3.4.	Transformace bramboru .....	31
4.1.3.5.	Sklízení rostlinného materiálu.....	32
4.2.	Práce s DNA .....	32
4.2.1.	PCR .....	32
4.2.2.	Elektroforéza DNA .....	33
4.2.3.	Sekvenace .....	34
4.2.4.	Izolace DNA z agarózového gelu .....	35
4.2.5.	Restrikční štěpení.....	36
4.2.6.	Izolace plazmidové DNA z bakterií.....	36
4.2.7.	Ligace.....	37
4.2.7.1.	Ligace do <i>pDCV</i> .....	37
4.2.7.2.	Ligace do <i>pCP60</i> .....	37
4.2.8.	Odsolení ligační směsi .....	38
4.2.9.	Příprava a ověření modifikovaných genů .....	38
4.3.	Práce s RNA.....	42
4.3.1.	Izolace RNA z rostlin.....	42
4.3.2.	RT-PCR.....	42
4.4.	Práce s proteiny .....	43
4.4.1.	Izolace proteinů z <i>A. tumefaciens</i> .....	43
4.4.2.	Izolace proteinů z rostlinného materiálu .....	43
4.4.3.	SDS polyakrylamidová elektroforéza .....	44
4.4.4.	Detekce proteinů .....	45
4.4.4.1.	Přenos proteinů na membránu.....	46

4.4.4.2.	Nepřímá detekce proteinů na membráně.....	46
4.4.4.3.	Vyvíjení v ECL systému .....	47
4.4.4.4.	Barvení Ponceau S .....	47
5.	Výsledky .....	48
5.1.	Příprava genových konstruktů <i>SPI-2-T</i> , <i>SPI-2-Y</i> a <i>SPI-2-T-<i>apo</i></i> .....	48
5.2.	Příprava a ověření plazmidu <i>pDCV</i> s inzerty <i>SPI-2-T</i> , <i>SPI-2-Y</i> a <i>SPI-2-T-<i>apo</i></i> .....	50
5.3.	Příprava a ověření plazmidu <i>pCP60</i> s inzerty <i>SPI-2-T</i> , <i>SPI-2-Y</i> a <i>SPI-2-T-<i>apo</i></i> .....	51
5.4.	Transformace tabáku.....	53
5.5.	Transformace lilku bramboru.....	53
5.6.	Analýza exprese <i>SPI-2</i> v rostlinách .....	54
5.6.1.	Detekce proteinu <i>SPI-2</i> .....	54
5.6.2.	Detekce transkriptu <i>SPI-2</i> .....	57
5.6.3.	Analýza intaktnosti expresní kazety inzertovaného genu <i>SPI-2</i> .....	58
5.7.	Analýza příčin vyšší účinnosti regenerace listů bramboru po transformaci .....	58
6.	Diskuze .....	65
6.1.	Exprese genu <i>SPI-2</i> v rostlinách .....	65
6.2.	Regenerace listů bramboru po transformaci .....	68
7.	Závěry .....	71
8.	Seznam literatury .....	72

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
<i>B. thuringiensis</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
BAP	benzylaminopurin (cytokinin)
bp	base pairs - páry bazí
cDNA	complementary DNA – komplementární DNA
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
GA3	gibberellic acid - kyselina giberelová
HR	hypersenzitivní reakce
konc.	koncentrace
MCS	Multiple Cloning Site – polylinker, místo vkládání transgenu
NAA	naphthaleneacetic acid – kyselina naftyloctová (auxin)
<i>N. benthamiana</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i>
O.D.	Optic Density – optická denzita
PCR	Polymerase Chain Reaction – polymerázová řetězová reakce
<i>pDCV</i>	<i>pDrive Cloning Vector</i>
pozn.	poznámka
PR protein	pathogenesis-related protein
ROS	Reactive Oxygen Species – reaktivní sloučeniny kyslíku
RT	room temperature – pokojová teplota
SAR	system acquired resistance – systémově získaná rezistence
<i>SL</i>	signální sekvence
<i>SPI-2</i>	Silk Protease Inhibitor - 2
subsp.	subspecies, poddruh

## **ABSTRAKT**

Předmětem této diplomové práce byla genetická modifikace lilku bramboru za účelem zvýšení jeho rezistence vůči patogenům a škůdcům. Při vývoji rezistence rostlin se často využívá podobných typů molekul, které rostliny samy využívají při svých obranných reakcích. V této práci byl pro genetickou modifikaci použit gen kódující zástupce inhibitorů serinových proteáz *SPI-2*, pocházející ze zavíječe voskového (*Galleria mellonella*). Jelikož se v předchozích pokusech týmu protein *SPI-2* nepodařilo v transformovaných rostlinách detekovat, byla základní forma genu upravena přidáním Kozakové sekvence do okolí iniciačního kodónu, čímž se měla zvýšit iniciace translace a tím hladina proteinu. Pro transformaci byly připraveny dva konstrukty, kódující proteiny *SPI-2-T* a *SPI-2-Y*, které se liší jednou aminokyselinou, a to mírně pozměňuje jejich inhibiční aktivitu. Konstrukt *SPI-2-T* byl nejprve pomocí infiltrace s *Agrobacterium tumefaciens* vnesen do listů tabáku *Nicotiana benthamiana*. Oba konstrukty *SPI-2-T* a *SPI-2-Y* byly poté použity pro stabilní transformaci lilku bramboru (*Solanum tuberosum* cv. *Desireé*). Přítomnost proteinu se však v rostlinách nepodařilo prokázat, přestože byl vnesený gen transkribován a jeho sekvence v rostlinách byla ověřena sekvenací. Je tedy pravděpodobné, že protein není v cytoplazmě stabilní. Byl proto vytvořen třetí konstrukt (*SPI-2-T-apo*), jehož produkt je směřován do apoplastu, kde by mohl být stabilnější. Tento konstrukt je nyní k dispozici pro výzkum v rostlinách. Vedlejším, nicméně z praktického hlediska důležitým výstupem práce bylo zjištění, že zvýšená hladina claforanu (ze 300 mg/l na 500 mg/l) výrazně urychluje regeneraci prýtů z kalusů po transformaci bramboru.

**Klíčová slova:** *Solanum tuberosum*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Galleria mellonella*, genetická modifikace, inhibitor proteáz *SPI-2*, patogen, škůdce, rezistence, Kozakové sekvence



## **ABSTRACT**

The subject of my thesis was to genetically modify a potato for increased resistance against its pathogens and pests. In developing a resistant plant, it is quite common to use the same type of molecules that plants use themselves in their defense reactions. In this work I used the gene *SPI-2* originating from a honeycomb moth (*Galleria mellonella*). The protein SPI-2 is a member of serine protease inhibitors. Since the previous attempts of the team to detect the protein in transformed plants haven't been successful, the basic form of the gene was modified by adding a Kozak sequence near the start codon, which should have increased the translation initiation and hence increase the level of the protein. Two constructs were prepared for the transformation: *SPI-2-T* and *SPI-2-Y*. They differ by one amino acid, which slightly changes their inhibitory activity. First, the construct *SPI-2-T* was used for a transient transformation of tobacco *Nicotiana benthamiana* by agroinfiltration of its leaves. Then both constructs were used for a stable transformation of *Solanum tuberosum* cv. *Desireé*. The detection of the protein has not been successful, although the inserted gene was transcribed and its sequence was verified by sequencing. It is therefore most likely that the protein has a low stability in the cytoplasm. For that reason a third construct has been prepared (*SPI-2-T-apo*). Its product is targeted to the apoplast, where it should be more stable. This construct is now available for experimenting in plants. Adjacent, yet important practical output of the work was finding out that an increased concentration of claforan (from 300 mg/l to 500 mg/l) significantly accelerates regeneration of shoots from calluses after the transformation of potato.

**Keywords:** *Solanum tuberosum*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Galleria mellonella*, genetic modification, protease inhibitor SPI-2, pathogen, pest, resistance, Kozak sequence

## 1. ÚVOD

V průběhu vývoje lidského poznání se odepaměti hledaly způsoby, jak zlepšit kvalitu a zvětšit kvantitu pěstovaných plodin. Tato dlouhá cesta začala selektováním jedinců z přirozeně variabilních populací dle jejich fenotypových projevů. S dalším vývojem byla variabilita uměle zvyšována mutagenezí. Postupný vývoj v oblasti genetiky a molekulární biologie nakonec umožnil měnit genom rostliny i cíleně vložením konkrétního úseku genetické informace, který lze předem upravit a jeho produkt analyzovat. Činí se tak pomocí nástrojů genového inženýrství. Rostliny se geneticky modifikují například pro prodlouženou trvanlivost plodů, změněný obsah některých látek, produkci vakcín, zlepšení výživových hodnot, atraktivnější vzhled, nebo pro rezistenci k herbicidům nebo patogenům.

Právě rezistencí k patogenům se zabývá i tato diplomová práce, a to konkrétně na modelu lilku bramboru. Lilek brambor je jednou z nejvýznamnějších plodin na světě. Jeho hlízy tvoří významnou složku potravy velké části lidstva, jsou zdrojem proteinů, volných aminokyselin, významným zdrojem škrobu, vitamínu C, draslíku, vitamínu B6, antioxidantů (Vanloon, 1985, Sotelo & Perez, 2003), případně vlákniny, je-li konzumována i slupka. Hlízy jsou využitelné nejen pro potravinářské, ale i pro krmivářské a technické účely. Existuje zde proto tlak na neustálé zvyšování výnosů a snižování nákladů, a je tedy velmi žádoucí, aby pěstované monokultury bramboru byly zdravé. Brambor je množen vegetativně pomocí hlíz, mimo jiné proto, že je heterozygotní autotetraploid ( $4n = 48$ ). Tento způsob množení představuje velké riziko přenosu infekcí. Výzkum za účelem vývoje rezistence u lilku bramboru je tedy velice žádaný.

Jeden z přístupů k vývoji rezistence u rostlin je využití některých složek přirozených obranných reakcí rostlin. Inhibitory serinových proteáz hrají v takových reakcích významnou roli. V této práci byl za účelem zvýšení rezistence použit hmyzí gen kódující inhibitor serinových proteáz nazvaný *SPI-2* (Silk Protease Inhibitor - 2). Tento gen byl izolován v týmu prof. RNDr. Františka Sehnala, CSc. z Entomologického ústavu v Českých Budějovicích. Jeho tým se touto problematikou již delší dobu zabýval, avšak transgenní rostliny lilku bramboru získané ve spolupráci s RNDr. Lukášem Fischerem, Ph.D., nesoucí základní formu genu *SPI-2* vykazovaly jen

malé a nereprodukovatelné změny v rezistenci a protein SPI-2 (s hexa-Histidinovou kotvou) se v rostlinách nepodařilo detekovat. Vzhledem k vysoké hladině transkripce vneseného genu u mnoha linií mohla být nízká hladina proteinu důsledkem nevhodného sekvenčního kontextu v okolí iniciačního kodónu či nestability proteinu v cytoplazmě. V mé diplomové práci byly proto vytvořeny nové varianty genu *SPI-2*, u nichž se předpokládalo dosažení vyšší hladiny proteinu SPI-2 v rostlinách a i následné zvýšení odolnosti.

## 2. CÍLE

Cílem diplomové práce bylo vytvořit linie modelového kultivaru lilku bramboru (*Solanum tuberosum* cv. *Desirée*) transformované různě upravenými variantami genu *SPI-2*, který kóduje inhibitor bakteriálních a houbových serinových proteáz. Tento inhibitor je přítomen v hedvábných vláknech zavíječe voskového (*Galleria mellonella*). Východiskem práce byl předpoklad, že přítomnost inhibitoru proteáz utlumí či potlačí infekci některými patogeny, neboť nebudou schopni efektivně využít proteiny hostitele ke svému růstu a množení.

### **Dílčí cíl práce č.1:**

Vytvořit konstrukty pro expresi tří variant *SPI-2* v rostlinách.

### **Dílčí cíl práce č.2:**

Připravenými konstrukty transformovat tabák (transientně) a lilek brambor (stabilně) a ověřit expresi vnesených genů.

### **3. LITERÁRNÍ PŘEHLED**

Současná praxe pěstování velkých ploch geneticky uniformních monokultur, ač výhodná z hlediska technologického, s sebou nese značná rizika především proto, že se v nich velmi snadno šíří škůdci a patogeny. To může mít za následek sníženou kvantitu i kvalitu konečného produktu (zpravidla potravinu nebo krmiva), což může mít rozličné negativní důsledky, např. zdravotní, hospodářské a sociální (Hammond-Kosack *et al.*, 2004). Rostliny se přirozeně brání útoku herbivorů či rozvoji virových, bakteriálních či houbových infekcí, avšak v mnoha případech zůstává účinné omezování negativních důsledků invaze na umělém zásahu ze strany člověka. Šlechtění na vyšší přirozenou rezistenci je tedy velmi významné a kromě klasických postupů v poslední době zahrnuje i postupy genového inženýrství.

#### **3.1. FAKTORY NEGATIVNĚ OVLIVŇUJÍCÍ PRODUKCI HLÍZ BRAMBORU**

Faktory negativně ovlivňující kvalitu brambor dělíme na abiogenní a biogenní. Mezi abiogenní řadíme poškození způsobené např. povětrnostními podmínkami, zasolením a mechanickým poškozením. Mezi biogenní řadíme jiné živé organizmy (Boyer, 1982). Ze škůdců jsou to hlodavci, hlísti (hád'átko bramborové), brouci, především Mandelinka bramborová (*Leptinotarsa decemlineata*), mšice, roztoči, ploštice, křísti, motýli, tiplice, třásněnky, cvrčci a slimáci), živící se požerem nebo sáním. Tím nejen narušují rostlinná pletiva a odebírají rostlině živiny potřebné pro její růst a vitalitu, ale také tím otevírají cestu pro ostatní patogeny nebo infekci přímo přenášejí. Infekce také může pronikat průduchy nebo je často přítomna již v sadbě. Infekce bývají způsobeny bakteriemi, viry, viroidy, fytoplazmami (specializovanými bakteriemi) a houbami (plísněmi). Organizmy, které svou ontogenezi (celou nebo její část) prožijí v těsném kontaktu s rostlinou, a které rostlinu využívají a poškozují, se nazývají rostlinné patogeny, přičemž projevy působení patogenu se označují jako choroby (Hammond-Kosack *et al.*, 2004). Patogeny lze rozdělit na biotrofní (takové, které hostitelskou rostlinu nezabíjejí, pouze ji poškozují), nekrotrofní (takové, které hostitelskou rostlinu usmrtí a pak žijí jako saprofyté) a hemibiotrofní (zpočátku biotrofní, poté buňky hostitele usmrtí), jako např. *Verticillium*

*dahliae*, plíseň, která zpočátku napadá živá pletiva a později infikuje pletiva odumřelá z důvodu ucpaní vaskulárního systému (Bishop & Cooper, 1983). Určitá choroba se u rostliny rozvine, pokud rostlina nerozezná patogen a/nebo nemá účinné obranné mechanismy a/nebo její obranné mechanismy nejsou účinné (Herms & Mattson, 1992). Patogeny se liší i podle toho, zda napadají celou rostlinu nebo pouze její část, jak je u konkrétních příkladů uvedeno dále.

Rostliny mohou být vůči působení patogena tolerantní, tzn. že u nich dojde k infekci, ale ta proběhne bezpříznakově. Takové rostliny mohou být nebezpečným zdrojem infekce pro jiné rostliny. Rostliny také mohou být rezistentní. V tom případě jsou po napadení rostliny spuštěny signalizační dráhy, které zabrání rozvoji infekce (Baker *et al.*, 1997).

### **3.1.1. Bakteriální choroby lilku bramboru**

Bakteriální choroby se šíří především sadbou, nebo je šíří hmyz. Mezi bakteriální choroby brambor ovlivňující kvalitu hlíz patří např. kroužkovitost brambor způsobená bakterií *Clavibacter michiganensis* subsp. *Sepedonicus* a hnědá hniloba způsobená bakterií *Ralstonia solanacearum*. Aktinomycetová obecná strupovitost brambor, způsobená nejčastěji druhem *Streptomyces scabies*, má vliv na povrchovou kvalitu hlíz. Bakterie rodu *Erwinia*, např. *E. carotovora* subsp. *carotovora*, způsobující mokrou hnilobu hlíz a *E. carotovora* subsp. *atroseptica*, způsobující bakteriální černání stonku, bývají často sekundárními patogeny, především po napadení houbovým patogenem *Phytophthora infestans* (Perombelon & Kelman, 1980, During *et al.*, 1993).

### **3.1.2. Houbové choroby lilku bramboru**

Plíseň bramborová je způsobená houbou *Phytophthora infestans*, která je schopna napadnout celou rostlinu. Tento patogen, který se vyvinul pravděpodobně koevolucí s bramborem, je nejdůležitější biotický faktor negativně ovlivňující produkci

brambor na celém světě (Niederhauser, 1991). V 19. století byl příčinou známých hladomorů v Irsku. Další houbová choroba, fusáriová hniloba, je způsobena některými druhy houby z rodu *Fusarium*. Celkem bylo identifikováno 13 druhů, které způsobují fusáriovou hnilobu ve světě. Patří mezi ně např. *F. solani* var. *coeruleum*, *F. sambucinum*, *F. avenaceum*, *F. equiseti*, *F. acuminatum* a *F. culmorum* (Cullen *et al.*, 2005). Dalším houbovým onemocněním je např. vložkovitost bramboru způsobená houbou *Rhizoctonia solani* (Carling & Leiner, 1986) a stříbřitost slupky způsobená *Helminthosporium solani* napadající hlízy především během jejich skladování (Jellis & Taylor, 1977). Dalším závažným onemocněním je verciliové vadnutí způsobené již zmíněnou houbou *Verticillium dahliae*. Většina hub tvoří spory, které se snadno šíří větrem či deštěm. Přežívají i v půdě, šíří se živočišnými vektory a do rostlin vstupují ranami po mechanickém poškození, ale i průduchy a někdy i pokožkou (Klosterman *et al.*, 2009).

### **3.1.3. Virové choroby lilku bramboru**

Virové choroby bývají nejzávažnější. Patří mezi ně těžká mozaika a kadeřavost listů působená PVY (Potato virus Y) a virová svinutka bramboru způsobená PLRV (Potato leafroll virus), které napadají listy a tím snižují výnos, a dále zduřelá nekrotická kroužkovitost hlíz způsobená PVY-NTN (N-tuber necrotic, kmen viru PVY), která napadá přímo hlízy. Tito vnitrobuněční parazité jsou přenášeni většinou živočišnými vektory (např. mšicemi, roztoči a háďátky), nebo vstupují do rostlinných buněk ranami po mechanickém poškození. V rostlině se poté rozšiřují floémem (Leromancer & Kerlan, 1991).

## **3.2. OBRANNÉ MECHANIZMY ROSTLIN PROTI ŠKŮDCŮM**

Rostliny mají přirozené mechanismy, kterými se brání patogenům. Pasivní ochranu proti bakteriím a houbám představuje např. kutikula, druhotná kůra (periderm), proti hmyzu a živočišným škůdcům např. trny, trichomy a ostny (Herms & Mattson, 1992). Rostliny mají také komplexní mechanismy, kterými se patogenům brání aktivně,

přítomné v každé své živé buňce, a/nebo mechanismy, kterými tato buňka dokáže vyvolat odpověď v celém rostlinném organismu. Mají také systémovou paměť k patogenu trvající až několik týdnů. Tyto mechanismy mohou být konstitutivní nebo inducibilní (Hammond-Kosack & Jones, 1997). Sekundární metabolity se řadí do obou kategorií. Proti patogenním mikroorganismům a herbivorním živočichům rostliny často chrání toxické sekundární metabolity: terpeny, fenolické látky (flavonoidy), dusíkaté sloučeniny jako jsou alkaloidy (u brambor především známý glykoalkaloid solanin, potencionálně jedovatý pro člověka) a glukosinoláty (Herms & Mattson, 1992), dále pak heterogenní glykosidy (kyanogenní glykosidy, saponiny), fytoalexiny a lektiny. Produkce sekundárních metabolitů může být buď konstitutivní, nebo indukovaná až ve chvíli, kdy patogen rostlinu napadne. V tu chvíli se může spouštět i produkce jiných obranných látek (např. proteinů lektinů a inhibitorů proteáz (Hildmann *et al.*, 1992). Signální dráhy pro produkci těchto i dalších látek, důležitých pro obrannou reakci rostliny, jsou ovlivňovány rostlinnými hormony kyselinou jasmonovou, kyselinou salicylovou, kyselinou abscisovou a ethylenem, které se také ovlivňují vzájemně, takže např. dráha spouštěná kyselinou jasmonovou a dráha spouštěná kyselinou salicylovou mohou působit antagonisticky (Hildmann *et al.*, 1992, Kessler & Baldwin, 2002).

Hypersenzitivní reakce patří mezi časné lokální reakce. Spouští se ihned po napadení rostliny patogenem. Slouží k zabránění rozšíření patogenu formací zóny mrtvých buněk okolo místa napadení (Greenberg, 1997, Heath, 2000). Dá se tedy předpokládat, že tato strategie je úspěšná především proti biotrofním patogenům. Hypersenzitivní reakci často předchází rychlé nahromadění reaktivních forem kyslíku (Reactive Oxygen Species, ROS) a NO (oxidu dusnatého) v místě napadení. ROS a NO společně aktivují hypersenzitivní reakci. ROS navíc přímo intoxikují patogena (Lamb & Dixon, 1997). Patří mezi ně kyslíkový radikál ( $O_2^{\cdot-}$ ) a z něj se tvoří hydroxid vodíku ( $H_2O_2$ ) a hydroxylový radikál ( $HO\cdot$ ). Např.  $H_2O_2$  spouští jednak vzájemné propojování strukturních proteinů bohatých na prolin v buněčné stěně (Bradley *et al.*, 1992) a jednak programovanou buněčnou smrt jedné nebo více buněk v místě napadení rostliny patogenem (Levine *et al.*, 1994).

Po hypersenzitivní reakci se může aktivovat signální dráha pro systémově získanou rezistenci (SAR, Systemic Acquired Resistance), která spouští produkci proteinů a fytoalexinů spojených s posílením buněčné stěny a zajišťuje tak systémovou



rezistenci na různých úrovních (Ryals *et al.*, 1996). SAR je řízena především kyselinou salicylovou. Při spouštění SAR u bramboru hraje významnou roli protein systemin. Je analogický k systeminu rajčete i jiných zástupců rodu *Solanaceae* a indukuje produkci inhibitorů proteáz (Pearce *et al.*, 1991). Proteinům, jejichž produkci SAR spouští, se říká patogenesis-related (PR) proteiny. Jsou to především hydrolytické enzymy, mezi něž patří např. 1,3- $\beta$ -glukanáza, chitináza, peroxidázy a inhibitory proteáz (Vanloon, 1985). O inhibitorech proteáz je podrobněji pojednáno dále.

