

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Bakalářská práce**

**Olomouc 2010**

**Zuzana Korbášová**

**Univerzita Palackého v Olomouci**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra buněčné biologie a genetiky**



**Indukovaná rezistence rostlin hrachu vůči  
infekci virem semenem přenosné mozaiky  
hrachu (PSbMV)**

**Bakalářská práce**

**Zuzana Korbášová**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2010**

**Vedoucí práce: Mgr. Dana Šafářová, Ph.D.**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Dany Šafářové, Ph.D. a za použití uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci

Zuzana Korbášová

## Souhrn

Virové infekce způsobují velké ztráty na výnosech a kvalitě rostlin. Některé rostliny se ale proti virovým infekcím dokážou bránit svými přirozenými mechanismy, pomocí pasivní nebo aktivní rezistence. Při pasivní rezistenci se rostlina nestává hostitelem pro patogen, protože patogen není schopen proniknout do rostliny díky tuhé buněčné stěně, nebo rostlina postrádá faktor, který je nepostradatelný pro infekční cyklus viru. Při aktivní rezistenci se rostlina stává hostitelem pro patogen, ale využívá své přirozené mechanismy (dominantní či recesivní geny rezistence) k navození ochrany proti virové infekci. Pokud rostliny nemají přirozené mechanismy rezistence, je možné indukovat rezistenci rostlin vůči virové infekci uměle, za pomoci metod transgenoz. Mezi základní mechanismy takové rezistence patří například od patogenu odvozená rezistence, kdy se část patogenního genetického materiálu využívá pro navození obrany proti samotnému patogenu. Od patogenu odvozená rezistence se dělí na proteinem zprostředkovanou ochranu (k indukci se využívají proteiny) či RNA umlčování (ústřední molekulou je samotná RNA). Kromě proteinem zprostředkované rezistence existují i alternativní transgenní strategie k navození virové rezistence, např. navození rezistence pomocí 'plantibodies' (exprese antivirových protilátek).

Virus semenem přenosné mozaiky hrachu (PSbMV) napadá luštěniny, především pak hrách, který je v některých zemích důležitou zemědělskou plodinou. PSbMV patří do čeledi *Potyviriidae* a infekce na rostlinách hrachu se projevuje prosvětlováním žilek, svinutkou, mozaikou, nekrózami a deformacemi semen. Jako zdroj přirozené rezistence byly u hrachu popsány čtyři recesivní geny rezistence *sbm-1*, *sbm-2*, *sbm-3* a *sbm-4*, které zprostředkovávají rezistenci proti různým patotypům PSbMV.

V praktické části jsem se zabývala studiem indukované rezistence u hrachu a stanovením míry odolnosti transgenních rostlin hrachu T3 generace vůči infekci PSbMV pomocí kvantitativní Real-Time RT-PCR. V transgenních rostlinách kultivaru 'Raman' infikovaných virem PSbMV, jsem detekovala pokles koncentrace viru ve srovnání s infikovanou netransgenní kontrolou, což ukazovalo, že v transgenních rostlinách docházelo k posttranskripčnímu umlčování genů (PTGS). Testované rostliny tedy vykazovaly rezistenci.

## Summary

Viral infections cause major losses in the yields and in the quality of plants. Some plants are able to defend against the viral infection by their natural mechanisms which can be passive or active. During the passive resistance, the plant does not become the host for the pathogen because the pathogen is unable to penetrate the plants through the rigid cell wall, or the plant does not have a factor that is indispensable for the virus infectious cycle. During the active resistance, the plant becomes the host to the pathogen, but it uses its natural mechanisms (dominant or recessive resistance genes) to induce the protection against the viral infection. If the plants don't have the natural resistance mechanisms, it is possible to induce the plant resistance with the methods of transgenesis. The basis of these methods is the pathogen-derived resistance, when the part of the pathogenic genetic material is used for the induction of the defense against the pathogen itself. The pathogen derived resistance can be divided into the protein-mediated protection (protein is an inductor molecule) or into the RNA silencing (the central molecule is RNA alone). In addition to the protein-mediated resistance, there are alternative transgenic strategies to induce the viral resistance, for example induction of resistance by the 'plantibodies' (expression of the antiviral antibodies).

*Pea seed-borne mosaic virus* (PSbMV) attacks the legumes, especially the peas, which is an important agricultural crop. PSbMV belongs to the *Potyviridae* family and the infection of the pea plants is reflected by the vein clearing, the down-ward leafrolling, the mosaic, the necrosis and the seed deformation. In the peas, there were described four recessive resistance genes *sbm-1*, *sbm-2*, *sbm-3* and *sbm-4*, which mediate resistance against the different races of the PSbMV.

In the experimental part, I was engaged in the study of the induced resistance in the peas and evaluation of resistance of the T3 generation transgenic pea plants to the PSbMV infection by quantitative Real-Time RT-PCR. In the transgenic plants of 'Raman' cultivar infected by PSbMV, I detected a decrease in the concentration of virus compared with the infected nontransgenic control. This showed that in the transgenic plants, post-transcriptional gene silencing (PTGS) was activated. The tested plants showed the induced resistance.

Chtěla bych poděkovat Mgr. Daně Šafářové, Ph.D. za pomoc, cenné rady a připomínky při zpracování mé bakalářské práce. Dále pak laborantce Janě Veselské za pomoc při praktické části mé práce.

## Obsah

<b>1 Úvod</b> .....	<b>8</b>
<b>2 Cíle Práce</b> .....	<b>9</b>
<b>3 Přirozená rezistence</b> .....	<b>10</b>
3.1 Nehostitelská rezistence .....	10
3.2 Hostitelská rezistence .....	10
3.2.1 Ochrana zprostředkovaná dominantními geny rezistence .....	11
3.2.1.1 Příklady dominantních genů rezistence .....	11
3.2.2 Ochrana zprostředkovaná recesivními geny rezistence.....	12
3.3 Křížová ochrana.....	12
<b>4 Od patogenu odvozená rezistence (Pathogen-derived resistance)</b> .....	<b>14</b>
4.1 Plášťovým proteinem zprostředkovaná ochrana .....	14
4.2 Movement proteinem zprostředkovaná ochrana.....	15
4.3 Replikázou zprostředkovaná ochrana .....	15
4.4 RNA zprostředkovaná ochrana.....	17
4.4.1 RNA zprostředkovaná ochrana proti RNA virům .....	17
4.4.2 Posttranskripční umlčování genů (PTGS) .....	18
4.4.2.1 Navození PTGS prostřednictvím dsRNA.....	21
<b>5 Rezistence vůči virům zprostředkovaná transgeny nevirového původu</b> .....	<b>22</b>
5.1 Navození rezistence pomocí ´plantibodies´ .....	22
<b>6 Virus semenem přenosné mozaiky hrachu</b> .....	<b>23</b>
<b>7 Experimentální část</b> .....	<b>25</b>
<b>8 Závěr</b> .....	<b>32</b>
<b>9 Seznam zkratk</b> .....	<b>33</b>
<b>10 Seznam použité literatury</b> .....	<b>35</b>
<b>Přílohy</b> .....	<b>41</b>

# 1 Úvod

V této práci se zaměřuji na mechanismy přirozené a indukované rezistence rostlin vůči virům, především pak na virus semenem přenosné mozaiky hrachu (PSbMV).

Virové infekce způsobují velké ztráty na výnosech a kvalitě napadených rostlin. Některé rostliny, ale mají přirozené mechanismy, kterými se brání napadení patogenem či rozvinutí virové infekce. Poznání těchto přirozených obranných mechanismů rostlin, společně s rozvojem poznatků z molekulární biologie a instrumentálními schopnostmi, vedlo k rozvoji nových metod (zejména transgenoz), které umožňují indukovat odolnost rostlin vůči virové infekci.



## **2 Cíle práce**

Cílem mé bakalářské práce bylo vypracovat literární rešerši se zaměřením na problematiku přirozené a indukované rezistence rostlin vůči virům a jejich mechanismům, včetně možností využití transgenoz, s důrazem na virus semenem přenosné mozaiky hrachu (PSbMV).

Cílem praktické části bylo analyzovat vybraný vzorek transgenních rostlin hrachu a stanovit míru jejich odolnosti vůči infekci PSbMV.

### 3 Přirozená rezistence

Rostliny se dokážou bránit virovým infekcím svými vlastními přirozenými mechanismy bez zásahu člověka. Tyto mechanismy mohou být pasivní (nehostitelská rezistence) nebo aktivní (hostitelská rezistence).

#### 3.1 *Nehostitelská rezistence*

Nehostitelská rezistence je pasivní mechanismus přirozené rezistence a je považován za nejběžnější formu rezistence u rostlin vůči patogenům (Heath, 2000). Rostlina v tomto případě není pro daný patogen hostitelem. Ten totiž není schopen proniknout do rostliny např. díky tuhé buněčné stěně, nebo rostlina postrádá či obsahuje modifikovaný faktor, který je nepostradatelný pro infekční cyklus viru (Diaz-Pendon *et al.*, 2004).

#### 3.2 *Hostitelská rezistence*

Hostitelská rezistence je aktivní mechanismus přirozené rezistence. Rostlina se zde stává hostitelem pro daný patogen, ale využívá své přirozené mechanismy k navození rezistence (jedná se o rozpoznání virové částice prostřednictvím dominantních R genů či recesivních genů rezistence).