Reakce rostliny s patogenem se nazývá kompatibilní, pokud u rostliny dojde k projevu infekce. Naopak nekompatibilní se nazývá v případě, kdy z různých důvodů k infekci nedochází. To, zda je rostlina náchylná k infekci nebo rezistentní záleží na mnoha interakcích mezi rostlinou a patogenem na molekulární úrovni, přičemž tyto interakce jsou vždy jedinečné, lišící se mechanismem, lokalizací i časovým rozvržením obranných reakcí. Schopnost rostliny rozeznat patogena je zásadní pro to, zda rostlina bude napadena či nikoliv (Heath, 1991).

Rostlina je rezistentní ve chvíli, kdy je pro patogen nehostitelská, anebo je hostitelská, ale má geny rezistence (*R* geny). Produkty hostitelské rostliny reagují s molekulami patogenu a hrají tak klíčovou roli při jeho rozpoznávání. Tato molekula může být buď nespecifický elicitor (např. fragmenty buněk patogenu nebo poškozené rostlinné buňky (Blumwald *et al.*, 1998), nebo produkt *Avr* genu (genu avirulence). Podle teorie „gen proti genu“ je reakce *R* genů s *Avr* geny vysoce specifická: rostlina rezistentní vůči určitému patogenu obsahuje specifický *R* gen odpovídající specifickému *Avr* genu patogena (Schmelz *et al.*, 2009). Např. *R1* gen bramboru izolovaný v roce 2001 rozeznává patotyp 1 houbového patogenu *P. infestans* (Hammond-Kosack & Parker, 2003). *R* geny jsou zpravidla dominantní, někdy semi-dominantní (Lauge *et al.*, 1998). *R* geny napříč rostlinnou říší jsou si velice podobné, a lze tedy říci, že základní princip rozeznávání patogenů a signalizace obranných mechanismů zůstaly navzdory evoluci konzervované. Důležitou roli zde hrají signální transdukční kaskády. *R* geny jsou vysoce polymorfní. Patří sem proteiny fungující na všech úrovních signálních kaskád: receptory, přenašeči signálů i efekторы (Dangl & Jones, 2001). Nejčastěji se jedná o proteiny se strukturou obsahující doménu vážící se do jádra (NB, Nucleotide Binding) a doménu bohatou na leucin (LRR, Leucine Rich Repeats), často se proto nazývají „NB-LRR *R* geny“. NB doména váže ATP nebo GTP. LRR doména často interaguje s jinými proteiny nebo váže ligand. NB-LRR *R* geny se mohou dále

dělit na TIR-NB-LRR (Toll-like Interleukin 1 Receptor) a CC (Coiled-Coil, Meyers *et al.*, 2003). Méně často se jedná o transmembránové serin/threoninové protein-kinázy nebo extracelulární LRR proteiny s jednou transmembránovou doménou, což může ukazovat mimo jiné na jejich schopnost inhibovat enzymy patogenů degradující buněčnou stěnu rostlin (Hammond-Kosack & Parker, 2003). LRR domény jsou v rámci *R* genů vysoce proměnlivé, což naznačuje, že právě tato doména hraje roli při rozeznávání specifických *Avr* genů (Ellis *et al.*, 1999, Dodds *et al.*, 2001). Teorie „gen proti genu“ je charakteristická pro obligátní parazity. U fakultativních patogenů je zpravidla patogenita založena polygenně (Hammond-Kosack & Jones, 1997).

Patogeny jsou schopny překonat rezistenci rostliny díky změnám ve frekvenci alel *Avr* genů v populaci a evoluci těchto genů. Podobně se v čase mění *R* geny rostlin. Většina *R* genů je součástí multigenových rodin. *R* geny bývají uspořádány do velkých souborů, které utvářejí komplexní lokusy. Takové uspořádání je vhodným substrátem pro časté rekombinace, což zvyšuje pravděpodobnost špatného párování, intra- a intergenetické rekombinace a zdvojení genů. Na produkty takových změn může působit selekce a geny se mohou vyvíjet (Baker *et al.*, 1997).

### **3.3. STRATEGIE BOJE SE ŠKŮDCI A PATOGENY LILKU BRAMBORU**

#### **3.3.1. Chemická ochrana**

Chemická ochrana v podobě pesticidů zatím hraje v boji proti patogenům a škůdcům hlavní roli, především v boji proti houbovým patogenům. Je však velmi nákladná a hlavně zatěžuje životní prostředí a zdraví lidí (Derksen *et al.*, 2013). Je proto vhodné hledat alternativní řešení.

#### **3.3.2. Biologická ochrana**

Při biologické ochraně rostlin vůči patogenům je nejdůležitější prevence. To zahrnuje například výběr takové lokality pro pěstování rostliny, kde se daná choroba nevyskytuje (kde není přítomné inokulum) a zabránění tomu, aby inokulum vzniklo.

V případě že se tak stane, je nutné omezit jeho dopady na takovou míru, která by pro kvalitu produktu byla únosná z hlediska výnosu, přičemž cílem není patogena zničit. V geografických polohách s dostatečnou intenzitou slunečního záření se pro dezinfekci půdy a prevenci infekcí používá tzv. solarizace půdy, která však bývá účinná i v mírném klimatu. Na půdu zakrytou zpravidla polyethylenovou fólií se po dobu až 4 týdnů nechá působit sluneční energie, která je schopna zvýšit teplotu pod fólií až na 60 °C, čímž se půda desinfikuje. Byla prokázána výrazná redukce napadení brambor patogeny způsobujícími strupovitost brambor (*S. scabies*), vločkovitost bramboru (*R. solani*) a verticiliové vadnutí (*V. dahliae*, Davis & Sorensen, 1986). Biologická ochrana však může být i zaměřena vůči určitému patogenu. Např. pomocí tzv. zeleného hnojení, při kterém se do půdy zapravuje biomasa rostlin pěstovaných za tímto účelem. Bylo úspěšně dosaženo zmírnění příznaků verticiliového vadnutí lilku bramboru pomocí zapravení biomasy čiroku súdánského, kukuřice a dalších rostlinných druhů do půdy, ve které byl brambor pěstován (Davis *et al.*, 1996).

Biologickou ochranou v užším slova smyslu se rozumí využití živých organismů či jejich produktů v boji s patogeny. Takovým organismům či produktům se říká bioagens (biological control agents, BCAs). Nejznámější jsou přípravky obsahující toxiny různých kmenů bakterie *Bacillus thuringiensis*, které se používají na obranu rostlin především proti druhům z řádů motýlů, dvoukřídlých a brouků (Schnepf *et al.*, 1998). Mezi nejnovější úspěchy v tomto směru patří např. použití bakterie *Pseudomonas syringae* (kmenů ESC-10 a ESC-11) pro částečnou ochranu skladovaných brambor před infekcí *H. solani* a *F. sambucinum* (Al-Mughrabi *et al.*, 2013).

Vzhledem k vzrůstající obavě z používání pesticidů se tyto nové metody biologické ochrany dostávají do popředí zájmu. Je však potřeba je dále testovat, než se začnou běžně používat jako prostředek k ochraně rostlin proti patogenům (Derksen *et al.*, 2013).

### **3.3.3. Klasické šlechtění**

Po dobu delší než 10 000 let probíhalo šlechtění selekcí pozitivní (vybírání jedinců, kteří byli nejživotaschopnější nebo měli určité znaky) nebo selekcí negativní

(eliminace jedinců neživotaschopných či s nevhodnými znaky). Lilek brambor byl domestikován před 4 až 5 tisíci lety na území Jižní Ameriky pozitivní selekcí na velké hlízy a malý obsah toxických glykoalkaloidů. Během domestikace často docházelo k pozitivní selekci spontánně vzniklých polyploidů, neboť ti mívají větší orgány. Přírozená genetická variabilita a rychlost vzniku mutací jsou omezené, a proto se ve 20. století v souladu s novými vědeckými objevy začalo využívat účinků ionizujícího záření, chemikálií a teplot, které vyvolávají mutace, a zvýšená variabilita či polyploidie se tak začala vyvolávat uměle. Polyploidie může být navíc dosaženo i vzdáleným křížením rostlin patřících k různým druhům či rodům (tzv. mezidruhovému nebo mezirodovému křížení neboli hybridizaci). Mezidruhovým křížením vzniklo např. *Triticale* (Akhond & Machray, 2009).

Lilek brambor má přibližně 200 divokých příbuzných druhů. Tyto druhy mají různou ploidií (2n až 6n). Představují obrovský potenciál alelické diverzity, čehož se využívá v mezidruhovém křížení (v rámci rodu *Solanum*), např. pro získání rezistencí k chorobám (Hijmans & Spooner, 2001). Využívají se především druhy *S. demissum*, *S. acaule*, *S. spegazzinii*, *S. stoloniferum* a *S. chacoense* (Tan *et al.*, 2010). Klasické šlechtění hrálo důležitou roli např. při boji s plísní *P. infestans*, jedním z nejrozšířenějších patogenů bramboru na světě. Ve 20. století byly šlechtěny odolné kultivary brambor pomocí křížení s divokým příbuzným druhem, *S. demissum*, a následné série zpětných křížení vzniklých hybridů z F1 generace s kulturním bramborem. Takto vzniklí kříženci obsahovali  $R_{pi}$  geny *R1*, *R2*, *R3*, *R4* a *R10* a byli rezistentní vůči *P. infestans*. Patogen však několik let po uvedení kultivaru na trh rezistenci překonal (Turkensteen, 1993). Ztráta rezistence získané křížením *S. tuberosum* s divokými příbuznými za účelem vnesení *R* genů byla pozorována opakovaně. V současnosti se proti ní bojuje především pomocí fungicidů. Toto řešení je pro farmáře jednak drahé a zamožuje životní prostředí a jednak existuje zde již zmíněné riziko vzniku rezistence patogenu na aplikovaný fungicid (Song *et al.*, 2003).

Tzv. pyramidování genů je vhodný způsob, jak do genotypu rostliny dostat více *R* genů a obejít tak možný vznik rezistence, za předpokladu, že je rezistence kódovaná jedním genem (Nelson 1972). Jedná se o soustředění více *R* genů do jednoho rostlinného genotypu. Metodami klasického šlechtění tak byly vyšlechtěny kultivary bramboru Pentland Dell (1961) či Escort (1982). Tan *et al.* (2010) vnesli pomocí tzv. pyramidování genů dva *R* geny pro rezistenci vůči *P. infestans* ( $R_{pi-mcd1}$  a  $R_{pi-ber}$ )

z nekultivovaných odrůd bramboru do *S. tuberosum* a při analýze odolnosti vzniklých kultivarů pozorovali aditivní efekt. To podle nich předznamenává, že pyramidování genů by mohla být cesta vedoucí k vývoji kultivarů brambor vykazujících rezistenci srovnatelnou s rezistencí nehostitelských rostlin.

V plodinách, které byly šlechtěny na rezistenci klasickým šlechtěním, nebo v plodinách přirozeně rezistentních lze tedy ve vysoké míře nalézt výše zmíněné *R* geny. Klasické šlechtění však naráží na limity, například proto, že některé *R* geny jsou alelické, takže maximální množství alel takových genů v rostlině je určeno její ploidii. Navíc klasický způsob šlechtění bramboru je velmi pomalý a obtížný. Obnáší výše zmíněné křížení rostlin, následované odvozením klonů, selekcí rostlin na základě fenotypu a opakovaná zpětná křížení a může proto trvat až 15 let (Bradshaw & Mackay, 1994). Řešení problému časové náročnosti i omezení ploidii rostliny nejen při pyramidování genů může nabídnout genové inženýrství.

#### **3.3.4. Genové inženýrství**

V současnosti se naděje i obavy vkládají do metod genového inženýrství, které umožňují přímé vnášení vybraných genů či malých skupin genů do genomu cílového organismu. Geneticky modifikované rostliny je možné dělit na *cis*-genní (vnesen gen/geny z druhu, se kterým se rostlina přirozeně může křížit v přírodě nebo tradičním šlechtěním) a *trans*-genní (vnesen gen/geny z druhu, se kterým se rostlina křížit nemůže, Schouten *et al.*, 2006). Počátek genového inženýrství můžeme datovat do 70. let 20. století, kdy byl připraven první bakteriální plazmid pro transformaci (Cohen *et al.*, 1973). Vnesení plazmidu s vloženým genem do rostlinné buňky se podařilo roku 1977 (Chilton *et al.*, 1977). Pro rostliny se technik genového inženýrství začalo hojně využívat až po bližším poznání mechanismu transformace rostlinných buněk pomocí *A. tumefaciens* v roce 1983 (Hoekema *et al.*, 1983, Klee *et al.*, 1983). Vytvoření plodin s endogenní rezistencí k hmyzím patogenům a jejich uvedení na trh v roce 1996 bylo považováno za obrovský úspěch. Jednalo se o *Bt* plodiny (plodiny s vneseným genem kódujícím endotoxin pocházející z bakterie *B. thuringiensis*), konkrétně o kukuřice, brambor a bavlník (Ferry *et al.*, 2004).

Použití genového inženýrství pro modifikaci za účelem zvýšené rezistence brambor vůči patogenům zatím z různých důvodů nepřineslo trvalé výsledky. První kultivar geneticky modifikovaného bramboru na světě byl uveden na trh v roce 1994 v USA. Byl to kultivar „NewLeaf“ s vloženým genem *cry3A* z *Bacillus thuringiensis* pro rezistenci vůči mandelince bramborové. Ve stejném roce následoval kultivar „NewLeaf Y“ s vloženým genem *cry3A* z *B. thuringiensis* a genem pro obalový protein viru PVY, rezistentní vůči mandelince bramborové i PVY. V roce 1998 kultivar „NewLeaf Plus“ rezistentní vůči mandelince bramborové a viru svinutky bramboru (PLRV). Všechny tyto kultivary byly určeny pro lidskou spotřebu. Po několika letech však byly z trhu staženy pro údajný nezájem spotřebitelů (Reed *et al.*, 2001, Akhond & Machray, 2009).

Jedna z cest pro zvyšování rezistence je již zmíněné využití genů kódujících typy molekul rostlinám vlastní při obranných reakcích. U lilku bramboru bylo provedeno mnoho takových pokusů. Vnesením genu pro oxidázu glukózy do brambor bylo např. dosaženo zvýšené hladiny  $H_2O_2$  v listech i hlízách a díky tomu se u rostlin projevila silná rezistence vůči *E. carotovora* subsp. *carotovora* a zvýšená rezistence vůči *P. infestans* (Wu *et al.*, 1995). Inhibitory proteáz, byly pro zvyšování rezistence pomocí genového inženýrství využity již v 80. letech 20. století. Hilder *et al.* (1987) vnesl gen z fazole viona (*Vigna unguiculata*) kódující trypsinový inhibitor do tabáku a modifikované rostliny v polních testech ukázaly rezistenci vůči jim vlastním hmyzím patogenům. Techniky genového inženýrství pro pyramidování genů inhibitorů proteáz využili také Santamaria *et al.* (2012), kteří vnesli do *Arabidopsis thaliana* dva geny z ječmene kódující proteázové inhibitory a docílili tím zvýšené odolnosti vůči svilušce chmelové.

#### **3.3.4.1. Inhibitory serinových proteáz**

Právě inhibitory proteáz patří u rostlin pravděpodobně k nejznámějším PR proteinům, které slouží rostlinám jako obranný mechanismus (Parent & Asselin, 1984). Váží se do aktivního místa proteáz, čímž inhibují jejich aktivitu, a tedy schopnost patogenů a škůdců využít živiny z rostlinných pletiv. Jeden z mnoha takových genů u bramboru je např. *pin2* (proteinase inhibitor II, Hildmann *et al.*, 1992).

Bylo prokázáno, že hmyzí škůdci jsou rezistenci schopni eventuelně překonat. V pokusech se to projevilo přírůstkem hmotnosti u hmyzu krmeného rostlinami transformovanými proteázovými inhibitory (McManus *et al.*, 1994, DeLeo *et al.*, 1998). Bown *et al.* (1997) poprvé popsali mechanismus, jakým hmyzí škůdce překonává rezistenci k rostlinným inhibitorům proteáz. Byly zkoumány proteázy přítomné v zažívacím traktu černopásky bavlníkové (*Helicoverpa armigera*), která také napadá brambory. Ukázalo se, že při krmení škůdce potravou s inhibitory proteáz začal tento škůdce produkovat jiné proteázy, necitlivé k inhibitoru. Vnášení genů pro inhibitory proteáz z organismů fylogeneticky co nejvíce vzdálených od hostitelských rostlin jednotlivých škůdců by teoreticky mohlo oddálit vznik této rezistence u škůdců.

#### **3.3.4.2. Gen SPI-2**

SPI-2 se řadí mezi inhibitory serinových proteáz, což jsou proteázy se serinem v aktivním centru. Patří mezi ně např. lidské enzymy trypsin, chymotrypsin, elastáza, serinová karboxypeptidáza II, proteáza A a protein C. Mezi bakteriální serinové proteázy patří např. subtilisin a pronáza, z houbových je to proteináza K. Jsou široce rozšířené v rostlinné i živočišné říši (Nirmala *et al.*, 2001). Jelikož se pořadí aminokyselinových zbytků mezi skupinami serinových proteáz mnohdy velmi liší, soudí se, že vznikly konvergentní evolucí. Homologie v aktivních místech však svědčí pro to, že mají všechny stejný katalytický mechanismus (Rawling & Barret, 1993).

Gen SPI-2 pochází ze zavíječe voskového (*Galleria mellonella*). Protein SPI-2 je vylučován jeho larvami spolu s hedvábnými vlákny. Larvy zavíječe se živí včelím voskem a v plástech zanechávají chodbičky vystlané hedvábnými vlákny, které inhibitor SPI-2 chrání proti mikrobiální degradaci. Bylo prokázáno, že SPI-2 inhibuje bakteriální proteázy (subtilisin, pronáza) i houbové proteázy (proteináza K). Protein SPI-2 byl izolován z hedvábných vláken a poté sekvenován pomocí N-terminálního sekvenování. RNA byla připravená ze žláz produkujících hedvábná vlákna. Příslušný gen byl následně izolován z cDNA pomocí degenerovaných primerů (Nirmala *et al.*, 2001).

## 4. MATERIÁL A METODY

### 4.1. BIOLOGICKÝ MATERIÁL

#### 4.1.1. Bakterie

##### 4.1.1.1. Příprava kompetentních buněk *E. coli*

Bakterie *Escherichia coli* (dále *E. coli*), kmen DH5 $\alpha$  (Sambrook *et al.* 1989), byly použity pro namnožení plazmidů při přípravě genových konstruktů.

Bakterie *E. coli* byly zaočkovány na pevné LB médium (Tabulka 4.1) a kultivovány při 37 °C přes noc. Jedna až tři samostatné kolonie byly zaočkovány do 50 ml tekutého LB média a aerobně kultivovány při 37 °C přes noc (160 ot./min). 5 ml suspenze bylo přeneseno do 200 ml tekutého LB média (Tabulka 4.1) a dále probíhala aerobní kultivace při 37 °C do optické hustoty (O.D.) 0,4 (600 nm, kyveta 1 cm). Poté byla suspenze 15-30 minut chlazena na ledu za občasných promíchání. Další kroky probíhaly při teplotě blízké 0 °C. Suspenze byla přenesena do centrifugačních kyvet a centrifugována (4° C, 1800 g, 10 min). Sediment byl postupně resuspendován a bakterie následně opět sedimentovány ve 400 ml a 200 ml vychlazené destilované vody a v 10 ml sterilního vychlazeného 10% glycerolu. Výsledný sediment byl resuspendován v 800  $\mu$ l vychlazeného GYT média (Tabulka 4.2). Byla změřena O.D. (600 nm, kyveta 1 cm) suspenze naředěné v poměru 1:100. Podle výsledné O.D. byla suspenze naředěna na koncentraci  $2 \times 10^{10}$  až  $3 \times 10^{10}$  buněk/ml GYT médiem (při O.D. = 1,0 je koncentrace  $\sim 2,5 \times 10^8$  buněk/ml). Suspenze bakterií byla pipetována po 40  $\mu$ l do mikrozkuvek, které byly zmrazeny v tekutém dusíku a dále uchovávány při  $-80$  °C.

Tabulka 4.1: Složení pevného i tekutého LB média používaného při kultivaci bakterií.

Pevné		Tekuté		Sterilizace
Složka	Koncentrace	Složka	Koncentrace	
pepton (trypton)	10 g/l	pepton (trypton)	10 g/l	v autoklávu
kvasničný extrakt	5 g/l	kvasničný extrakt	5 g/l	
NaCl	10 g/l	NaCl	10 g/l	
agar	17,5 g/l	agar	-	



**Tabulka 4.2:** Složení GYT média používaného při kultivaci bakterií.

Složka	Koncentrace/množství	Sterilizace
100% glycerol	100 ml/l	filtrací (0,22 µm)
Kvasničný extrakt	1,25 mg/l	
Pepton (trypton)	2,5 mg/l	

#### 4.1.1.2. Elektroporace *E. coli*

Elektroporace byla použita k transformaci bakterií. Mikrozkuhavka s kompetentními buňkami *E. coli* byla umístěna na led. K suspenzi buněk byly přidány 3 µl odsolené ligační směsi (případně cca 10 ng přečistěného plazmidu) a směs byla 1 minutu inkubována na ledu. Poté byla přenesena do elektroporační kyvety a sklepnuta na její dno. Kyveta byla přenesena do elektroporátoru (Bio-Rad Gene Pulser Apparatus) a byl aplikován elektrický puls (25 µF; 2,5 kV; 200 Ω). Následně byla suspenze vypláchnuta z kyvety jedním ml SOC média (Tabulka 4.1) a přenesena do sterilní zkumavky s bakteriologickou zátkou. V ní byly bakterie aerobně kultivovány 1 hodinu při 37 °C a poté byla část či vše vyseto na pevné LB médium (Tabulka 4.1) s kanamycinem (Tabulka 4.4).

**Tabulka 4.3:** Složení SOC média, YEB-recovery média a YEB média používaných při kultivaci bakterií.

Složka	SOC médium	YEB-recovery médium	YEB médium	Sterilizace
	Koncentrace	Koncentrace	Koncentrace	
pepton (trypton)	20 g/l	10 g/l	10 g/l	filtrací (0,22 µm)
kvasničný extrakt	5 g/l	1 g/l	1 g/l	
glukóza	3,6 g/l	-	-	
sacharóza	-	5 g/l	5 g/l	
NaCl	0,58 g/l	5,8 g/l	-	
KCl	0,186 g/l	1,86 g/l	-	
MgCl <sub>2</sub>	0,95 g/l	9,5 g/l	-	
MgSO <sub>4</sub>	1,2 g/l	12 g/l	2 g/l	

Tabulka 4.4: Standardní koncentrace antibiotik v médiích a jejich příprava.

Antibiotikum	Zásobní roztok	Standardní koncentrace v médiích	Sterilizace
kanamycin	50 mg/ml destilované vody	50 mg/l	filtrací (0,22 µm)
rifampicin	10 mg/ml methanolu	100 mg/l	není nutná
gentamycin	25 mg/ml destilované vody	25 µg/ml	filtrací (0,22 µm)
claforan (taxcef, cefotaxime)	100 mg/ml destilované vody (sterilní)	300 mg/l	není nutná (sterilní prášek)

#### 4.1.1.3. Příprava kompetentních buněk *A. tumefaciens*

Pro transformaci lilku bramboru i tabáku byly používány bakterie *Agrobacterium tumefaciens* (dále *A. tumefaciens*) kmen C58C1. Tento kmen obsahuje plazmid *pGV2260* s *vir* geny, jejichž produkty umožňují přenos *T-DNA* (Deblaere *et al.*, 1985).

Bakterie *A. tumefaciens* byly zaočkovány na pevné LB médium (Tabulka 4.1) s rifampicinem (Tabulka 4.4) a kultivovány při 28 °C po dobu 3 dnů. Jedna až tři samostatné kolonie byly zaočkovány do 10 ml tekutého LB média a aerobně kultivovány při 28 °C přes noc (160 ot./min). 10 ml suspenze bylo přeneseno do 400 ml tekutého LB média (předem temperovaného na 28 °C) a dále probíhala aerobní kultivace při 28 °C do O.D. 0,6 (600 nm, kyveta 1 cm). Poté byla suspenze 15-30 minut chlazená na ledu za občasných promíchání. Další kroky probíhaly při teplotě blízké 0 °C. Suspenze byla přenesena do centrifugačních kyvet a centrifugována (4 °C, 1800 g, 10 min). Sediment byl postupně resuspendován a bakterie byly následně opět sedimentovány ve 400 ml a 200 ml vychlazené destilované vody a v 10 ml vychlazeného sterilního 10% glycerolu. Výsledný sediment byl resuspendován v 800 µl 10% glycerolu. Byla změřena O.D. (600 nm, kyveta 1 cm) suspenze naředěné v poměru 1:100. Podle výsledné O.D. byla suspenze naředěna na koncentraci  $2 \times 10^{10}$  až  $3 \times 10^{10}$  buněk/ml 10% glycerolem (při O.D. = 1,0 je koncentrace  $\sim 2,5 \times 10^8$  buněk/ml). Suspenze bakterií byla rozpipetována po 100 µl do mikrozkušavek, které byly zchlazeny v tekutém dusíku a dále uchovávány při -70 °C.

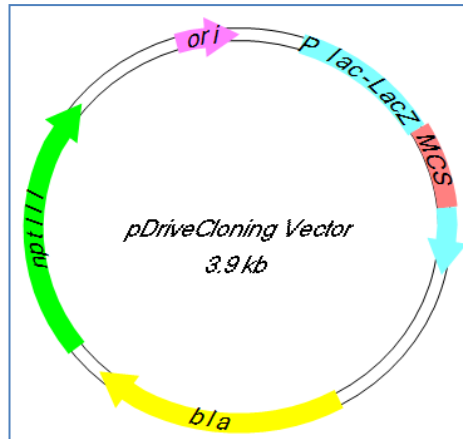
#### 4.1.1.4. Elektroporace *A. tumefaciens*

Mikrozkumavka s kompetentními buňkami *A. tumefaciens* byla umístěna na led. K suspenzi buněk bylo přidáno cca 0,1 µg přečištěného plazmidu (maximálně 5 ml) a směs byla 1 minutu inkubována na ledu. Poté byla přenesena do elektroporační kyvety a sklepnuta na její dno. Kyveta byla přenesena do elektroporátoru (Bio-Rad Gene Pulser Apparatus) a byl aplikován elektrický puls (25 µF; 2 kV; 200 Ω). Následně byla suspenze vypláchnuta z kyvety 1 ml YEB-recovery média (Tabulka 4.3) a přenesena do sterilní zkumavky s bakteriologickou zátkou. V ní byly bakterie kultivovány 3 hodiny při 28 °C a poté byla část či vše vyseto na pevné LB médium s kanamycinem a rifampicinem (Tabulka 4.4).

#### 4.1.2. Vektory

##### 4.1.2.1. *pDrive Cloning Vector*

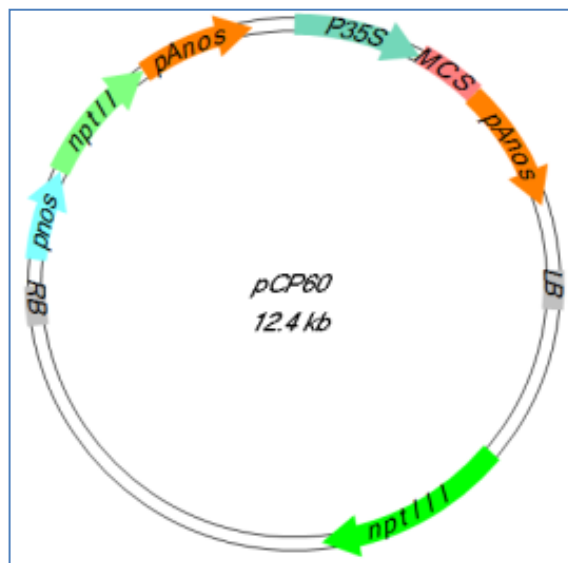
Vektor *pDrive Cloning Vector* (dále *pDCV*, Obrázek 4.1) je obsažen v kitu pro TA klonování PCR fragmentů (QUIAGEN PCR Cloning Kit) v linearizované formě s přesahujícími uridiny. Vektor obsahuje klonovací místo (multiple cloning site, *MCS*). Před *MCS* je laktózou či IPTG indukovatelný promotor  $P_{lac}$  s genem *LacZ* pro  $\alpha$ -peptid *LacZ*, který je využíván při modro-bílé selekci plazmidů s inzercí. Do *MCS* byly pomocí TA klonování vloženy geny *SPI-2* upravené pomocí PCR. Vektor také nese gen *nptIII* pro rezistenci vůči kanamycinu a gen *bla* pro rezistenci vůči ampicilinu.



**Obrázek 4.1:** Plazmid *pDCV* (*pDrive Cloning Vector*) o velikosti 3,9 kb, do kterého byly pomocí TA klonování vkládány geny. Plazmid byl poté elektroporací vnášen do *E. coli*.

#### 4.1.2.2. *pCP60*

*pCP60* (laskavě poskytl Dr. Ratet, Obrázek 4.2) je binární vektor pro množení v *E. coli* a *A. tumefaciens* nesoucí *T-DNA* kazetu s MCS mezi 35S promotorem (z viru kvěťákové mozaiky) a *pAnos* (nopalín syntázovým terminátorem z *A. tumefaciens*) a genem *nptIII* (kódujícím neomycin fosfotransferázu) pro selekci transformovaných rostlinných buněk díky rezistenci vůči kanamycinu. Vektor *pCP60* obsahuje také gen *nptIII*, který rezistenci vůči kanamycinu poskytuje bakteriím.



**Obrázek 4.2:** Plazmid *pCP60*, binární vektor, používaný pro množení v *E. coli* a *A. tumefaciens*. Obsahuje MCS mezi promotory 35S a *pAnos*.

### 4.1.3. Rostliny

#### 4.1.3.1. Kultivace tabáku

Semena tabáku *Nicotiana benthamiana* (dále *N. benthamiana*) byla zaseta na rašelinové brikety a rostliny byly pěstovány při fotoperiodě 16 hodin světla a 8 hodin tmy, při ozáření 120 W·m<sup>-2</sup>. Na jedné briketě rostly 4 rostliny. Ve stáří 2 týdnů byly rostliny i s briketami přeneseny do květináčů o průměru 10 cm.

#### 4.1.3.2. Transformace tabáku

*N. benthamiana* se běžně používá pro navození transientní transformace agroinfiltrací (infiltrací *A. tumefaciens*), díky které je možné dosáhnout exprese vneseného genu za relativně krátký čas (Mokrzycki-Issartel et al, 2003).

Do 2 ml MPB média (25 g/l Živného bujónu č.2, Imuna) s kanamycinem a rifampicinem (Tabulka 4.4) byla zaočkována jedna kolonie *A. tumefaciens* transformovaného genem *SPI-2-T*. Do dalších 2 ml MBP média s kanamycinem, rifampicinem a gentamicinem byla zaočkována jedna kolonie *A. tumefaciens* transformovaného genem *p19* pro virový supresor RNA silencingu (Voinnet *et al.*, 1999). Kultury byly pěstovány aerobně (160 ot./min) při 28 °C přes noc do stacionární fáze. 1 ml každé kultury byl centrifugován (1800 g, 5 min), peleta promyta 1 ml infiltračního média (Tabulka 4.5), znovu centrifugován za stejných podmínek a resuspendován v 0,5 ml infiltračního média s příslušnými antibiotiky pro každý ze dvou konstruktů. Byla změřena O.D. (600 nm, kyveta 1 cm) 50× zředěné suspenze. Suspenze byly smíchány a naředěny infiltračním médiem tak, aby O.D. konstruktu *SPI-2* odpovídala 0,03 a O.D. konstruktu *p19* odpovídala 0,05.

Agroinfiltrací byly transformovány dobře vyvinuté listy 5 týdnů starých rostlin. Listy byly přibližně 1 hodinu před infiltrací intenzivně osvětleny, aby se průduchy plně otevřely. Směs pro agroinfiltraci byla nabrána do 1 ml injekční stříkačky bez jehly, která byla následně opřena o list z abaxiální strany a směs byla pomalu vtlačena do listu

s protioporou ruky v latexové rukavici. Vzorčky infiltrovaných listů byly sklizeny ve dvoudenních intervalech (2., 4. a 6. den).

**Tabulka 4.5:** Složení infiltračního média (používané pro infiltraci tabáku).

Složka	Koncentrace	Pozn.	Sterilizace
MES	50 mM	pH 5,6	není nutná (při okamžitém použití)
Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	2 mM	-	
glukóza	0,5 %	-	
acetosyringon	100 μM	-	

#### 4.1.3.3. Kultivace bramboru

Pro práci byly použity rostliny lilku bramboru *Solanum tuberosum* L. cv. *Désirée* pocházející z Agricultural Biotechnology Center v Gödöllő v Maďarsku.

Rostliny byly kultivovány v *in vitro* podmínkách na pevném LS médiu (Linsmayer & Skoog, 1965) s přidavkem 3% sacharózy (Tabulka 4.6), při fotoperiodě 16 hodin světla a 8 hodin tmy, teplotě 22-24 °C a ozáření 120 W·m<sup>-2</sup>. Pro množení se používaly vrcholové či nodální stonkové segmenty.

**Tabulka 4.6:** Složení LS média používaného pro kultivaci lilku bramboru.

Složka	Koncentrace	Úprava pH	Sterilizace
MS soli (Sigma)	4,33 g/l	pH 5,8 před přidáním agaru	v autoklávu
sacharóza	30 g/l		
inositol	0,1 g/l		
kasein	1 g/l		
vitamín B1 (thiamin)	0,1 mg/l		
vitamín B6 (pyridoxin)	0,1 mg/l		
kyselina nikotinová	0,5 mg/l		
glycin	3 mg/l		
agar	8 g/l	-	

#### 4.1.3.4. Transformace bramboru

Pro transformaci byly použity rostliny 4 týdny staré, narostlé *in vitro* z vrcholových segmentů. Ze středních částí rostlin byly odříznuty tmavě zelené listy přibližně stejné velikosti. Žiletkou v peánu byly provedeny 2 řezy přes střední žilku vedené ze spodní strany každého listu položeného svrchní stranou na polystyrenové Petriho misce. Listy byly poté položeny svrchní stranou na hladinu tekutého 2MS média (Tabulka 4.7). Každá Petriho miska o průměru 9 cm obsahovala 20 ml 2MS média. Po položení listů na médium bylo do média v každé Petriho misce přidáno 100  $\mu$ l čerstvě narostlé suspenze *A. tumefaciens* transformovaného genem *SPI-2*. Po dobu dvou dní probíhala kokultivace listů s *A. tumefaciens* ve tmě při pokojové teplotě. Poté byly listy osušeny položením na sterilní filtrační papír a přeneseny na pinzetou rozmělněné CIM médium (Tabulka 4.7) s přidavkem rostlinných hormonů a antibiotik kanamycinu a claforanu (Tabulka 4.4), tak, aby listy přiléhaly celou svrchní stranou na médium. Kultivace probíhala při fotoperiodě 16 hodin světla a 8 hodin tmy, teplotě 22 - 24 °C a ozáření 120 W·m<sup>-2</sup>. Po sedmi dnech byly listy přeneseny na pinzetou rozmělněné SIM médium (Tabulka 4.7) a každých 7 dní byly přeneseny na čerstvé SIM médium. Prýty regenerujících rostlin byly odřezávány žiletkou upevněnou v peánu a kultivovány v LS médiu (Tabulka 4.6) s kanamycinem a claforanem.

**Tabulka 4.7:** Složení médií používaných při transformaci lilku bramboru pomocí kokultivace s *A. tumefaciens* (2MS) a při regeneraci po transformaci (CIM a SIM).

Složka	Koncentrace v jednotlivých médiích			Zásobní roztoky	Sterilizace
	2MS	CIM	SIM		
MS soli (Sigma)	4,33 g/l	4,33 g/l	4,33 g/l	-	v autoklávu
sacharóza	20 g/l	-	-	-	
glukóza	-	16 g/l	16 g/l	-	
inositol	0,1 g/l	0,1 g/l	0,1 g/l	-	
ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	2 mg/l	2 mg/l	2 mg/l	-	
vitamín B1 (thiamin)	0,1 mg/l	0,1 mg/l	0,1 mg/l	100 mg/l	
vitamín B6 (pyridoxin)	0,5 mg/l	0,5 mg/l	0,5 mg/l	100 mg/l	
kyselina nikotinová	0,5 mg/l	0,5 mg/l	0,5 mg/l	500 mg/l	
glycin	2 mg/l	2 mg/l	2 mg/l	3 g/l	
agar	8 g/l	6 g/l	6 g/l	-	
kanamycin	-	50 mg/l	50 mg/l	50 mg/ml v ddH <sub>2</sub> O	filtrací (0,22 µm)
claforan (taxcef, cefotaxime)	-	300 mg/l	300 mg/l	100 mg/ml v ddH <sub>2</sub> O	není nutná (sterilní prášek)
NAA	-	5 mg/l	0,02 mg/l	2,5 mg/ml v 35% ethanolu	filtrací (0,22 µm)
BAP	-	0,1 mg/l	-	1 mg/10 ml v 10 mM KOH	filtrací (0,22 µm)
GA3	-	-	0,02 mg/l	1 mg/10 ml v 35% ethanolu	filtrací (0,22 µm)
trans-zeatin ribosid (Sigma)	-	-	2 mg/l	1 mg/ml v 70% ethanolu	filtrací (0,22 µm)

**Pozn.:** GA3 a trans-zeatin ribosid přidány po sterilizaci a ochlazení

#### 4.1.3.5. Sklizení rostlinného materiálu

Listy tabáku i bramboru byly sklizeny po 80 mg (pro účely izolace RNA) 150 g (pro účely izolace DNA) nebo po 200 g (pro účely izolace proteinů) do mikrozkmavek, ihned zchlazeny v tekutém dusíku a následně skladovány při -70 °C.

## 4.2. PRÁCE S DNA

### 4.2.1. PCR

PCR slouží k namnožení nebo k úpravě úseků DNA. Probíhá ve třech krocích: 1) denaturace při 94 °C po dobu 30 sekund, 2) nasedání primerů při (T<sub>m</sub>-5) °C



a 3) polymerace při 72 °C (při použití *Taq* polymerázy) po dobu 1 minuty na každých 1000 bp. První denaturace probíhá déle (až 3 minuty). Tyto 3 kroky se opakují zpravidla v 10ti až 35ti cyklech, podle typu reakce (Tabulka 4.8).

Tabulka 4.8: Složení PCR reakce.

Složka	Množství
Templátová DNA (plazmid)	50 – 200 ng (5 – 10 ng)
10x PCR buffer	5 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	3 µl
10 mM dNTP	1 µl
1 mM primer forward	1 µl
1 mM primer reverse	1 µl
<i>Taq</i> polymeráza	1,25 – 2,5 U (koncentrace 5 U/µl)

#### 4.2.2. Elektroforéza DNA

Elektroforéza DNA je založena na tom, že negativně nabitě molekuly DNA putují v agarózovém gelu ve stejnosměrném elektrickém poli od katody k anodě, přičemž čím větší molekula DNA je, tím pomaleji se v gelu pohybuje. V závislosti na velikosti fragmentu je vhodné připravit gel s upravenou koncentrací agarózy (vyšší koncentrací agarózy pro menší fragmenty a naopak).

Elektroforetický gel byl připraven jako 1,2% roztok agarózy rozpuštěné v 0,5x TAE pufru (ředěn ze zásobního roztoku 50x TAE pufru, Tabulka 4.9) za stálého opatrného zahřívání v mikrovlnné troubě, po úplném rozpuštění byl roztok zchlazen pod tekoucí vodou na přibližně 70 °C a byl do něj přidán roztok GelRed (1 µl/10ml gelu, Biotium, fluorescentní barva vizualizující v UV záření nukleové kyseliny v gelu) v množství 100 µl/l. Roztok byl nalit do formy a do něj byl zasunut hřeben. Po utužení (asi 40 minut) byl hřeben vyňat, gel byl vložen do elektroforetické vany a zalit 0,5x TAE pufrem.

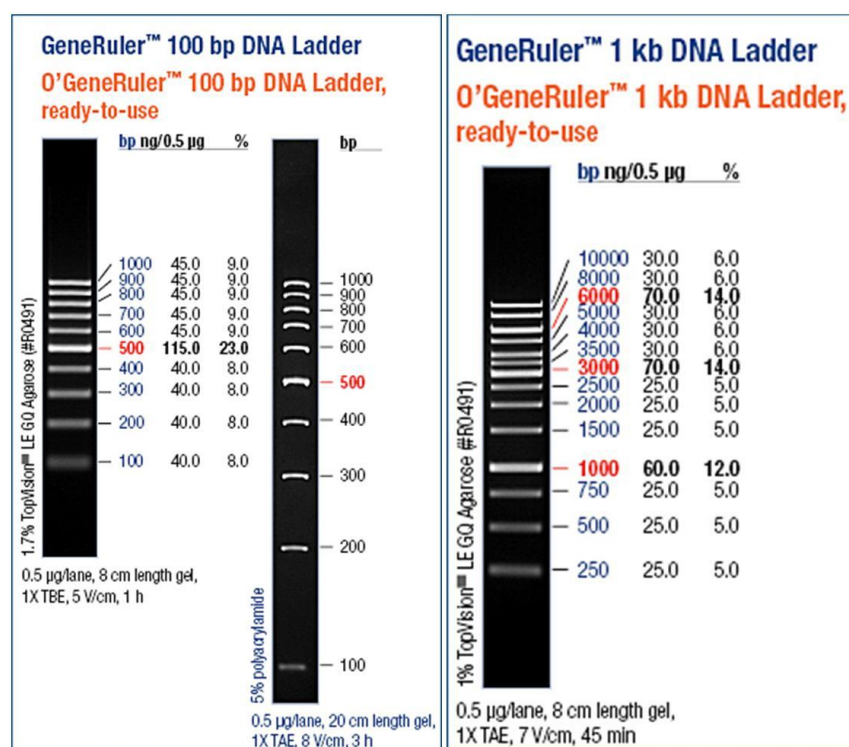
Tabulka 4.9: Složení 50x TAE pufru.

Složka	Koncentrace/Množství
Tris base	242 g/l
ledová kyselina octová	57,1 ml/l
0,5 M EDTA (pH 8,0)	100 ml/l

Tabulka 4.10: Složení nanášecího pufru.

Nanášecí pufr	0,025 % bromfenolová modř
	30 % glycerol

Do jamek gelů byly naneseny vzorky smíchané v poměru 5:1 s nanášecím puftrem obsahujícím bromfenolovou modř (Tabulka 4.10), která umožní kontrolovat, jak vzorky v gelu cestují (pohybuje se jako přibližně 500 bp velká molekula DNA). Do jedné jamky byl nanesen marker molekulových vah obsahující molekuly DNA známé velikosti („GeneRuler 100 bp DNA Ladder“ nebo „GeneRuler 1 kb DNA Ladder“ (Obrázek 4.3, Fermentas). Elektroforéza probíhala zpravidla při napětí 75 V po dobu 30 min. Gel s jednotlivými rozdělenými úseky DNA byl zdokumentován pomocí UV-transiluminátoru (G:BOX, Syngene).



Obrázek 4.3: Markery molekulové hmotnosti 100 bp a 1 kb používané při elektroforéze DNA.

#### 4.2.3. Sekvenace

Podle intenzity signálu na elektroforéze byla vypočítána koncentrace DNA vzorku. Do tenkostěnné sekvenační mikrozkmavky bylo přidáno podle koncentrace DNA až 13,7 µl plazmidu (100-200 ng DNA) a 0,3 µl primeru. Do požadovaného

objemu 14  $\mu\text{l}$  byl vzorek doplněn ddH<sub>2</sub>O. Samotná sekvenace probíhala v Laboratoři sekvenace DNA na PřF UK. Výsledná sekvence byla prohlížena v programu Chromas LITE.

#### 4.2.4. Izolace DNA z agarózového gelu

(QIAEX II Agarose Gel Extraction Protocol, QIAGEN)

UV zářením byly vizualizovány jednotlivé fragmenty DNA. Požadované fragmenty byly čistým skalpelem urychleně vyříznuty a vloženy do mikrozkušavky. DNA byla z gelu izolována pomocí kitu QIAEX II Gel Extraction Kit od firmy Qiagen. Byla zjištěna hmotnost vyříznutého úseku (zvážením a odečtením hmotnosti předem zvážené mikrozkušavky). Podle velikosti fragmentu bylo přidáno tolik QX1 pufru (nebo ddH<sub>2</sub>O) v mililitrech, kolik se rovná násobku hmotnosti vyříznutého úseku v miligramech (Tabulka 4.11).

**Tabulka 4.11:** Množství přidávaného QX1 pufru nebo ddH<sub>2</sub>O určené velikostí vyřezaného fragmentu.

Velikost fragmentu	Množství QX1 pufru v ml	Množství ddH <sub>2</sub> O v ml
menší než 100 bp	6x hmotnost úseku v mg	-
100 bp – 4 kbp	3x hmotnost úseku v mg	-
větší než 4 kbp	3x hmotnost úseku v mg	2x hmotnost úseku v mg

Poté bylo přidáno 10  $\mu\text{l}$  QUIAX II, homogenizováno vortexováním 30 sekund) a inkubováno v bločku (50 °C, 10 min, každé 2 minuty vortexováno). Po centrifugaci (30s, 1800 g, RT) byl slit supernatant a sediment byl resuspendován v 500  $\mu\text{l}$  QX1. Toto bylo vortexováno, centrifugováno (30s, 1800 g, RT) a sediment opět slit. Tento krok byl 2x opakován s 500  $\mu\text{l}$  PE pufru. Zbytek PE pufru byl poté odsát a peleta byla opatrně vysušena u větráku. Těsně před uschnutím byla peleta resuspendována v 10  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O nebo 1 mM Tris-HCl (pH 8,5). Pro uvolnění DNA byla suspenze následně inkubována podle velikosti DNA (Tabulka 4.12) a centrifugována (30s, 1800 g, RT).

**Tabulka 4.12:** Doba inkubace pelety resuspendované v ddH<sub>2</sub>O nebo 1 mM Tris-HCl určená velikostí vyřezaného fragmentu.

Velikost fragmentu	Teplota	Doba inkubace
menší než 4 kbp	RT	5 min
4 kbp – 10 kbp	50 °C	5 min
větší než 10 kbp	C	10 min

Supernatant byl odsát a převeden do nových mikrozkušavek. Peleta byla ještě jednou promyta 5  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O nebo 10  $\mu$ l 1 mM Tris-HCl, centrifugována a supernatant byl opět převeden do mikrozkušavky z předchozího kroku. Dále byla DNA skladována při teplotě  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.2.5. Restrikční štěpení**

Ke štěpení plazmidů ve specifických restrikčních místech v MCS byly používány specifické restrikční endonukleázy (Fermentas). Restrikční štěpení bylo použito vyjímání úseků DNA z plazmidů a při kontrolním štěpení (kontrola vložení úseku do plazmidu). Směsi pro restrikci byly míchány podle koncentrace a velikosti plazmidu, používaného restrikčního enzymu, jeho aktivity a počtu restrikčních míst.

#### **4.2.6. Izolace plazmidové DNA z bakterií**

(SV minipreps DNA Purification System, Promega).

Přes noc narostlá bakteriální kultura byla nadvakrát stočena v 1,5ml mikrozkušavce (30s, 1800 g), supernatant byl vylit a zbytek odstraněn ve vodní vývěvě. Sediment byl resuspendován ve 250  $\mu$ l „Cell Resuspension Solution“ a vortexován. Poté bylo přidáno 250  $\mu$ l „Cell Lysis Solution“, zkumavka byla 3krát opatrně převrácena a ponechána 1-5 min v klidu. Následně bylo přidáno 350  $\mu$ l „Neutralization Solution“, čímž byla „Cell Lysis Solution“ neutralizována, minizkušavka byla 3krát převrácena a směs byla centrifugována (10 min, 1800 g, RT). Supernatant byl převeden do „Spin Column“ centrifugačních kolonek, které byly vloženy do „2ml Collection Tube“ sběrných mikrozkušavek a tento komplex byl centrifugován (1 min, 1800 g, RT). Kolonky byly následně promyty 750  $\mu$ l „Column Wash Solution“ s 95% EtOH a centrifugovány (1 min, 1800 g, RT). Tento krok byl opakován s 250  $\mu$ l „Column Wash Solution“ s EtOH a 2 minutovou centrifugací. Kolonky byly přeneseny do nových 1,5 ml mikrozkušavek a byly promyty 100  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O, čímž se DNA uvolnila a byla zachycena do mikrozkušavky. Dále byl izolovaný plazmid skladován při teplotě blízké  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.2.7. Ligace

Vektor i fragment byly štěpeny restriktivními enzymy, čímž vznikly kohezivní konce. Pomocí elektroforézy byly přečištěny. Aliquoty izolovaných úseků byly opět nanесeny na elektroforetický gel spolu s markerem, proběhla elektroforéza a výsledek byl zdokumentován (GeneSnap, Syngene). Pomocí markeru byla vypočítána koncentrace úseků, podle které se určilo přesné složení reakce tak, aby množství fragmentu 5 až 7krát převyšovalo množství vektoru (Tabulka 4.13). Ligace probíhala při 15 °C (2 hod až přes noc) a poté byla ligáza inaktivována (10 min, 68 °C).

Tabulka 4.13: Složení obecné ligační směsi.

vektor (ng)	fragment	pufř (μl)	T4 ligáza (μl)	ddH <sub>2</sub> O
10-50	stechiometricky	1,5-2,5	1	0-15

##### 4.2.7.1. Ligace do *pDCV*

Ligace konstruktů do *pDCV* probíhala pomocí TA klonování (QUIAGEN PCR Cloning Kit). Složení reakce vyjadřuje Tabulka 4.14.

Tabulka 4.14: Složení ligační směsi při ligaci konstruktů do *pDCV*.

Složka	Varianta <i>SPI-2-T</i>	Varianta <i>SPI-2-Y</i>
<i>pDCV</i> (50 ml/μl)	1 μl	1 μl
PCR produkt	0,6 μl	1 μl
ddH <sub>2</sub> O	3,4 μl	3 μl
Ligation Master mix	5 μl	5 μl
<b>Celkem</b>	<b>10 μl</b>	<b>10 μl</b>

##### 4.2.7.2. Ligace do *pCP60*

Plazmidy *pDCV* nesoucí konstrukty *SPI-2-T* i *SPI-2-Y* byly štěpeny (Tabulka 4.15), čímž se z nich vyštěpily uvedené konstrukty. Zároveň byl štěpen plazmid *pCP60* s genem pro GFP. Ligační směsi byly připraveny podle Tabulky 4.13).

Tabulka 4.15: Štěpení *pDCV* a *pCP60+*.

Štěpení <i>pDCV</i>		Štěpení <i>pCP60+</i>	
Složka	Množství	Složka	Množství
<i>pDCV</i>	18,6 $\mu$ l	<i>pCP60+</i>	3,1 $\mu$ l
enzym <i>Xba</i> I	0,5 $\mu$ l	enzym <i>Xba</i> I	1,25 $\mu$ l
enzym <i>Kpn</i> I	0,3 $\mu$ l	enzym <i>Kpn</i> I	0,7 $\mu$ l
pufr <i>Bam</i> HI	2,5 $\mu$ l	pufr <i>Bam</i> HI	2,5 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	3,1 $\mu$ l	ddH <sub>2</sub> O	17,45 $\mu$ l
<b>Celkem</b>	<b>25 <math>\mu</math>l</b>	<b>Celkem</b>	<b>25 <math>\mu</math>l</b>

#### 4.2.8. Odsolení ligační směsi

Odsolení ligační směsi probíhalo v „odsolovacích kolonkách“ vyrobených naplněním mikrozskumavky gelem (1% agaróza, 100 mM glukóza) a vložením špičky pipety, která byla po utužení gelu odstraněna. Směs byla nanášena do prohlubně vytvořené špičkou pipety, odsolení probíhalo 90 min při 4 °C. Poté byla směs použita k elektroporaci.

#### 4.2.9. Příprava a ověření modifikovaných genů

Obě varianty genů pro stabilní expresi SPI-2 v cytoplasmě (*SPI-2-T* a *SPI-2-Y*) kódující proteiny lišící se v jedné aminokyselině (T - threonin, Y - tyrozin) byly připraveny z téhož plazmidu *pPICZαB* (plazmid nesoucí gen *SPI-2* získaný od prof. Sehnala) dvěma nezávislými PCR reakcemi. Konstrukt *SPI-2-T* byl vyroben pomocí PCR použitím primerů *SPI-2-F-T* a *SPI-2-R*. Konstrukt *SPI-2-Y* byl vyroben pomocí PCR (Tabulka 4.17) s použitím primerů *SPI-2-Y-F* a *SPI-2-R* (Tabulka 4.16). Použitím těchto primerů byl gen upraven tak, že před start kodón byla přidána Kozakové sekvence, která usnadňuje rozpoznání startovního kodónu AUG a tím posiluje translaci, a na 3' konec byla přidána sekvence kódující hexa-Histidinovou kotvu pro detekci exprese protilátkou při analýze proteinů a pro případnou izolaci za účelem *in vitro* testování. V reakci PCR byla použita *Taq* polymeráza, která přidala na oba konce konstruktů přesahující adenosin, potřebný pro pozdější klonování.

**Tabulka 4.16:** Sekvence genu SPI-2 a primerů používaných při přípravě konstruktů SPI-2-T, SPI-2-Y a SPI-2-T-*apo*. Zeleně zvýrazněny jsou sekvence kompatibilní s primery SPI-2-T-F a SPI-2-Y-F. Růžově zvýrazněna je optimalizovaná sekvence počátku translace včetně iniciačního kodónu ATG. Světle modře zvýrazněny jsou kodóny pro alternující aminokyseliny (ACC pro treonin a TAC pro tyrozin). Šedě zvýrazněny jsou sekvence kompatibilní s genem SPI-2. Žlutě zvýrazněna je sekvence pro hexa-Histidinovou kotvu. Červeně jsou vyznačeny sekvence adaptoru (sekvence komplementární mezi primery SL-R a SPI-2-F-adapt). Tmavě modře je vyznačen stop kodón. Místa štěpení jsou označena symbolem „/“.

Název sekvence	Sekvence ve směru 5' → 3'	T <sub>m</sub>	Restrikční enzym
gen <i>SPI-2</i>	ACC GAG TGG GAC CCT GTT TGT GGT AAA GAT GGC AAG ACG TAC AGC AAT CTT TGC TGG TTA AAC GAG GCT GGC GTC GGG TTG GAT CAT GAA GGT GAA TGT	-	-
primer <i>SPI-2-T-F</i>	A ACA ATG GTT TGC ACC ACC GAG TGG GAC CCT GTT TG	64 °C	-
primer <i>SPI-2-Y-F</i>	A ACA ATG GTT TGC TAC ACC GAG TGG GAC CCT GTT TG	64 °C	-
primer <i>SPI-2-R</i>	TCA GTG ATG ATG GTG ATG ATG ACA TTC ACC TTC ATG ATG CAA C	62 °C	-
primer <i>SL-F</i>	CC CG/G ATC CCT CTC TCC ATA CCA ATG G	88 °C	<i>Bam</i> HI
primer <i>SL-R</i>	G CTG AGC TCC ATA AGG ACA TGC ATG GGC AAT G	-	<i>Sac</i> I
primer <i>SPI-2-F-adapt</i>	AT GGA GCT CAG CCG GTT TGC ACC ACC GAG TG	-	-
primer <i>SPI-2-R</i>	TCA GTG ATG ATG GTG ATG ATG ACA TTC AC		-
gen <i>SPI-2-T</i>	A ACA ATG GTT TGC ACC ACC GAG TGG GAC CCT GTT TGT GGT AAA GAT GGC AAG ACG TAC AGC AAT CTT TGC TGG TTA AAC GAG GCT GGC GTC GGG TTG GAT CAT GAA GGT GAA TGT CAT CAT CAC CAT CAT CAC TGA		
gen <i>SPI-2-Y</i>	A ACA ATG GTT TGC TAC ACC GAG TGG GAC CCT GTT TGT GGT AAA GAT GGC AAG ACG TAC AGC AAT CTT TGC TGG TTA AAC GAG GCT GGC GTC GGG TTG GAT CAT GAA GGT GAA TGT CAT CAT CAC CAT CAT CAC TGA		

Tabulka 4.17: Složení a průběh PCR reakcí při přípravě konstruktů *SPI-2-T* a *SPI-2-Y*

Složení PCR reakce - Příprava <i>SPI-2-T</i> a <i>SPI-2-Y</i>			
Příprava <i>SPI-2-T</i>		Příprava <i>SPI-2-Y</i>	
Složka	Množství	Složka	Množství
<i>pPICZαB</i>	1 μl	<i>pPICZαB</i>	1 μl
primer <i>SPI-2-T-F</i>	1 μl	primer <i>SPI-2-Y-F</i>	1 μl
primer <i>SPI-2-R</i>	1 μl	primer <i>SPI-2-R</i>	1 μl
10 mM dNTP	1 μl	10 mM dNTP	1 μl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	3 μl	25 mM MgCl <sub>2</sub>	3 μl
10x <i>Taq</i> pufr	5 μl	10x <i>Taq</i> pufr	5 μl
<i>Taq</i> polymeráza	0,5 μl	<i>Taq</i> polymeráza	0,5 μl
ddH <sub>2</sub> O	37,5 μl	ddH <sub>2</sub> O	37,5 μl
<b>Celkem</b>	<b>50 μl</b>	<b>Celkem</b>	<b>50 μl</b>
Podmínky			
Krok	T	Čas	Pozn.
1. Denaturace	94 °C	3:00	-
2. Denaturace	94 °C	0:30	opakovat 25x
3. Nasedání primerů	55 °C	0:40	
4. Polymerace	72 °C	0:10	
5. Adenylace	72 °C	10:00	-
6. Chlazení	4 °C	∞	-

Konstrukt směřovaný do apoplastu, *SPI-2-T-apo*, byl vytvořen pomocí dvoukrokové PCR, spojením *SPI-2* se signální sekvencí do sekreční dráhy z genu *StHyPRP1* (*SL*, 100 bp; plazmid *pCP60* s vloženou *SL* sekvencí byl laskavě poskytnut RNDr. Lenkou Dvořákovou, Ph.D., Dvořáková *et al.*, 2007).

V prvním kroku byl k oběma úsekům připojen adaptor (nezávislá reakce pro každý úsek) pomocí PCR reakce s adaptorovými primery (*SL-R* a *SPI-2-F-adapt*, Tabulka 4.18).



**Tabulka 4.18:** Složení a průběh PCR reakcí při 1. kroku dvoukrokové PCR: Namnožení obou úseků pomocí adaptorových primerů.

<i>Složení PCR reakcí</i>							
1. PCR reakce				2. PCR reakce			
Složka	Množství	Složka	Množství	Složka	Množství	Složka	Množství
<i>pCP60</i>	1 µl	<i>pCP60</i>	1 µl	<i>pCP60</i>	1 µl	<i>pCP60</i>	1 µl
primer <i>SL-F</i>	1 µl	primer <i>SPI-2-F-adapt</i>	1 µl	primer <i>SL-F</i>	1 µl	primer <i>SPI-2-F-adapt</i>	1 µl
primer <i>SL-R</i>	1 µl	primer <i>SPI-2-R</i>	1 µl	primer <i>SL-R</i>	1 µl	primer <i>SPI-2-R</i>	1 µl
10 mM dNTP	1 µl	10 mM dNTP	1 µl	10 mM dNTP	1 µl	10 mM dNTP	1 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	3 µl	25 mM MgCl <sub>2</sub>	3 µl	25 mM MgCl <sub>2</sub>	3 µl	25 mM MgCl <sub>2</sub>	3 µl
PCR pufr	5 µl	PCR pufr	5 µl	PCR pufr	5 µl	PCR pufr	5 µl
<i>Taq</i> polymeráza	0,5 µl	<i>Taq</i> polymeráza	0,5 µl	<i>Taq</i> polymeráza	0,5 µl	<i>Taq</i> polymeráza	0,5 µl
ddH <sub>2</sub> O	37,5 µl	ddH <sub>2</sub> O	37,5 µl	ddH <sub>2</sub> O	37,5 µl	ddH <sub>2</sub> O	37,5 µl
<b>Celkem</b>	<b>50 µl</b>	<b>Celkem</b>	<b>50 µl</b>	<b>Celkem</b>	<b>50 µl</b>	<b>Celkem</b>	<b>50 µl</b>
<i>Podmínky PCR reakcí</i>							
Krok	T	Čas	Pozn.	Krok	T	Čas	Pozn.
1.Denaturace	94 °C	3:00	-	1.Denaturace	94 °C	3:00	-
2.Denaturace	94 °C	0:30	Kroky 2. až 4. opakovat 35x	2.Denaturace	94 °C	0:30	Kroky 2. až 4. opakovat 35x
3.Nasedání primerů	58 °C	1:20		3.Nasedání primerů	54 °C	1:20	
4.Polymerace	72 °C	0:30		4.Polymerace	72 °C	0:30	
5.Chlazení	4 °C	∞	-	5.Chlazení	4 °C	∞	-

Ve druhém kroku byly vzniklé úseky spojeny pomocí adaptorů a po 10ti cyklech byly přidány primery *SL-F* a *SPI-2-R* a takto vzniklý konstrukt byl namnožen (Tabulka 4.19).

**Tabulka 4.19:** Složení a průběh PCR reakcí při 2. kroku dvoukrokové PCR: Spojení úseků vzniklých v předchozí reakci.

Složka	Množství	Podmínky			
		Krok	Teplota	Čas	Poznámka
templát <i>SL</i>	1 µl	Denaturace	94 °C	3:00	Kroky 2. až 4. opakovat 10x
templát <i>SPI-2</i>	1 µl	Denaturace	94 °C	0:30	
dNTP	1 µl	Nasedání primerů	43 °C	1:20	
MgCl <sub>2</sub>	3 µl	Polymerace	72 °C	0:30	
PCR pufr	5 µl	Chlazení	4 °C	∞	-
<i>Taq</i> polymeráza	0,5 µl	-	-	-	-
ddH <sub>2</sub> O	36,5 µl	-	-	-	-
<b>Celkem</b>	<b>47,5 µl</b>	-	-	-	-
Po 10ti cyklech přidáno:					
Složka	Množství	Podmínky			
		Krok	Teplota	Čas	Poznámka
primer <i>SL-F</i>	1 µl	Denaturace	94 °C	3:00	Kroky 2. až 4. opakovat 35x
primer <i>SPI-2-R</i>	1 µl	Denaturace	94 °C	0:30	
<i>Taq</i> polymeráza	0,5 µl	Nasedání primerů	55 °C	0:45	
<b>Celkem</b>	<b>50 µl</b>	Polymerace	72 °C	0:45	
-	-	Polyadenylace	72 °C	10:00	-
-	-	Chlazení	4 °C	∞	-

### **4.3. PRÁCE S RNA**

#### **4.3.1. Izolace RNA z rostlin**

RNA byla izolována pomocí kitu „RNeasy Mini Kit“. Do mikrozkuvek s rostlinným materiálem (80 mg, zchlazený na  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) byly přidány ocelové kuličky, mikrozkuvky vloženy do bločků (předem ponořených v tekutém dusíku) a bločky umístěny do homogenizátoru. Homogenizace probíhala 5 min při frekvenci 25 třepů za sekundu. Poté bylo přidáno ke každému vzorku 450  $\mu\text{l}$  lyzačního pufru RTL s přidáním  $\beta$ -mercapthoethanolem (10  $\mu\text{l}$  na 1 ml RTL pufru). Lyzát byl přenesen pipetou do kolonky „QIAshredder“ umístěné ve 2 ml sběrné mikrozkuvce a proběhla centrifugace (2 min, 1800 g, RT). Ustříhnutou špičkou byl supernatant (bez pelety) ze sběrné mikrozkuvky přemístěn do nové mikrozkuvky. Bylo přidáno 0,5 objemu čistého ethanolu, resuspendováno pipetou, vzorek včetně případné sraženiny přenesen do kolonky „RNeasy mini“ ve 2 ml sběrné mikrozkuvce a centrifugován (35 s, 1800 g, RT). Supernatant byl odstraněn. Kolonka „RNeasy mini“ byla poté promyta 700  $\mu\text{l}$  RW1, centrifugována (35 s, 1800 g, RT), přenesena do nové 2 ml sběrné mikrozkuvky, promyta 500  $\mu\text{l}$  RPE, centrifugována (15 s, 1800 g), znovu promyta 500  $\mu\text{l}$  RPE a centrifugována (2 min, 1800 g) a přenesena do nové 1,5 ml mikrozkuvky. Do kolonky bylo přidáno 30-50  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O a byla centrifugována (1 min, 1800 g). Tím se RNA navázaná v kolonce uvolnila do mikrozkuvky.

#### **4.3.2. RT-PCR**

Izolovaná RNA byla použita pro získání cDNA pomocí RT-PCR. Nejprve byla odstraněna DNA. Byla připravena směs podle Tabulky 4.20. 2,5  $\mu\text{l}$  směsi bylo přidáno do každého vzorku izolované RNA. Podle množství nukleové kyseliny, vypočítaného pomocí síly signálu na kontrolní elektroforéze, bylo přidáno příslušné množství vzorku RNA a bylo doplněno ddH<sub>2</sub>O do objemu 10  $\mu\text{l}$ . Následovala inkubace (10 min, 37  $^{\circ}\text{C}$ ) a poté byl přidán 1  $\mu\text{l}$  25 mM EDTA a směs byla inkubována 10 min při 65  $^{\circ}\text{C}$ , čímž se hydrolyzovala DNáza.

Tabulka 4.20: Směs pro odstranění DNA z izolované RNA.

Složka	Množství
10x reakční pufr s MgCl <sub>2</sub>	1 µl
Inhibitor RNáz	0,5 µl
DNáza	1 µl

5 µl takto ošetřené izolované RNA bylo smícháno s 1 µl zakotveného primeru oligoT<sub>23</sub> a 6,5 µl ddH<sub>2</sub>O. Směs byla denaturována (5 min, 70 °C), urychleně přenesena na led a byly k ní přidány 4 µl 5x koncentrovaného pufru pro reverzní transkripci (Fermentas), 2 µl 10 mM dNTP a 0,5 µl (20 U) inhibitoru RNáz (Ribolock, Fermentas). Po nasednutí primerů (5 min, 43 °C) byl k směsi přidán 1 µl (200 U) reverzní transkriptázy M-MuLV (Reverse Aid RT, Fermentas) a proběhla reverzní transkripce (60 min, 43 °C). Poté byly enzymy inaktivovány (10 min, 70 °C) a cDNA byla dále skladována při -20 °C.

#### 4.4. PRÁCE S PROTEINY

##### 4.4.1. Izolace proteinů z *A. tumefaciens*

Čerstvě narostlá kolonie bakterií *A. tumefaciens* byla zaočkována do tekutého LB média a aerobně kultivována (16-20 h, 28 °C, 160 ot./min). Z narostlé suspenze byl odebrán 1 ml a centrifugován (1 min, 1800 g, RT). Následně bylo přidáno 100 ml vzorkového pufru (Tabulka 4.23), proběhla centrifugace a (5 min, 1800 g, RT) a byl odebrán supernatant. Takto izolované proteiny byly připraveny pro proteinovou elektroforézu a dále skladovány při -20 °C.

##### 4.4.2. Izolace proteinů z rostlinného materiálu

Do mikrozkuvek s 200 g rostlinného materiálu byly přidány ocelové kuličky a mikrozkuvka byla vložena do tekutého dusíku spolu s bločky z homogenizátoru. Poté byly mikrozkuvky vloženy do bloček, bločky do homogenizátoru a proběhl proces homogenizace (5 min, 25 třepů/sekundu). K takto připravenému vzorku bylo přidáno 200 ml PBS (Tabulka 4.21) s 2 µl směsí inhibitorů proteáz (Protease Inhibitor Cocktail, Sigma-Aldrich). Směs byla 10 minut inkubována na ledu a poté centrifugována (15 min, 1800 g, -4 °C). Supernatant obsahoval frakci rozpustných proteinů.

**Tabulka 4.21:** Složení PBS pufru používaného při izolaci proteinů z rostlinného materiálu.

Složka	Koncentrace
NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	10 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 7,4)	2 mM

#### 4.4.3. SDS polyakrylamidová elektroforéza

Pro rozdělení proteinů byla použita SDS polyakrylamidová elektroforéza (SDS PAGE, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis).

Příprava gelů: Mezi vyčištěná skla bylo umístěno těsnění. Skla byla upevněna svorkami a postavena do vertikální polohy. Ihned po smíchání byl mezi skla nalit roztok dělicího gelu (Tabulka 4.22) až přibližně 1,5 cm pod okraj nižšího skla a povrch byl opatrně převrstven destilovanou vodou. Po 30 minutách byla voda odsáta filtračním papírem a na utuhnutý dělicí gel byl nalit čerstvě připravený zaostřovací gel a do něj byl zasunut hřeben. Po utužení zaostřovacího gelu (30 min) byl vyndán hřeben a těsnění, skla umístěna do aparatury a zalita elektroforetickým pufrem.

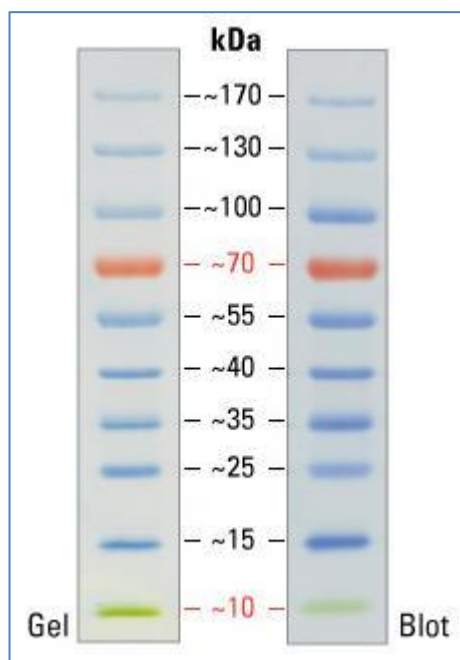
Vzorek proteinů byl smíchán s jedním objemem 2x koncentrovaného vzorkového pufru, inkubován 5 min při 95 °C a centrifugován (2 min, 1800 g, RT). 30-50 µl vzorku bylo naneseno na elektroforézu. Proteiny byly na gelu rozděleny elektroforézou (Biometra, malý gel: 100 V, 25 mA/gel, velký gel: 220 V, 40 mA/gel, 1 h, RT). V případě provádění elektroforézy v 15% gelu bylo také nutno celý aparát během procesu chladit (10 °C). Jako marker byl používán PageRuler Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific (Obrázek 4.4).

**Tabulka 4.22:** Příprava gelů pro SDS-PAGE elektroforézu.

(1 velký nebo 2 malé gely)	10% dělicí gel	15% dělicí gel	4% zaostřovací gel
roztok monomerů	4 ml	6 ml	700 µl
Tris-HCl	3 ml (1,5 M; pH 8,8)	3 ml	1,25 ml (0,5 M; pH 6,8)
ddH <sub>2</sub> O	4,8 ml	2,87 ml	3 ml
10% SDS	120 µl	120 µl	50 µl
TEMED	4 µl	4 µl	2,5 µl
40% amonium persulfát	15 µl	15 µl	10 µl

**Tabulka 4.23:** Složení pufrů používaných při SDS-PAGE elektroforéze.

<b>elektroforetický pufr (pH 8,3)</b>	50 mM Tris-HCl
	385 mM glycin
	0,1 % SDS
<b>2x koncentrovaný vzorkový pufr</b>	20 % glycerol
	10 % $\beta$ - mercaptoethanol
	2 % SDS
	20 mM Tris-HCl (pH 6,8)
	0,005% bromfenolová modř



**Obrázek 4.4:** PageRuler Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific - marker molekulové hmotnosti používaný při SDS-PAGE.

#### **4.4.4. Detekce proteinů**

Po přenesení proteinů z gelu na membránu byl gel obarven stříbrem (ProteoSilver<sup>TM</sup> Silver Stain Kit, Sigma-Aldrich, Tabulka 4.24), nebo v roztoku CBB (Tabulka 4.25). Barvení v roztoku CBB probíhalo 1 hodinu a pozadí bylo poté odbarveno několikerým promytím v odbarvovacím roztoku (Tabulka 4.25). Poté byl gel inkubován 3 hodiny v sušícím roztoku, umístěn mezi dva celofány, napnut pomocí svorek na sklo a usušen při laboratorní teplotě.

**Tabulka 4.24:** Postup při barvení elektroforetického SDS-PAGE gelu pomocí stříbra a složení jednotlivých roztoků.

Krok	Složka	Doba působení na kývačce
Fixáž	50% methanol	30 minut
	12% kyselina octová	
Omývání	50% ethanol	3 x 10 minut
Impregnace I.	0,2 M Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	1 minutu
Omývání	ddH <sub>2</sub> O	5 x 5 sekund
Impregnace II.	12 mM AgNO <sub>3</sub>	10 minut (malý gel) / 20 minut (velký gel)
Omývání	ddH <sub>2</sub> O	2 x 10 sekund
Vyvolání	0,57 M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	10 minut
	50 µl HCOH	
	20 mM Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	
Stop	50% methanol	5 minut
	12 % kyselina octová	
Omývání	ddH <sub>2</sub> O	2 x 2 minuty
Konzervace	10 % kyselina octová	30 minut
	10 % glycerin	

**Tabulka 4.25:** Složení roztoků používaných při barvení SDS-PAGE gelu pomocí Coomassie Brilliant Blue.

<b>CBB roztok</b>	0,25% Coomassie Brilliant Blue R250 (Sigma-Aldrich)
	50% methanol
	10% kyselina octová
<b>odbarvovací roztok</b>	50% methanol
	10% kyselina octová
<b>sušící roztok</b>	25% methanol
	10% isopropanol
	2,5% glycerol

#### 4.4.4.1. Přenos proteinů na membránu

Proteiny z gelu byly elektricky blotovány („semi-dry“ blotování) na PVDF membránu, která byla předem inkubována v methanolu (Biometra, 300 V, 300 mA, 10 W, 1 h, RT).

#### 4.4.4.2. Nepřímá detekce proteinů na membráně

Membrána s přenesenými proteiny byla blokována ve 4% roztoku sušeného mléka (1,3% tuku) v TBS pufru (Tabulka 4.26, 1 h, kývačka) a poté 3 x promyta v TBS pufru po dobu 1 minuty. Následně byla membrána inkubována v roztoku primární protilátky Anti-His (Sigma) ředěné 1:3000 roztokem 0,5% mléka v TBS pufru (1 h, kývačka). Po promytí membrány TBS pufrem (3 x 10 minut, kývačka, vymytí nespecificky navázaných protilátek) byla membrána inkubována v roztoku sekundární

protilátky (Goat Anti-Mouse HRP, Stressgene) ředěné 1:1000 roztokem 0,5% mléka v TBS pufru (1 h, kývačka). Nakonec byla membrána promyta v TBS pufru (3 x 10 minut).

Výhodou tohoto dvoustupňového systému je, že na jednu primární protilátku se může navázat více sekundárních protilátek a tím se signál amplifikuje.

**Tabulka 4.26:** Složení pufrů používaných při nepřímé detekci přenesených proteinů na membráně.

<b>transferový pufr (pH 8,3)</b>	50 mM Tris-HCl
	385 mM glycin
	10% methanol
<b>TBS pufr (Tris-buffered saline)</b>	50 mM Tris-HCl (pH 7,6)
	150 mM NaCl

#### 4.4.4.3. Vytvoření v ECL systému

Membrána byla vložena do směsi roztoků „Amersham ECL Western blotting detection reagents and analysis system“ (GE Healthcare, 1 min, 2 ml směsi roztoků) a vložena v průhledné fólii do vyvíjecí kazety. Na membránu byl položen RTG film a kazeta uzavřena. Po 1 - 3 minutách byl film vyjmut a vložen do vývojky. Jakmile bylo zpozorováno zabarvování filmu, byl opláchnut vodou a ustálen v ustalovači.

#### 4.4.4.4. Barvení Ponceau S

Po vizualizaci proteinů na PVDF membráně na film v systému ECL byla membrána s přenesenými proteiny obarvena v roztoku Ponceau S (5 min) a pozadí membrány bylo poté odbarveno ddH<sub>2</sub>O (1 - 3 min).

## 5. VÝSLEDKY

### 5.1. PŘÍPRAVA GENOVÝCH KONSTRUKTŮ *SPI-2-T*, *SPI-2-Y* A *SPI-2-T-APO*

Základní forma genu *SPI-2* byla pomocí PCR s adaptorovými primery upravena tak, aby před iniciačním kodónem obsahovala konsenzuální Kozakové sekvenci a vzniklý protein obsahoval na C' konci hexa-Histidinovou kotvu umožňující imunodetekci proteinu, popř. jeho izolaci z rostlinného materiálu.

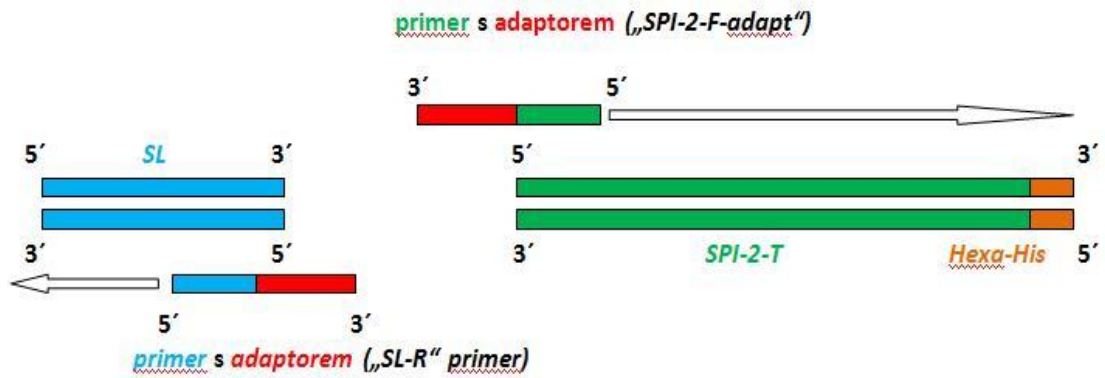
Pro cytoplazmaticky lokalizovaný *SPI-2* byly navrženy dva typy forward primerů, které vedly ke vzniku dvou variant inhibitoru lišících se jednou aminokyselinou na pozici 4, kde přítomnost tyrozinu (Y) namísto přirozeně se vyskytujícího threoninu (T) způsobuje mírně odlišnou aktivitu. Pro přípravu konstruktů *SPI-2-T* byly použity primery *SPI-2-T-F* a *SPI-2-R*. Pro přípravu konstruktů *SPI-2-Y* byly použity primery *SPI-2-Y-F* a *SPI-2-R*. Konstrukty byly vytvořeny PCR reakcí s použitím těchto primerů a *Taq* polymerázy. *Taq* polymeráza připojuje na konce syntetizovaných úseků adenosinový zbytek a umožňuje tak snadné začlenění produktů reakce do vektoru *pDCV*. Výsledná nukleotidová sekvence konstruktů je uvedena v Tabulce 4.16.

Třetí konstrukt (*SPI-2-T-apo*, směřovaný do apoplastu) byl vytvořen pomocí dvoukrokové PCR, spojením úseků signální sekvence z genu *StHyPRP1* (*SL*, Dvořáková *et al.*, 2007) a *SPI-2-T*, s použitím adaptorových primerů (Obrázek 5.1).



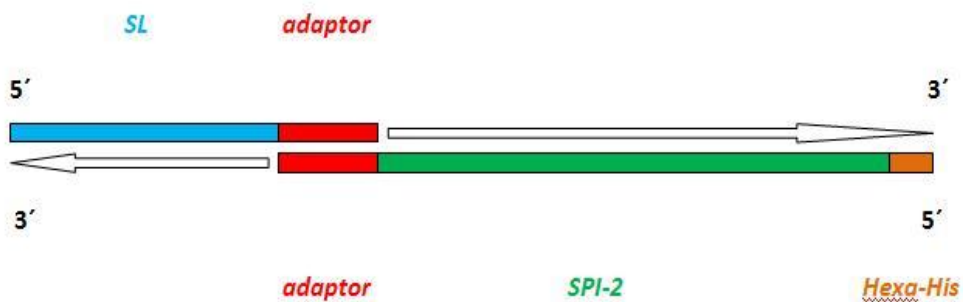
**Příprava konstruktů *SPI-2-T-*apo** – spojení úseků *SL* a *SPI-2-T***

1. krok: Připojení adaptéru na obě sekvence – dvě nezávislé reakce

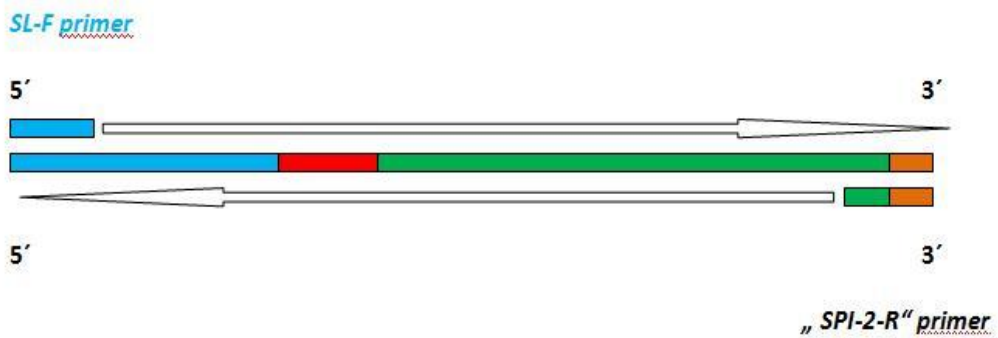


2. krok: Spojení úseků *SL* a *SPI-2*

Spojení úseků *SL* a *SPI-2-T* (10 cyklů)



Namnožení konstruktů *SPI-2-*apo**



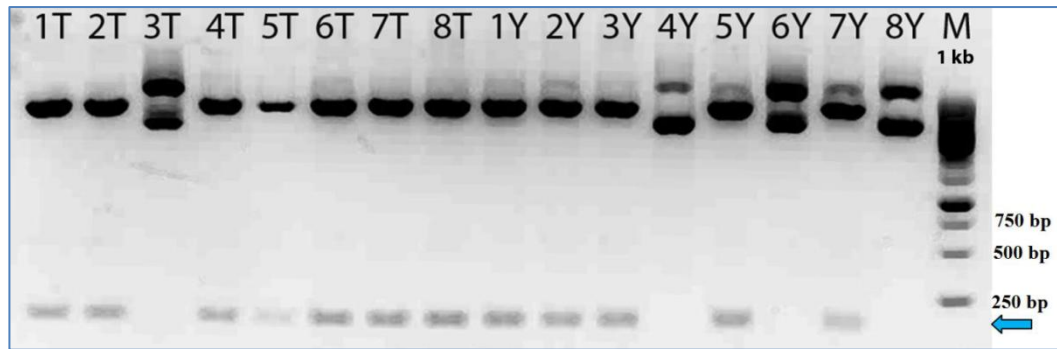
Obrázek 5.1: Dvoukroková PCR reakce – příprava konstruktů *SPI-2-T-*apo**.

## 5.2. PŘÍPRAVA A OVĚŘOVÁNÍ PLAZMIDU *pDCV* S INZERTY *SPI-2-T*, *SPI-2-Y* A *SPI-2-T-APO*

Připravené konstrukty *SPI-2-T*, *SPI-2-Y* a *SPI-2-T-apo* byly ligovány do plazmidů *pDCV* pomocí kitu pro TA klonování, následně proběhlo odsolení v odsolovacích kolonkách. Ligační směsi pro každou ze tří variant byly pomocí elektroporace vneseny do bakterií *E. coli* a vysety na pevné LB médium s kanamycinem. Přes noc narostly jednotlivé kolonie.

Bylo vybráno osm kolonií pro každou z variant *SPI-2-T* a *SPI-2-Y* a ty byly zaočkovány do osmi zkumavek s tekutým LB médiem. Bakterie byly aerobně kultivovány přes noc při 37 °C. Z mléčně zakalených suspenzí byla následně izolována plazmidová DNA. Přítomnost obou variant genů *SPI-2* v plazmidech *pDCV* byla ověřena pomocí štěpení restrikčním enzymem *EcoRI* (pro nějž má *pDCV* místo štěpení na obou stranách od místa vložení PCR produktu) následovaným elektroforézou (Obrázek 5.2). Přítomnost genů v plazmidech označených 1T, 2T, 1Y a 2Y byla ověřena sekvenací s primerem *M13F*. Sekvence potvrdila přítomnost genů s požadovanou sekvencí ve všech čtyřech kontrolovaných plazmidech. Dále se pracovalo s plazmidy 1T a 1Y.

Obdobně byl připraven plazmid *pDCV* s konstruktem *SPI-2-T-apo*. Konstrukt byl ligován do *pDCV* pomocí TA klonování, proběhlo odsolení ligační směsi a ta byla použita pro elektroporaci *E. coli*. Plazmidy izolované z tekutého média byly podrobeny kontrolnímu štěpení *EcoRI* a elektroforéze. Takto identifikovaný správný klon byl sekvenován s primerem *SL-F*, čímž byla ověřena bezchybnost sekvence.



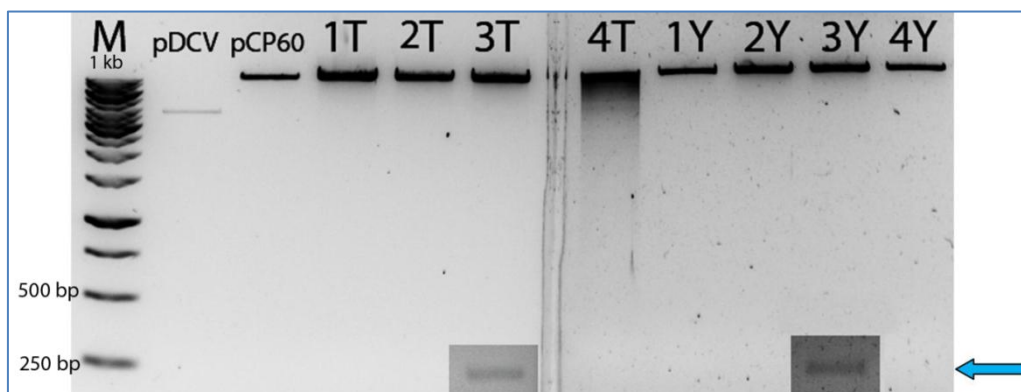
**Obrázek 5.2:** Ověření plazmidů *pDCV*, do nichž byly vkládány inzerty *SPI-2-T* (1T - 8T) a *SPI-2-Y* (1Y - 8Y). Šipka ukazuje přítomnost inzertů *SPI-2-T* a *SPI-2-Y* o velikosti ~140 bp, vyštěpených kontrolním restričním štěpením pomocí enzymu *EcoRI*. Jako marker molekulových vah použit GeneRuler 1 kb DNA Ladder (M).

### 5.3. PŘÍPRAVA A OVĚŘOVÁNÍ PLAZMIDU *PCP60* S INZERTY *SPI-2-T*, *SPI-2-Y* A *SPI-2-T-APO*

Pro ligaci konstruktů *SPI-2-T*, *SPI-2-Y* a *SPI-2-T-apo* do plazmidu *pCP60* byl použit plazmid *pCP60-GFP* (s *GFP* genem vloženým mezi restriční místa pro *Bam*HI a *Kpn*I). Tento plazmid byl štěpen enzymy *Xba*I a *Kpn*I. Tím byl plazmid připraven pro vložení restričních fragmentů připravených variant genů *SPI-2* a navíc byla provedena kontrola, že štěpení plazmidu proběhlo správně (tedy že byl štěpen oběma enzymy), neboť na kontrolní elektroforéze bylo možno pozorovat jak rozštěpený plazmid, tak vyštěpený úsek.

Konstrukty *SPI-2-T* a *SPI-2-Y* byly ligovány do takto naštěpeného plazmidu *pCP60*, následně proběhlo odsolení v odsolovacích kolonkách a elektroporace do *E. coli*. Bakterie byly přeneseny na pevné LB médium s kanamycinem. Z narostlých kolonií byly izolovány plazmidy a naštěpeny enzymy *Xba*I a *Kpn*I, čímž se identifikovaly správné klony. Byly vybrány klony s vyštěpeným úsekem *SPI-2* na elektroforéze (Obrázek 5.3), konkrétně 3T a 3Y, se kterými se dále pracovalo. Bezchybnost sekvencí byla poté ověřena sekvenací. Ověřené plazmidy *pCP60-SPI-2-T* a *pCP60-SPI-2-Y* byly elektroporací vneseny do *A. tumefaciens* a poté vysety na pevné LB médium s kanamycinem a rifampicinem. Přítomnost genu *SPI-2* v několika vybraných koloniích byla ověřena pomocí PCR reakcí, do nichž byla namísto templátové DNA vložena malá část bakteriální kolonie.

Plazmid *pCP60* nesoucí konstrukt *SPI-2-T-*apo** byl připraven obdobným způsobem: Konstrukt *SPI-2-T-*apo** byl ligován do plazmidu *pCP60* naštěpeného enzymy *Xba*I a *Kpn*I, proběhlo odsolení a elektroporace do *E. coli*. Izolované plazmidy byly naštěpeny a analyzovány na elektroforéze (Obrázek 5.4). Úsek na kontrolní elektroforéze měl v tomto případě velikost ~240 bp. Vybraný správný klon byl sekvenován s primerem *SL-F*. Sekvence potvrdila, že sekvence je v pořádku.



**Obrázek 5.3:** Ověření plazmidů *pCP60* po elektroporaci *A. tumefaciens*. Plazmid byl štěpen enzymy *Xba*I a *Kpn*I. Úsek o velikosti ~140 bp ukazuje na přítomnost genu *SPI-2*. Zkoušené klony pro variantu *SPI-2-T* jsou označeny 1T až 4T, pro variantu *SPI-2-Y* jsou označeny 1Y až 4Y. Úsek je zesílen (ztmaven) pomocí grafického programu Adobe Photoshop CS5 a jeho poloha je vyznačena šipkou. Jako marker byl použit 1 kb marker. Jako kontrola byly naneseny ještě plazmidy *pCP60* a *pDCV*.



**Obrázek 5.4:** Ověření plazmidu *pCP60* po elektroporaci *A. tumefaciens*. Plazmid byl štěpen enzymy *Xba*I a *Kpn*I. Úsek o velikosti ~240 bp ukazuje na přítomnost genu *SPI-2-*apo**. Tento úsek je zesílen pomocí grafického programu Adobe Photoshop CS5 a jeho poloha je vyznačena šipkou. Jako marker byl použit 1 kb marker.

#### 5.4. TRANSFORMACE TABÁKU

Čerstvě narostlá kolonie *A. tumefaciens* s vneseným plazmidem *pCP60* s genem *SPI-2-T* byla zaočkována do tekutého MPB média s kanamycinem a rifampicinem. Zároveň byla zaočkována jedna čerstvě narostlá kolonie *A. tumefaciens* transformovaná binárním vektorem nesoucím virový supresor silencingu *p19*. Bakterie byly aerobně kultivovány při 28 °C přes noc do stacionární fáze a připraveny k infiltraci. Listy tabáku byly transformovány směsí suspenze *A. tumefaciens* s genem *p19* a s genem *SPI-2-T*. Celé infiltrované listy byly sklizeny po 2, 4 a 6ti dnech. Sklizené listy byly použity pro izolaci proteinů za účelem detekce proteinu SPI-2, který by měl být v buňkách infiltrovaných listů transientně exprimován.

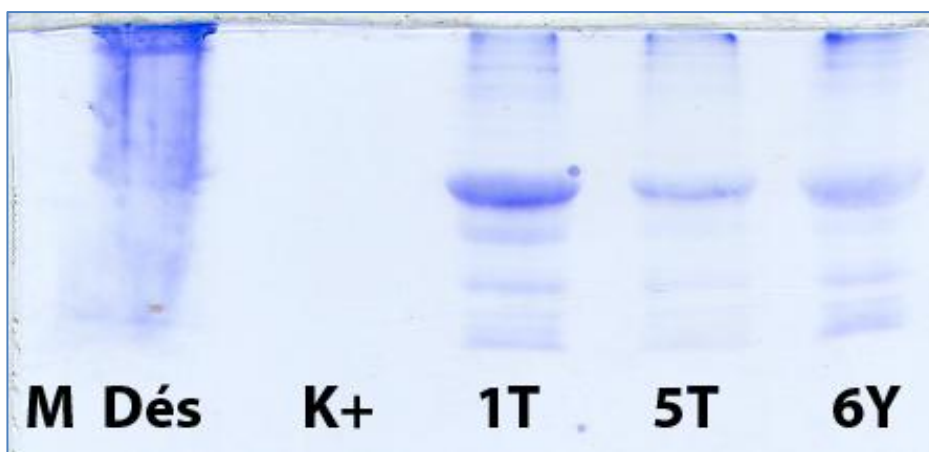
#### 5.5. TRANSFORMACE LILKU BRAMBORU

Listy bramboru byly transformovány oběma variantami genu *SPI-2*. Kokultivace listů s *A. tumefaciens* probíhala dva dny. Standardně následuje po kokultivaci přenos listů na CIM médium s růstovými regulátory a antibiotiky kanamycinem a claforanem a po sedmi dnech se listy přenášejí na SIM médium, což se poté každý týden opakuje a postupně se odřezávají regenerující prýty rostoucí z kalusů. Při první transformaci se při přípravě CIM média vlivem nepozornosti stala chyba a místo claforanu byl do média přidán rifampicin v koncentraci standardně používané v bakteriálních médiích (100 mg/l). Když byla tato chyba po dvou dnech kultivace zjištěna, byly listy přeneseny na CIM médium s koncentrací claforanu zvýšenou na 500 mg/l (pro účinnější potlačení agrobaktéria, které se mohlo na listech pomnožovat o 2 dny déle). Zbýlých 5 dní byly listy kultivovány na tomto médiu. Poté byly přeneseny na SIM médium s koncentrací claforanu zvýšenou na 500 mg/l. Navzdory očekávání probíhala regenerace takto nestandardně kultivovaných listů nebývale účinně a rychle, proto byla část následné experimentální práce věnována analýze příčin tohoto jevu.

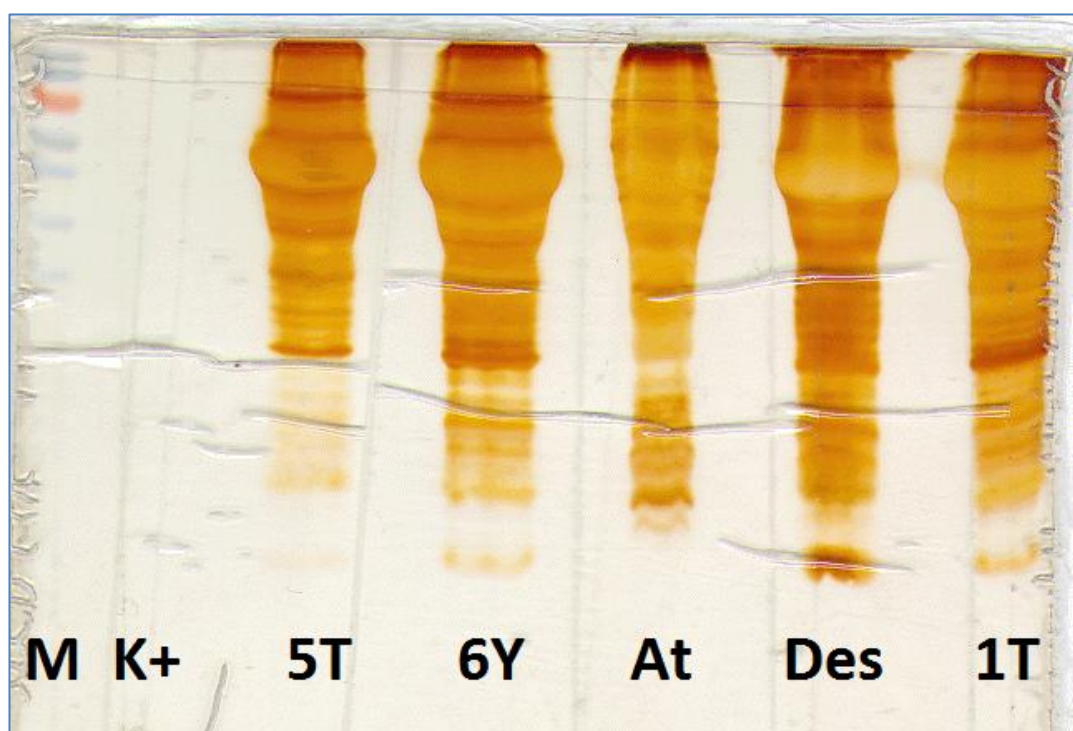
## 5.6. ANALÝZA EXPRESE *SPI-2* V ROSTLINÁCH

### 5.6.1. Detekce proteinu *SPI-2*

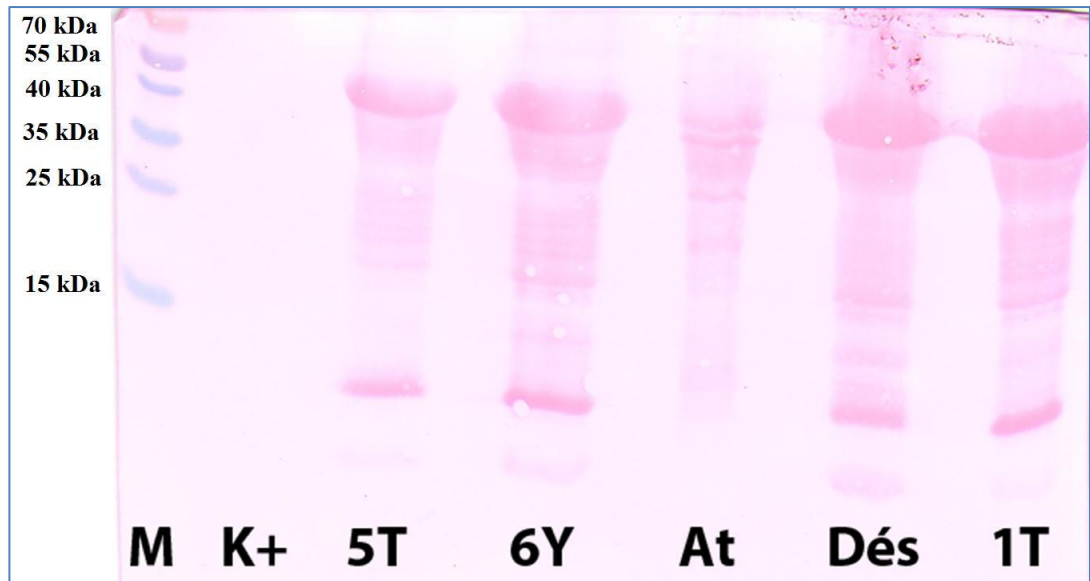
Potenciální zvýšení odolnosti bramboru vůči hmyzím škůdcům v důsledku provedené transformace by mělo korelovat s množstvím funkčního proteinu *SPI-2*. Proto byla nejprve provedena analýza exprese vnesených genů na úrovni proteinů. Byly izolovány proteiny a provedena SDS polyakrylamidová elektroforéza. Jako pozitivní kontrola byl použit zkrácený protein NtHsp90\_MT o velikosti 33 kDa obsahující hexa-Histidinovou kotvu (laskavě poskytla Bc. Martina Benáková) a vzorek proteinů izolovaných z *A. tumefaciens* nesoucí plazmid *pCP60* s inzertem *SPI-2-T* pod kontrolou CaMV 35S promotoru, který je v *A. tumefaciens* funkční – produkt *GFP* (Green Fluorescent Protein) genu umístěného pod tímto promotorem je v *A. tumefaciens* snadno pozorovatelný. Jako negativní kontrola byl použit vzorek proteinů izolovaných z netransformovaného *S. tuberosum* L. cv. *Désirée*. Pro proteinovou elektroforézu byl nejprve použit 10% gel, proteiny přeneseny na membránu, následně barveny Coomassie Blue (ukázka – Obrázek 5.5) nebo stříbrem (ukázka – Obrázek 5.6). Proteiny s hexa-Histidinovou kotvou byly na membráně vizualizovány protilátkami a pomocí luminiscence v ECL systému. Následně byla membrána obarvena pomocí Ponceau S (ukázka – Obrázek 5.7). I přes opakované pokusy o optimalizaci separace (jako vhodnější se ukázalo být použití 15% gelu) i následného značení se však nepodařilo protein *SPI-2* detekovat, a to ani z rostlinného materiálu (z transientně transformovaného tabáku a ze stabilních transformantů bramboru), ani z bakterií. Pozitivní kontrola (K+) – vizualizovaný protein NtHsp90\_MT (33 kDa) obsahující hexa-Histidinovou kotvu – přitom dokládá správné technické zvládnutí experimentálního postupu (Obrázek 5.8).



**Obrázek 5.5:** Ukázka separace proteinů na SDS PAGE - barvení Coomasie Brilliant Blue. Analyzovány byly dvě linie bramboru transformované genem *SPI-2-T* (1T a 5T) a jedna linie transformovaná genem *SPI-2-Y* (6Y). Jako pozitivní kontrola (K+) byl použit čistý protein NtHsp90\_MT (na gelu není vzhledem k nízké koncentraci viditelný). Jako negativní kontrola (Dés) byly použity proteiny z netransformované linie bramboru a jako marker molekulových vah (M) byl použit „PageRuler Prestained Protein Ladder“ – separace proteinů u těchto dvou vzorků ale neproběhla optimálně kvůli mechanickému poškození gelu.



**Obrázek 5.6:** Ukázka separace proteinů na SDS PAGE - barvení stříbrem. Analyzovány byly dvě linie bramboru transformované genem *SPI-2-T* (1T a 5T) a jedna linie transformovaná genem *SPI-2-Y* (6Y). Jako pozitivní kontrola (K+) byl použit protein NtHsp90\_MT (na gelu není vzhledem k nízké koncentraci viditelný) a proteiny izolované z *A. tumefaciens*. Jako negativní kontrola (Dés) byly použity proteiny z netransformované linie bramboru. Jako marker (M) byl použit „PageRuler Prestained Protein Ladder“.



**Obrázek 5.7:** Ukázka separace proteinů na SDS PAGE - barvení membrány s přenesenými proteiny pomocí Ponceau S. Analyzovány byly dvě linie bramboru transformované genem *SPI-2-T* (1T a 5T) a jedna linie transformovaná genem *SPI-2-Y* (6Y). Jako pozitivní kontrola (K+) byl použit protein NtHsp90\_MT (na gelu není vzhledem k nízké koncentraci viditelný) a proteiny izolované z *A. tumefaciens*. Jako negativní kontrola (Dés) byly použity proteiny z netransformované linie bramboru. Jako marker (M) byl použit „PageRuler Prestained Protein Ladder“.

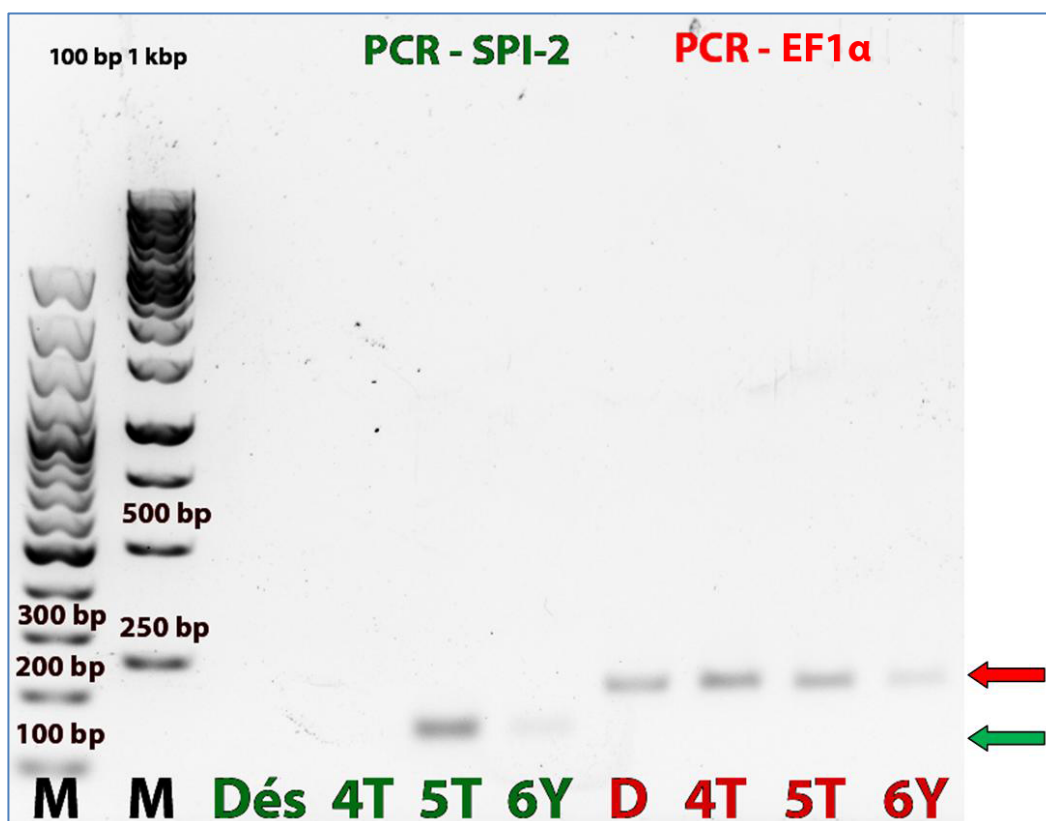


**Obrázek 5.8:** Imunodetekce His-tagovaných proteinů na membráně s přenesenými proteiny z SDS PAGE – detekce na RTG filmu po vyvolání pomocí ECL systému. Analyzovány byly dvě linie bramboru transformované genem *SPI-2-T* (1T a 5T) a jedna linie transformovaná genem *SPI-2-Y* (6Y). Jako pozitivní kontrola (K+) byl použit protein NtHsp90\_MT, jehož signál je označen šipkou a proteiny izolované z *A. tumefaciens*. Jako negativní kontrola (Dés) byly použity proteiny z netransformované linie bramboru. Jako marker (M) byl použit „PageRuler Prestained Protein Ladder“.



### 5.6.2. Detekce transkriptu *SPI-2*

Pro analýzu transkripce *SPI-2* byly vybrány 3 transformované linie bramboru: 4T, 5T a 6Y. Byl také použit vzorek RNA z netransformované linie *S. tuberosum* L. cv. *Désirée* jako negativní kontrola. Pomocí reverzní transkripce s oligo-T primerem byla vytvořena cDNA a s primery *SPI-2-T-F* (respektive *SPI-2-Y-F*) a *SPI-2-R* byly amplifikovány cDNA obou variant genu *SPI-2*. Jako „interní standard“ byl amplifikován úsek elongačního faktoru *EF1α* pomocí primerů *EF1αF* a *EF1αR*. Výsledek elektroforézy produktů PCR reakce s primery genů *SPI-2* i produktů reakce s primery interního standardu dokumentuje Obrázek 5.9.



**Obrázek 5.9:** Detekce transkriptů variant *SPI-2* a *EF1α*. Detekce genů *SPI-2-T*, *SPI-2-Y* a *EF1α* byla provedena pomocí RT-PCR s příslušnými primery. Byla analyzována cDNA 2 linií bramboru transformovaných genem *SPI-2-T* (5T a 6T) a 1 linií transformované genem *SPI-2-Y* (6Y). Umístění produktů této PCR reakce je vyznačeno zelenou šipkou. Jako negativní kontrola (Dés) byla použita cDNA z netransformované linie bramboru. Zeleným písmem jsou popsány produkty PCR reakce s primery transgenů (*SPI-2-T* a *SPI-2-Y*). Červeným písmem je popsán interní standard. Umístění produktů PCR reakce s primery pro *EF1α* na gelu je vyznačeno červenou šipkou. Použity byly oba molekulové markery (M 100 bp a M 1 kbp).

### **5.6.3. Analýza intaktnosti expresní kazety inzertovaného genu SPI-2**

Pro analýzu genu *SPI-2* byla použita jedna linie od každé varianty: 5T a 6Y. Ze vzorků těchto linií byla izolována celková DNA, ta byla použita jako templát pro PCR reakci s primery *35S methyl* a *pAR* a podrobena elektroforéze. Místo pro navázání primeru *35S methyl* je lokalizováno v promotoru 250 bp před počátkem transkripce genu *SPI-2*. Místo pro navázání primeru *pAR* je lokalizováno v terminátoru 200 bp za koncem genu *SPI-2*. Výsledný úsek by měl mít délku ~580 bp, což odpovídalo délce získaného produktu PCR. Sekvence s primerem *35S methyl* potvrdila úplnou správnost sekvence.

## **5.7. ANALÝZA PŘÍČIN VYŠŠÍ ÚČINNOSTI REGENERACE LISTŮ BRAMBORU PO TRANSFORMACI**

Nebývale účinná a rychlá regenerace po dočasné kultivaci listů na médiích s nestandardním složením antibiotik mohla mít více příčin. Změněné chování mohlo být způsobeno buď efektem rifampicinu, delší kokultivací s *A. tumefaciens* (jeho růst nebyl první dva dny po kokultivaci blokován claforanem) a/nebo následnou zvýšenou koncentrací claforanu v CIM a SIM médiu. Proto byl proveden pokus s několika variantami složení média a průběhu postkokultivačního ošetření. Varianta 1 představuje standardní postup. Varianta 2 zkoumá efekt rifampicinu a delší kokultivace. Varianta 3 opakuje chybný postup. Varianta 4 zkoumá samotný efekt delší kokultivace s *A. tumefaciens*. Varianta 5 zkoumá efekt delší kokultivace s *A. tumefaciens* a následné zvýšené koncentrace claforanu v SIM médiu. Varianta 6 zkoumá efekt rifampicinu v CIM médiu. Varianta 7 zkoumá efekt zvýšené koncentrace claforanu v CIM a SIM médiích. Změny ve složení médií jsou přehledně znázorněny v Tabulce 5.1.

Ve 2. týdnu kultivace na médiu se u všech variant začaly objevovat první kalusy. Konkrétní počty kalusů i výhonků byly zaznamenávány od 3. týdne. Počty kalusů od 3. do 6. týdne jsou uvedeny v Tabulce 5.2, počty výhonků v Tabulce 5.3. V 6. týdnu bylo také zaznamenáno rozpětí délek výhonků u jednotlivých variant a počet odřezatelných výhonků (Tabulka 5.4). V Grafu 5.1 jsou znázorněny počty kalusů, počty

výhonků a počty odřezatelných výhonků v 6. týdnu kultivace listů na médiu u jednotlivých variant. Zároveň je znázorněn poměr počtu výhonků vůči počtu kalusů a poměr počtu odřezatelných výhonků vůči počtu kalusů. Tyto poměry vyjadřují účinnost regenerace kalusů.

Regenerace v médiu podle varianty 7 byla jednoznačně nejefektivnější, a to jak podle počtu výhonků i počtu odřezatelných výhonků, které výrazně předčily ostatní varianty, tak, a to hlavně, podle obou poměrů vyjádřených v Grafu 5.2 (počet výhonků ku počtu kalusů a počet odřezatelných výhonků ku počtu kalusů).

Varianta 3 byla druhá nejméně úspěšná z hlediska všech tří parametrů vyjádřených v Grafu 5.1 (počtu kalusů, počtu výhonků i počtu odřezatelných výhonků). Tato varianta měla však v 6. týdnu nejdelší výhonky (až 30 mm), zatímco varianta 7 měla výhonky maximálně 25 mm dlouhé a umístila se tím v tomto parametru na druhém místě. Jelikož ale nejzásadnější pro proces regenerace po transformaci je tvorba odřezatelných výhonků, nejméně úspěšná stále zůstává varianta 7.

**Tabulka 5.1:** Přehled testovaných variant postkokultivačního ošetření po transformaci bramboru. Barevně jsou pro názornost vyznačeny změny oproti standardnímu postupu. Zeleným písmem je zvýrazněno přidání rifampicinu. Červeným písmem je zvýrazněna zvýšená koncentrace claforanu. Modře je zvýrazněna absence claforanu.

V a r i a n t a	Hypotéza	CIM médium 1. a 2. den kultivace		CIM médium 3. až 7. den kultivace	Změny oproti standardnímu SIM médiu od 8. dne dále
		Koncentrace claforanu	Koncentrace rifampicinu	Koncentrace claforanu	Koncentrace claforanu
1	Standardní postup	300 mg/l	-	300 mg/l	300 mg/l
2	Efekt rifampicinu a delší kokultivace	-	100 mg/l	300 mg/l	300 mg/l
3	Opakování chyby: Efekt rifampicinu, delší kokultivace a zvýšené koncentrace claforanu od 3. dne kultivace	-	100 mg/l	500 mg/l	500 mg/l
4	Delší kokultivace	-	-	300 mg/l	300 mg/l
5	Delší kokultivace a zvýšené koncentrace claforanu od 3. dne kultivace	-	-	500 mg/l	500 mg/l
6	Efekt rifampicinu	300 mg/l	100 mg/l	300 mg/l	300 mg/l
7	Efekt claforanu	500 mg/l	-	500 mg/l	500 mg/l

**Tabulka 5.2:** Počty kalusů od 3. do 6. týdne kultivace listů bramboru na SIM médiu po transformaci.

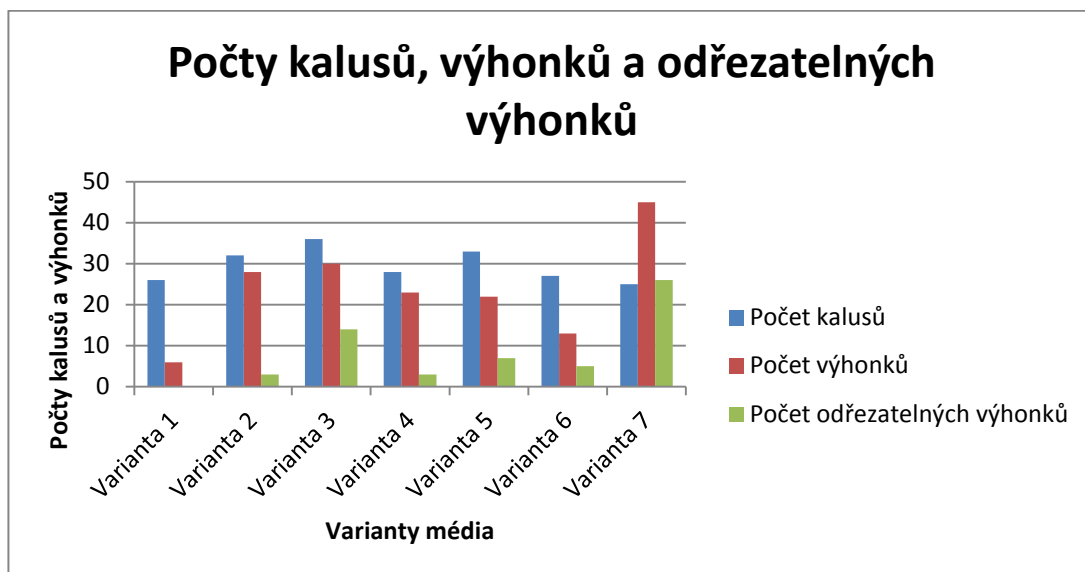
Doba kultivace na SIM médiu	Varianta 1	Varianta 2	Varianta 3	Varianta 4	Varianta 5	Varianta 6	Varianta 7
3. týden	18	24	32	25	24	17	15
4. týden	20	30	34	26	25	19	17
5. týden	23	32	36	28	30	27	25
6. týden	26	32	36	28	33	27	25

Tabulka 5.3: Počty výhonků od 3. do 6. týdne kultivace listů bramboru na SIM médiu po transformaci.

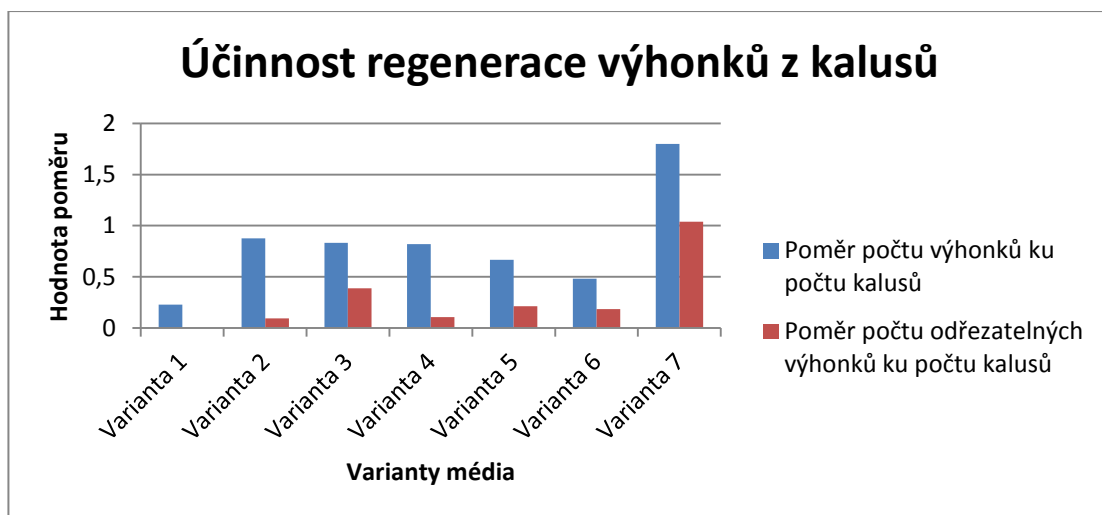
Doba kultivace na SIM médiu	Varianta 1	Varianta 2	Varianta 3	Varianta 4	Varianta 5	Varianta 6	Varianta 7
3. týden	0	0	3	1	1	1	7
4. týden	0	1	6	2	2	2	16
5. týden	2	10	15	8	10	9	22
6. týden	6	28	30	23	22	13	45

Tabulka 5.4: Délky výhonků a počet odřezatelných výhonků po 6. týdnu kultivace listů bramboru na SIM médiu po transformaci.

Varianta	1	2	3	4	5	6	7
Délka výhonků (mm)	5-10	5-30	5-30	5-20	5-20	5-15	5-25
Počet odřezatelných výhonků (mm)	0	3	14	3	7	5	26



Graf 5.1: Počty vytvořených kalusů, výhonků a odřezatelných výhonků u různých variant složení média a postkultivačního ošetření listů bramboru po transformaci *A. tumefaciens*. Detaily jednotlivých variant viz Tabulka 5.1.



**Graf 5.2:** Účinnost regenerace výhonků z kalusů - porovnání poměrů celkového počtu výhonků/odřezatelných výhonků ku počtu kalusů mezi jednotlivými variantami složení média a postkokultivačního ošetření listů bramboru po transformaci *A. tumefaciens*. Detaily jednotlivých variant viz Tabulka 5.1.



Varianta 1



Varianta 2



Varianta 3



Varianta 4



Varianta 5



Varianta 6





**Varianta 7**

**Obrázek 5.10:** Série snímků jednotlivých variant v průběhu postkokultivačního ošetření po 6. týdnu kultivace na SIM médiu.



## 6. DISKUZE

### 6.1. EXPRESE GENU *SPI-2* V ROSTLINÁCH

V projektech zaměřených na zvýšení odolnosti rostlin vůči škůdcům byly provedeny mnohé pokusy o dosažení tohoto cíle s využitím typů molekul přirozeně se vyskytujících při jejich obranných mechanismech. Časté je např. využití proteázových inhibitorů. Pomocí exprese oryzacystatinu I (cysteinového proteázového inhibitoru z rýže) se např. podařilo zvýšit odolnost bramboru vůči mandelince bramborové (Benchekroun *et al.*, 1994), nebo expresí *BvSTI* z řepy červené (*Beta vulgaris* serine proteinase inhibitor) v tabáku *N. benthamiana* se docílilo zvýšené odolnosti vůči larvám tří druhů motýlích škůdců tabáku (Smigocki *et al.*, 2013).

Do skupiny inhibitorů proteáz patří i v této práci používaný SPI-2, řazený mezi inhibitory serinových proteáz, které rostliny přirozeně exprimují při svých obranných reakcích (Jamal *et al.*, 2013). Patří mezi inhibitory Kazalového typu. Jejich domény mají v sekvenci 6 konzervovaných cysteinových zbytků, které mezi sebou tvoří disulfidové můstky, a tím zajišťují proteinu správnou konformaci (Bode & Huber, 1992). Ta zahrnuje 3 smyčky: A, B, a C. Velikost takto vytvořeného kruhu a konkrétní aminokyselinové zbytky jsou charakteristické pro tuto rodinu. Není zřejmá žádná konsenzuální sekvence v reaktivním místě. Specifita k určitým druhům proteináz je určena aminokyselinovým zbytkem v místě P1 (Kellenberg *et al.*, 1995).

Funkční SPI-2 byl identifikován jako nejkratší proteázový inhibitor Kazalového typu u živočichů. Zatímco inhibitory Kazalového typu jsou zpravidla složeny z více domén, které sestávají z 50 - 60 aminokyselin, SPI-2 je tvořen jedinou doménou s 36 aminokyselinovými zbytky a má velikost 3993 Da. Kromě své velikosti má i další unikátní znaky. Volný segment na N-konci je redukován na jeden aminokyselinový zbytek. Nepřítomnost zbytků CysI a CysV vylučuje formaci A-kruhu a umožňuje větší flexibilitu C-kruhu. Dále nepřítomnost několika aminokyselinových zbytků okolo místa, kde se CysV zpravidla nachází, má za následek zkrácení a změnu  $\alpha$ -helixového segmentu. Ze struktury lze soudit, že délka a uspořádání B-kruhu, včetně expozice místa P1 a pozice C-konce vůči B-smyčce jsou pro aktivitu inhibitorů Kazalového typu určující (Kellenberg *et al.*, 1995).

Jelikož bylo prokázáno, že škůdci jsou schopni se adaptovat na inhibitory proteáz exprimované v rostlinách tím, že začnou produkovat proteázy necitlivé k inhibitorům (McManus *et al.*, 1994, DeLeo *et al.*, 1998), může být použití tohoto hmyzího genu, kódujícího protein s unikátními vlastnostmi, výhodné, neboť se s jeho produktem patogeny a škůdci ještě nesetkali a snížila se tím pravděpodobnost, že si vůči němu rychle vyvinou rezistenci. Navíc jsou pro testování rezistence rostlin k dispozici linie bramboru transformované dvěma variantami genu *SPI-2*, jejichž produkty mají mírně odlišné vlastnosti právě díky rozdílné aminokyselině v místě P1. Protein *SPI-2-T* je díky Thr v místě P1 účinný především při inhibici bakteriální proteázy subtilizinu a houbové proteinázy K (Nirmala *et al.*, 2001). *SPI-2-Y* obsahuje v P1 místě Tyr, což mírně zeslabuje jeho inhibiční vlastnosti proteinázy K a subtilizinu, ale propůjčuje mu i schopnost slabě inhibovat trypsin (Sehnal *et al.*, nepublikované výsledky). Serinové proteázy obecně jsou nejčastějším typem proteáz u motýlů (*Lepidoptera*) a dvoukřídlých (*Diptera*, Matsumoto *et al.*, 1995, Srinivasan *et al.*, 2006). To naznačuje, že obě varianty proteinů mají vysoký potenciál pro využití vůči širokému spektru běžných patogenů a škůdců lilku bramboru.

Transformace lilku bramboru základní formou genu *SPI-2* (obsahující pouze hexa-Histidinovou kotvu) v předchozích pokusech jiných členů týmu se ukázala být neúčinná. Rostliny vykazovaly pouze malou a proměnlivou rezistenci a protein *SPI-2* se nepodařilo detekovat ani izolovat (Fischer, Sehnal *et al.*, nepublikované výsledky). Jelikož hladina transkriptu byla v transformovaných liniích vysoká, možnou příčinou nízké hladiny proteinu *SPI-2* mohl být nevhodný sekvenční kontext v okolí iniciačního kodónu, který mohl vést k neúčinné translaci. Proto byla k této základní formě genu pomocí adaptorových primerů přidána před iniciační kodón konsenzuální sekvence, která usnadňuje rozpoznání startovního kodónu malou ribozomální podjednotkou a usnadňuje tak iniciaci translace, čímž by měla zvyšovat hladinu translatovaných proteinů. Tato sekvence byla pojmenována podle Marilyn Kozak, která ji zkoumala u obratlovců (Kozak, 1987). V rostlinách je konsenzuální sekvence AACAAUGGC (Lütcke *et al.*, 1987). Ta byla použita pro úpravu základní formy genu *SPI-2* s výjimkou posledního C, které bylo zaměněno za T, aby nedošlo ke změně sekvence proteinu.

V této práci byl nejprve jednou variantou genu *SPI-2* (*SPI-2-T*) transientně transformován tabák pomocí agroinfiltrace. Tato metoda se osvědčila jako rychlá

a efektivní při zhodnocování exprese a účinku potenciálních genů rezistence využitelných při transformaci rostlin, např. genu pro inhibitor serinových proteáz z brukve zelené (BoPI, *Brassica oleracea* proteinase inhibitor, Leckie & Stewart, 2011). Mezi výhody této metody patří také eliminace rizika, že se začleněním transgenu ovlivní jiné geny, které by ovlivnily výsledek. Protein SPI-2-T se však v transformovaných rostlinách tabáku detekovat nepodařilo. I když analýza transkriptu nebyla provedena, nelze vyloučit, že důvod nepřítomnosti proteinu je stejný jako při transformaci lilku bramboru, o které je pojednáno dále.

Při analýze proteinů z transformovaných rostlin bramboru byly použity proteiny z netransformované linie bramboru jako negativní kontrola, a protein NtHsp90\_MT s hexa-Histidinovou kotvou a vzorek proteinů izolovaných z *A. tumefaciens* transformovaného genem *SPI-2-T* jako pozitivní kontrola. Nepodařilo se však detekovat protein SPI-2 ani u jedné z transformovaných linií ani u agrobaktéria, neboli hladina SPI-2 byla nižší než je detekční limit použité metody. Buďto byl primárně technický problém v samotné detekci poměrně krátkého His-tagovaného proteinu (cca 4 kDa), čemuž by nasvědčovala i absence signálu z extraktu z agrobaktéria, nebo je skutečně hladina proteinu SPI-2 jak u agrobaktéria, tak u rostlin velmi nízká.

Jelikož provedená analýza transkriptů ukázala, že minimálně u části transformovaných linií bramboru je dosahována vysoká hladina mRNA genu *SPI-2*, je pravděpodobné, že nízká hladina proteinu je způsobena buď neúčinnou translací anebo nestabilitou proteinu.

Při analýzách možných příčin nízké hladiny či nepřítomnosti proteinu SPI-2 v transformovaných rostlinách bylo testováno i další alternativní vysvětlení, že *A. tumefaciens* nesoucí plazmid s *SPI-2* bylo negativně ovlivněno vznikajícím proteinem SPI-2. V tom případě by probíhala selekce na bakterie nesoucí plazmid s mutací, která by bránila tvorbě funkčního proteinu SPI-2. V případě posunové mutace či mutace vedoucí ke vzniku předčasného terminačního kodónu by sice byl detekován transkript, ale nevznikal by z něj funkční protein. Byla proto izolována DNA z transformované linie bramboru, která vykazovala vysokou hladinu transkriptu genu *SPI-2*, byla provedena PCR s primery *35S methyl* a *SPI-2-R* a namnožený úsek obsahující téměř celou expresní kazetu byl sekvenován s primerem *35S methyl*. Sekvence však prokázala intaktnost kontrolované sekvence a tuto příčinu vyloučila.

Provedené úpravy sekvenčního kontextu iniciačního kodónu základní formy genu tedy buď nebyly dostatečné pro zvýšení iniciace translace, anebo protein SPI-2 není v cytoplazmě stabilní. Vnitřní prostředí buňky je velice dynamické a degradace proteinů je proces, který v buňce neustále probíhá, ať už se jedná o regulaci biologických procesů v buňce, nebo o odstraňování abnormálních proteinů vzniklých např. při působení stresu nebo vlivem mutací. Degradace proteinů probíhá pomocí několika komplexních proteolytických cest v závislosti na tom, v kterém buněčném kompartmentu se protein, který má být degradován, nachází. V případě cytoplazmatického proteinu bývá protein označen ubiquitinem a poté transportován do proteazomu, kde jsou proteiny degradovány (Vierstra, 1996). Jelikož protein SPI-2 mohl být v cytoplazmě odbouráván, byl v rámci diplomové práce vytvořen konstrukt *SPI-2-T-*apo**, směřovaný do apoplastu, kde by mohl být protein stabilnější a zároveň by se mohl lišit i mechanismus jeho účinku. Tento konstrukt je nyní připraven pro transformaci rostlin. Zda je možné touto cestou dosáhnout vyšších hladin SPI-2 a jaký bude účinek SPI-2 v apoplastickém prostoru ale ukáže až případné testování v rostlinách.

I když se tedy nepodařilo detekovat protein SPI-2, bylo by vhodné se problematikou dále zabývat a u transformovaných linií bramboru s vysokou mírou transkripce provést bioeseje na odolnost vůči patogenům či hmyzím škůdcům, neboť i nízká (nedetekovatelná) hladina proteinu by mohla rostlinám zajistit zvýšenou odolnost.

## **6.2. REGENERACE LISTŮ BRAMBORU PO TRANSFORMACI**

Transformace pomocí *A. tumefaciens*, půdního patogena dvouděložných rostlin, je jedna z nejčastěji využívaných metod pro transformaci rostlin. Za klasický protokol pro regeneraci bramboru po transformaci lze považovat protokol od Dietze *et al.*, 1995. Listy rostliny jsou při tomto postupu dva dny kokultivovány v médiu s přidanou suspenzí *A. tumefaciens* a poté následuje přenos na médium indukující tvorbu kalusu (CIM). Po týdnu následuje přenos na médium indukující tvorbu prýtů (SIM). CIM i SIM obsahují mimo jiné selekční antibiotikum a claforan ve standardní koncentraci 300 mg/l. Claforan je širokospektré antibiotikum, které po kokultivaci zajišťuje

eliminaci *A. tumefaciens*. Regenerace prýtů z kalusů je kritickým krokem při transformaci a většinou trvá minimálně 6 týdnů.

Jelikož se objevily nečekaně dobré výsledky při původně omylem změněném složení CIM a SIM média a postkokultivačním postupu, byl celý postup opakován spolu s analýzou všech dílčích faktorů, které na výsledek mohly mít vliv. Mohl to být buď efekt zvýšené hladiny claforanu, přidání rifampicinu, delší kokultivace listů s agrobaktériem, anebo některá z kombinací těchto faktorů.

Ze sedmi zkoumaných variant byla jednoznačně nejefektivnější varianta 7, při níž byl jediným změněným faktorem zvýšená koncentrace claforanu na 500 mg/l. Lze tak soudit nejen podle počtu odřezatelných výhonků, což je nejdůležitější parametr, ale napovídají tomu i další tři porovnávané parametry (počet výhonků, poměr počtu výhonků ku počtu kalusů a poměr počtu odřezatelných výhonků ku počtu kalusů) z celkem pěti porovnávaných parametrů. Jelikož počet kalusů se významně nelišil, rozdíly v ošetření patrně působily až na úrovni regenerace. Velmi zajímavým zjištěním bylo i to, že standardní postup (varianta 1) dosáhl u všech parametrů nejhorsích výsledků a jako jediný na konci 6týdenního experimentu nedisponoval ani jedním odřezatelným výhonkem. To naznačuje, že každý z faktorů zkoumaných v ostatních variantách měl zřejmě určitý pozitivní vliv. Jelikož počet odřezatelných výhonků je nejdůležitější parametr úspěšnosti regenerace, lze soudit, že největší pozitivní vliv na ni měl claforan. Efekt rifampicinu a delší kokultivace listů s agrobaktériem byl slabý a pro jeho spolehlivé vyhodnocení by byl nutný větší počet opakování experimentu.

Pozitivní efekt claforanu mohl být způsobem přímo působením claforanu na rostlinné mechanismy regulace růstu. Claforan je širokospektré  $\beta$ -laktamové antibiotikum. Patří do skupiny penicilinů a jeho struktura je podobná carbenicilinu, který má strukturu podobnou auxinu a při jeho degradaci vzniká látka s podobnými efekty jako slabá PAA (phenylacetic acid, fenyloctová kyselina, jeden ze zástupců auxinu, Ling *et al*, 1998; Robert *et al*, 1989). Jelikož auxin je jedním z hlavních aktérů při regulaci růstu, mohl by claforan přímo působit na zrychlenou tvorbu výhonků i zrychlený růst regenerujících prýtů.

Zpětnou analýzou literárních zdrojů bylo zjištěno, že pozitivní efekt zvýšené koncentrace claforanu byl již pozorován, a to např. u citrusů (de Oliveira *et al.*, 2010), borovice (Humara & Ordás, 1999) a kukuřice (Danilova & Dolgikh, 2004).

Při transformaci rostlin rodu *Solanum* byla zvýšená koncentrace claforanu používána i jinými výzkumníky (Koivu *et al.*, 1995). Avšak její pozitivní vliv na regeneraci *Solanum tuberosum* podle dostupných zdrojů přímo zkoumán nebyl.

Nelze ani vyloučit, že claforan měl pozitivní vliv na regeneraci díky důkladnější eliminaci *A. tumefaciens*, které pro explantáty představuje stres. Snížením stresu se mohla zvýšit účinnost regenerace.

## 7. ZÁVĚRY

- Upravením základní formy genu *SPI-2* byly vytvořeny tři konstrukty pro expresi v rostlinách. *SPI-2-T* a *SPI-2-Y* pro lokalizaci proteinu do cytoplazmy a *SPI-2-T-apo* se signální sekvencí pro směřování proteinu do apoplastu.
- Konstrukt *SPI-2-T* byl použit pro transientní transformaci listů *Nicotiana benthamiana*. Přítomnost proteinu SPI-2-T se v tabáku nepodařilo prokázat.
- Konstrukty *SPI-2-T* a *SPI-2-Y* byly použity pro stabilní transformaci *Solanum tuberosum*. Protein SPI-2 se ani u jedné transformované linie nepodařilo detekovat, přestože některé z linií vykazují vysokou hladinu transkriptu genu *SPI-2*. Důvody selhání detekce proteinu mohou být následující:
  - Úpravy základní formy genu nebyly dostatečné a protein vzniká ve velmi malém množství.
  - Absence detekce je způsobena technickou nedostatečností použité metody pro takto krátký protein (4 kDa).
  - Protein je v cytoplazmě nestabilní.
- Z důvodu možných problémů se stabilitou proteinu SPI-2 v cytoplazmě byl vytvořen konstrukt *SPI-2-T-apo* se signální sekvencí pro směřování proteinu do apoplastu, kde by mohl být stabilnější.
- Při transformacích bramboru byl zjištěn výrazný pozitivní efekt zvýšené hladiny claforanu (500 mg/l) na účinnost a rychlost regenerace prýtlů z kalusů po transformaci.

## 8. SEZNAM LITERATURY

Akhond MAY, Machray GC (2009) BIOTECH CROPS: TECHNOLOGIES, ACHIEVEMENTS AND PROSPECTS. *Euphytica* **166**: 47-59

Al-Mughrabi KI, Vikram A, Peters RD, Howard RJ, Grant L, Barasubiye T, Lynch K, Poirier R, Drake KA, Macdonald IK, Lisowski SLI, Jayasuriya KE (2013) EFFICACY OF *PSEUDOMONAS SYRINGAE* IN THE MANAGEMENT OF POTATO TUBER DISEASES IN STORAGE. *Biological Control* **64**: 315-322

Baker B, Zambryski P, Staskawicz B, DineshKumar SP (1997) SIGNALING IN PLANT-MICROBE INTERACTIONS. *Science* **276**: 726-733

Benchekroun A, Michaud D, Nguyen-Quoc B, Overney S, Desjardins Y, Yelle S (1994) SYNTHESIS OF ACTIVE ORYZACYSTATIN I IN POTATO PLANTS. *Plant Cell Reports* **14**: 585-588

Bishop CD, Cooper RM (1983) AN ULTRASTRUCTURAL-STUDY OF ROOT INVASION IN 3 VASCULAR WILT DISEASES. *Physiological Plant Pathology* **22**: 15-18

Blumwald E, Aharon GS, Lam BCH (1998) EARLY SIGNAL TRANSDUCTION PATHWAYS IN PLANT-PATHOGEN INTERACTIONS. *Trends in Plant Science* **3**: 342-346

Bode W, Huber R (1992) NATURAL PROTEIN PROTEINASE INHIBITORS AND THEIR INTERACTION WITH PROTEINASES. *European Journal of Biochemistry* **204**: 433-451

Bown DP, Wilkinson HS, Gatehouse JA (1997) DIFFERENTIALLY REGULATED INHIBITOR-SENSITIVE AND INSENSITIVE PROTEASE GENES FROM THE PHYTOPHAGOUS INSECT PEST, *HELICOVERPA ARMIGARA*, ARE MEMBERS OF COMPLEX MULTIGENE FAMILIES. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **27**: 625-638

Boyer JS (1982) PLANT PRODUCTIVITY AND ENVIRONMENT. *Science* **218**: 443-448

Bradley DJ, Kjellbom P, Lamb CJ (1992) ELICITOR-INDUCED AND WOUND-INDUCED OXIDATIVE CROSS-LINKING OF A PROLINE-RICH PLANT-CELL WALL PROTEIN - A NOVEL, RAPID DEFENSE RESPONSE. *Cell* **70**: 21-30

Bradshaw JE, Mackay GR (1994) *Potato genetics*. Oxon: CAB International, Wallingford, Oxfordshire

Carling DE, Leiner RH (1986) ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF *RHIZOCTONIA-SOLANI* AND BINUCLEATE *RHIZOCTONIA-SOLANI*-LIKE



FUNGI FROM AERIAL STEMS AND SUBTERRANEAN ORGANS OF POTATO PLANTS. *Phytopathology* **76**: 725-729

Chilton MD, Drummond MH, Merlo DJ, Sciaky D, Montoya AL, Gordon MP, Nester EW (1977) STABLE INCORPORATION OF PLASMID DNA INTO HIGHER PLANT-CELLS - MOLECULAR-BASIS OF CROWN GALL TUMORIGENESIS. *Cell* **11**: 263-271

Cohen SN, Chang ACY, Boyer HW, Helling RB (1973) CONSTRUCTION OF BIOLOGICALLY FUNCTIONAL BACTERIAL PLASMIDS IN-VITRO. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **70**: 3240-3244

Corsini DL, Pavek JJ, Davis JR (1988) *VERTICILLIUM* WILT RESISTANCE IN NONCULTIVATED TUBER-BEARING *SOLANUM* SPECIES. *Plant Disease* **72**: 148-151

Cullen DW, Toth IK, Pitkin Y, Boonham N, Walsh K, Barker I, Lees AK (2005) USE OF QUANTITATIVE MOLECULAR DIAGNOSTIC ASSAYS TO INVESTIGATE *FUSARIUM* DRY ROT IN POTATO STOCKS AND SOIL. *Phytopathology* **95**: 1462-1471

Dangl JL, Jones JDG (2001) PLANT PATHOGENS AND INTEGRATED DEFENCE RESPONSES TO INFECTION. *Nature* **411**: 826-833

Danilova SA, Dolgikh YI (2004) THE STIMULATORY EFFECT OF THE ANTIBIOTIC CEFOTAXIME ON PLANT REGENERATION IN MAIZE TISSUE CULTURE. *Russian Journal of Plant Physiology* **51**:559-562

Davis JR, Huisman OC, Westermann DT, Hafez SL, Everson DO, Sorensen LH, Schneider AT (1996) EFFECTS OF GREEN MANURES ON *VERTICILLIUM* WILT OF POTATO. *Phytopathology* **86**: 444-453

Davis JR, Sorensen LH (1986) INFLUENCE OF SOIL SOLARIZATION AT MODERATE TEMPERATURES ON POTATO GENOTYPES WITH DIFFERING RESISTANCE TO *VERTICILLIUM-DAHLIAE*. *Phytopathology* **76**: 1021-1026

Deblaere R, Bytebier B, Degreve H, Deboeck F, Schell J, Vanmontagu M, Leemans J (1985) EFFICIENT OCTOPINE TI PLASMID-DERIVED VECTORS FOR *AGROBACTERIUM*-MEDIATED GENE-TRANSFER TO PLANTS. *Nucleic Acids Research* **13**: 4777-4788

De Leo F, Bonadé-Bottino MA, Ceci LR, Raffaele G, Jouanin L (1998) OPPOSITE EFFECT ON *SPODOPTERA LITTORALIS* LARVAE OF HIGH EXPRESSION LEVEL OF A TRYPSIN PROTEINASE INHIBITOR IN TRANSGENIC PLANTS. *Plant Physiology* **180**: 997-1004

De Oliviera MLP, Costa MGC, da Silva CV, Otoni WC (2010) GROWTH REGULATORS, CULTURE MEDIA AND ANTIBIOTICS IN THE IN VITRO SHOOT REGENERATION FROM MATURE TISSUE OF CITRUS CULTIVARS. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* **45**: 654-660

Dietze J, Blau A, Willmitzer (1995) L. *AGROBACTERIUM*-MEDIATED TRANSFORMATION OF POTATO (*SOLANUM TUBEROSUM*). In: Potrykus I, Spangenberg G, eds. *Gene Transfer to Plants*, Berlin, Germany: Springer-Verlag, 24-29.

Dodds PN, Lawrence GJ, Ellis JG (2001) SIX AMINO ACID CHANGES CONFINED TO THE LEUCINE-RICH REPEAT BETA-STRAND/BETA-TURN MOTIF DETERMINE THE DIFFERENCE BETWEEN THE P AND P2 RUST RESISTANCE SPECIFICITIES IN FLAX. *Plant Cell* **13**: 163-178

During K, Porsch P, Fladung M, Lorz H (1993) TRANSGENIC POTATO PLANTS RESISTANT TO THE PHYTOPATHOGENIC BACTERIUM *ERWINIA-CAROTOVORA*. *Plant Journal* **3**: 587-598

Dvořáková L, Cvrčková F, Fischer L (2007) ANALYSIS OF THE HYBRID PROLINE-RICH PROTEIN FAMILIES FROM SEVEN PLANT SPECIES SUGGEST RAPID DIVERSIFICATION OF THEIR SEQUENCES AND EXPRESSION PATTERNS. *BMC Genomics* **8**: 412

Ellis JG, Lawrence GJ, Luck JE, Dodds PN (1999) IDENTIFICATION OF REGIONS IN ALLELES OF THE FLAX RUST RESISTANCE GENE L THAT DETERMINE DIFFERENCES IN GENE-FOR-GENE SPECIFICITY. *Plant Cell* **11**: 495-506

Ferry N, Edwards MG, Gatehouse JA, Gatehouse AMR (2004) PLANT-INSECT INTERACTIONS: MOLECULAR APPROACHES TO INSECT RESISTANCE. *Current Opinion in Biotechnology* **15**: 155-161

Greenberg JT (1997) PROGRAMMED CELL DEATH IN PLANT-PATHOGEN INTERACTIONS. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **48**: 525-545

Hammond-Kosack KE, Jones JDG (1997) PLANT DISEASE RESISTANCE GENES. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **48**: 575-607

Hammond-Kosack KE, Parker JE (2003) DECIPHERING PLANT-PATHOGEN COMMUNICATION: FRESH PERSPECTIVES FOR MOLECULAR RESISTANCE BREEDING. *Current Opinion in Biotechnology* **14**: 177-193

Hammond-Kosack K, Urban M, Baldwin T, Daudi A, Rudd J, Keon J, Lucas J, Maguire K, Korniyukhin D, Jing HC, Bass C, Antoniw J (2004): PLANT PATHOGENS: HOW CAN MOLECULAR GENETIC INFORMATION ON PLANT PATHOGENS ASSIST IN BREEDING DISEASE RESISTANT CROPS. *Proceedings for the 4th International Crop Science Congress*, Brisbane, Australia, 26 September – 1 October 2004.

- Heath MC (1991) THE ROLE OF GENE-FOR-GENE INTERACTIONS IN THE DETERMINATION OF HOST SPECIES SPECIFICITY. *Phytopathology* **81**: 127-130
- Heath MC (2000) HYPERSENSITIVE RESPONSE-RELATED DEATH. *Plant Molecular Biology* **44**: 321-334
- Herms DA, Mattson WJ (1992) THE DILEMMA OF PLANTS - TO GROW OR DEFEND. *Quarterly Review of Biology* **67**: 283-335
- Hijmans RJ, Spooner DM (2001) GEOGRAPHIC DISTRIBUTION OF WILD POTATO SPECIES. *American Journal of Botany* **88**: 2101-2112
- Hilder VA, Gatehouse AMR, Sheerman SE, Barker RF, Boulter D (1987) A NOVEL MECHANISM OF INSECT RESISTANCE ENGINEERED INTO TOBACCO. *Nature* **330**: 160-163
- Hildmann T, Ebnet M, Penacortes H, Sanchezserrano JJ, Willmitzer L, Prat S (1992) GENERAL ROLES OF ABSCISIC AND JASMONIC ACIDS IN GENE ACTIVATION AS A RESULT OF MECHANICAL WOUNDING. *Plant Cell* **4**: 1157-1170
- Hoekema A, Hirsch PR, Hooykaas PJJ, Schilperoort RA (1983) A BINARY PLANT VECTOR STRATEGY BASED ON SEPARATION OF VIR-REGION AND T-REGION OF THE *AGROBACTERIUM-TUMEFACIENS* TI-PLASMID. *Nature* **303**: 179-180
- Humara JM, Ordás RJ (1999) THE TOXICITY OF ANTIBIOTICS AND HERBICIDES ON IN VITRO ADVENTITIOUS SHOOT FORMATION ON *PINUS PINEA* L. COTYLEDONS. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* **35**: 339-343
- Jamal F, Pandey PK, Singh D, Khan MY (2013) SERINE PROTEASE INHIBITORS IN PLANTS: NATURE'S ARSENAL CRAFTED FOR INSECT PREDATORS. *Phytochemistry Reviews* **12**: 1-34
- Jellis GJ, Taylor GS (1977) DEVELOPMENT OF SILVER SCURF (*HELMINTHOSPORIUM-SOLANI*) DISEASE OF POTATO. *Annals of Applied Biology* **86**: 19-28
- Kellenberg C, Boudier C, Bermudez I, Bieth JG, Luu B, Hietter H (1995) SERINE PROTEASE INHIBITION BY INSECT PEPTIDES CONTAINING A CYSTEINE KNOT AND A TRIPLE-STRANDED  $\beta$ -SHEET. *Journal of Biological Chemistry* **270**: 25514-25519

Kessler A, Baldwin IT (2002) PLANT RESPONSES TO INSECT HERBIVORY: THE EMERGING MOLECULAR ANALYSIS. *Annual Review of Plant Biology* **53**: 299-328

Klee HJ, White FF, Iyer VN, Gordon MP, Nester EW (1983) MUTATIONAL ANALYSIS OF THE VIRULENCE REGION OF AN *AGROBACTERIUM-TUMEFACIENS* TI PLASMID. *Journal of Bacteriology* **153**: 878-883

Klosterman SJ, Atallah ZK, Vallad GE, Subbarao KV (2009) DIVERSITY, PATHOGENICITY; AND MANAGEMENT OF *VERTICILLIUM* SPECIES. *Annual Review of Phytopathology* **47**: 39-62

Koivu K, Valkonen JPT, Suomaa S, Tavazza R, Pehu E (1995) *AGROBACTERIUM-TUMEFACIENS*-MEDIATED TRANSFORMATION OF *SOLANUM-BREVIDENS* AND *SOLANUM-TUBEROSUM* CV PITO. *Acta Agriculturae Scandinavica Section B-Soil and Plant Science* **45**: 78-87

Kozak M (1987) AN ANALYSIS OF 5'-NONCODING SEQUENCES FROM 699 VERTEBRATE MESSENGER-RNAS. *NucleicAcids Research* **15**: 8125-8148

Lamb C, Dixon RA (1997) THE OXIDATIVE BURST IN PLANT DISEASE RESISTANCE. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **48**: 251-275

Lauge R, Joosten M, Haanstra JPW, Goodwin PH, Lindhout P, De Wit P (1998) SUCCESSFUL SEARCH FOR A RESISTANCE GENE IN TOMATO TARGETED AGAINST A VIRULENCE FACTOR OF A FUNGAL PATHOGEN. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 9014-9018

Leckie BM, Stewart CN Jr (2011) AGROINFILTRATION AS A TECHNIQUE FOR RAPID ASSAYS FOR EVALUATING CANDIDATE INSECT RESISTANCE TRANSGENES IN PLANTS. *Plant Cell Reports* **30**: 325-334

Leromancer M, Kerlan C (1991) SUPERFICIAL RINGSPOT NECROSIS OF POTATO-TUBERS - A RECENT DISEASE CAUSED BY POTATO VIRUS-Y. *Agronomie* **11**: 889-900

Levine A, Tenhaken R, Dixon R, Lamb C (1994) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> FROM THE OXIDATIVE BURST ORCHESTRATES THE PLANT HYPERSENSITIVE DISEASE RESISTANCE RESPONSE. *Cell* **79**: 583-593

Linsmayer EM, Skoog F (1965) ORGANIC GROWTH FACTOR REQUIREMENTS OF TOBACCO TISSUE CULTURES. *Physiologia Plantarum* **18**: 100-127

Lütcke HA, Chow KC, Mickel FS, Moss KA, Kern HF, Scheele GA (1987) SELECTION OF AUG INITIATION CODONS DIFFERS IN PLANTS AND ANIMALS. *Euroipen Molecular Biology Organization Journal* **6**: 43-48

- Matsumoto I, Watanabe H, Abe K, Arai S, Emori Y (1995) A PUTATIVE DIGESTIVE CYSTEINE PROTEINASE INHIBITOR FROM *DROSOPHILLA MELANOGASTER* IS PREDOMINANTLY EXPRESSED IN THE EMBRYONIC AND LARVAL MIDGUT. *European Journal of Biochemistry* **27**: 582-587
- McManus MT, White DWR, McGregor PG (1994) ACCUMULATION OF A CHYMOTRYPSIN INHIBITOR IN TRANSGENIC TOBACCO CAN AFFECT THE GROWTH OF INSECT PESTS. *Transgenic Research* **3**:50-58
- Meyers BC, Kozik A, Griego A, Kuang HH, Michelmore RW (2003) GENOME-WIDE ANALYSIS OF NBS-LRR-ENCODING GENES IN *ARABIDOPSIS*. *Plant Cell* **15**: 809-834
- Mokrzycki-Issartel N, Bouchon B, Farrer S, Berland P, Laparra H, Medelmont JC, Theisen M (2003) A TRANSIENT TOBACCO EXPRESSION SYSTEM COUPLED TO MALDI-TOF-MS ALLOWS VALIDATION OF THE IMPACT OF DIFFERENTIAL TARGETING ON STRUCTURE AND ACTIVITY OF A RECOMBINANT THERAPEUTIC GLYCOPROTEIN PRODUCED IN PLANTS. *Febs Letters* **552**: 170-176
- Nelson RR (1972) STABILISING RACIAL POPULATIONS OF PLANT PATHOGENS BY USE OF RESISTANCE GENES. *J Environ Qual* **1**:220-227
- Niederhauser JS (1991) THE POTATO ASSOCIATION OF AMERICA AND INTERNATIONAL-COOPERATION 1916-1991. *American Potato Journal* **68**: 237-239
- Nirmala X, Kodrik D, Zurovec M, Sehnal F (2001) INSECT SILK CONTAINS BOTH A KUNITZ-TYPE AND A UNIQUE KAZAL-TYPE PROTEINASE INHIBITOR. *European Journal of Biochemistry* **268**: 2064-2073
- Parent JG, Asselin A (1984) DETECTION OF PATHOGENESIS-RELATED PROTEINS (PR OR B) AND OF OTHER PROTEINS IN THE INTERCELLULAR FLUID OF HYPERSENSITIVE PLANTS INFECTED WITH TOBACCO MOSAIC-VIRUS. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* **62**: 564-569
- Pearce G, Strydom D, Johnson S, Ryan CA (1991) A POLYPEPTIDE FROM TOMATO LEAVES INDUCES WOUND-INDUCIBLE PROTEINASE-INHIBITOR PROTEINS. *Science* **253**: 895-898
- Perombelon MCM, Kelman A (1980) ECOLOGY OF THE SOFT ROT ERWINIAS. *Annual Review of Phytopathology* **18**: 361-387
- Rawlings ND, Barrett AJ (1993) EVOLUTIONARY FAMILIES OF PEPTIDASES. *Biochemical Journal* **290**: 205-218
- Reed GL, Jensen AS, Riebe J, Head G, Duan JJ (2001) TRANSGENIC *BT* POTATO AND CONVENTIONAL INSECTICIDES FOR COLORADO POTATO BEETLE

MANAGEMENT: COMPARATIVE EFFICACY AND NON-TARGER IMPACTS. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **100**: 89-100

Ryals JA, Neuenschwander UH, Willits MG, Molina A, Steiner HY, Hunt MD (1996) SYSTEMIC ACQUIRED RESISTANCE. *Plant Cell* **8**: 1809-1819

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Santamaria ME, Cambra I, Martinez M, Pozancos C, Gonzáles-Melendi P, Grbic V, Castanera P, Ortego F, Diaz I (2012) GENE PYRAMIDING OF PEPTIDASE INHIBITORS ENHANCES PLANT RESISTANCE TO THE SPIDER MITE *TETRANYCHUS UREICAE*. *PLOS ONE* **7**: e43011

Sano T, Nagayama A, Ogawa T, Ishida I, Okada Y (1997) TRANSGENIC POTATO EXPRESSING A DOUBLE-STRANDED RNA-SPECIFIC RIBONUCLEASE IS RESISTANT TO POTATO SPINDLE TUBER VIROID. *Nature Biotechnology* **15**: 1290-1294

Schmelz EA, Engelberth J, Alborn HT, Tumlinson JH, Teal PEA (2009) PHYTOHORMONE-BASED ACTIVITY MAPPING OF INSECT HERBIVORE-PRODUCED ELICITORS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 653-657

Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, Zeigler DR, Dean DH (1998) *BACILLUS THURINGIENSIS* AND ITS PESTICIDAL CRYSTAL PROTEINS. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **62**: 775-806

Schouten HJ, Krens FA, Jacobsen K, Jacobsen E (2006) CISGENIC PLANTS ARE SIMILAR TO TRADITIONALLY BRED PLANTS - INTERNATIONAL REGULATIONS FOR GENETICALLY MODIFIED ORGANISMS SHOULD BE ALTERED TO EXEMPT CISGENESIS. *Embo Reports* **7**: 750-753

Smigocki AC, Ivic-Haymes S, Haiyan L, Savic J (2013) PEST PROTECTION CONFERRED BY A BETA VULGARIS SERINE PROTEINASE INHIBITOR GENE. *PLOS ONE* **8**: e57303

Song J, Bradeen JM, Naess SK, Raasch JA, Wielgus, SM, Haberlach GT, Liu J, Kuang H, Austin-Phillips S, Buel CR, Helgeson JP, Jiang J (2003) GENE RB CLONED FROM *SOLANUM BULBOCASTANUM* CONFERS BROAD SPECTRUM RESISTANCE TO POTATO LATE BLIGHT. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 9128-9133

Sotelo A, Perez L (2003) NUTRITIVE VALUE OF CHICKEN AND POTATO MIXTURES FOR INFANT AND PRESCHOOL CHILDREN FEEDING. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **83**: 1205-1209

Srinivasan A, Giri AP, Gupta VS (2006) STRUCTURAL AND FUNCTIONAL DIVERSITIES IN LEPIDOPTERAN SERINE PROTEASES. *Cellular & Molecular Biology Letters* **11**: 132-154

Tan MYA, Hutten RCB, Visser RGF, van Eck HJ (2010) THE EFFECT OF PYRAMIDING *PHYTOPHTHORA INFESTANS* RESISTANCE GENES *R (PI-MCD1)* AND *R (PI-BER)* IN POTATO. *Theoretical and Applied Genetics* **121**: 117-125

Turkensteen LJ (1993) DURABLE RESISTANCE OF POTATOES AGAINST *PHYTOPHTHORA-INFESTANS*. *Durability of Disease Resistance* **18**: 115-124

van der Vossen EAG, Gros J, Sikkema A, Muskens M, Wouters D, Wolters P, Pereira A, Allefs S (2005) THE *RPI-BLB2* GENE FROM *SOLANUM BULBOCASTANUM* IS AN *MI-1* GENE HOMOLOG CONFERRING BROAD-SPECTRUM LATE BLIGHT RESISTANCE IN POTATO. *Plant Journal* **44**: 208-222

Vanloon LC (1985) PATHOGENESIS-RELATED PROTEINS. *Plant Molecular Biology* **4**: 111-116

Vierstra RD (1996) PROTEOLYSIS IN PLANTS: MECHANISMS AND FUNCTIONS. *Plant Molecular Biology* **32**: 275-302

Voinnet O, Pinto YM, Baulcombe DC (1999) SUPPRESSION OF GENE SILENCING: A GENERAL STRATEGY USED BY DIVERSE DNA AND RNA VIRUSES OF PLANTS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 14147-14152

Wu GS, Shortt BJ, Lawrence EB, Levine EB, Fitzsimmons KC, Shah DM (1995) DISEASE RESISTANCE CONFERRED BY EXPRESSION OF A GENE ENCODING H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-GENERATING GLUCOSE-OXIDASE IN TRANSGENIC POTATO PLANTS. *Plant Cell* **7**: 1357-1368