Nejčastějším projevem hostitelské rezistence, ale i častým projevem nehostitelské rezistence je hypersenzitivní reakce (HR). Jedná se o rychlou buněčnou smrt v místě infekce, která vede k vytvoření lokálních nekrotických lézí a tím zabrání šíření virových částic v rostlině. Indukci této odpovědi předchází specifické rozpoznání virové částice, které je ve většině případů založeno na párování genových produktů rostlin (produkovaných R geny) a virů (produkovaných avirulentními geny *avr* geny). Tento jev je v současnosti všeobecně přijímán jako forma programované buněčné smrti (PCD). Významnou roli hrají i reaktivní kyslíkové radikály (ROS), u nichž se předpokládá, že také zprostředkovávají hypersenzitivní buněčnou smrt (Goodman *et al.*, 1994; Heath, 2000).

### 3.2.1 Ochrana zprostředkovaná dominantními geny rezistence

Dominantní geny rezistence (R geny) umožňují rostlinám rozpoznat patogenní částice a zprostředkovat jim ochranu proti virovým onemocněním.

Všechny R geny dosud identifikované v řadě různých modelů a rostlinných druhů, kódují proteiny, které mohou být rozděleny do pěti proteinových tříd (Goldbach *et al.*, 2003). Největší skupina R genů kóduje takzvaný 'nucleotide-binding site plus leucine-rich repeat' (NB-LRR) typ proteinů. Doposud všechny izolované R geny, které zprostředkovávají ochranu vůči virovým onemocněním patří do této skupiny. V rámci velké skupiny NB-LRR genů rezistence může být provedeno pod-rozdělení na základě N-terminální domény. Ta může být buď 'coiled-coil' doména (CC-NB-LRR), 'leucine zipper' doména (LZ-NB-LRR) nebo tzv. 'Toll/Interleukin-1' receptor doména (TIR-NB-LRR) (Goldbach *et al.*, 2003). Dalšími skupinami R genů jsou serin/threoninové kinázy, 'receptor-like' kinázy (RLK) a 'receptor-like' proteiny (RLP) (Gurr *et Rushton*, 2005).

Srovnávací analýzy známých R genů naznačují, že se vyvinuly ze starých genových rodin duplikací, mutací a rekombinací (Goldbach *et al.*, 2003). Dominantní geny rezistence našly uplatnění i v navození virové rezistence pomocí transgenních metod (Lin *et al.*, 2007).

#### 3.2.1.1 Příklady dominantních genů rezistence

Příkladem dominantních genů rezistence může být např. N-gen, který zprostředkovává ochranu proti *Tobacco mosaic virus* (TMV). N-gen, který byl přenesen z tabáku do rajčete, úspěšně navodil ochranu proti TMV v rajčeti (Whitham *et al.*, 1996). U brambor byly popsány další dominantní geny rezistence. Ry gen zprostředkovává ochranu proti *Potato virus Y* (PVY) (Kang *et al.*, 2005). Rx1 a Rx2 geny naopak chrání proti *Potato virus X* (PVX) (Bendahmane *et al.*, 1999). Gen Sw5 zprostředkovává ochranu proti *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) u rajčat (Brommonschenkel *et al.*, 2000). Po přenesení tohoto genu z rajčat do tabáku se ukázalo, že zprostředkoval odolnost nejen proti TSWV, ale i proti skupině *Tospovirus* (Spasova *et al.*, 2001).

### 3.2.2 Ochrana zprostředkovaná recesivními geny rezistence

Kromě značně studovaných dominantních genů rezistence byly rovněž identifikovány recesivní geny rezistence, které také zprostředkovávají ochranu proti virovým onemocněním (Diaz-Pendon *et al.*, 2004).

Pro vysvětlení mechanismu recesivní rezistence, existují dvě hypotézy. První hypotéza říká, že rezistence může být výsledkem pasivního mechanismu, který zprostředkovává rezistenci díky nedostatku specifického faktoru, který je důležitý pro dokončení virového cyklu, nebo díky přítomnosti mutované verze tohoto faktoru. Podle druhé hypotézy může být rezistence výsledkem aktivního procesu, ve kterém rostlina produkuje inhibitor, který zasahuje do nějaké fáze virového cyklu a nebo rostlina obsahuje faktor, s jehož pomocí rozpozná virem kódované molekuly a tak zapne rezistentní odpověď. První hypotéza lépe vysvětluje recesivní rezistenci vůči virům a potyvírům, druhá hypotéza vysvětluje interakce mezi rostlinami a houbami (Diaz-Pendon *et al.*, 2004).

Mezi recesivní geny rezistence patří například gen *va* u *Nicotiana tabacum*, který je namířen proti dvěma virům: *Tobacco etch virus* (TEV) a *Tobacco vein mottling virus* (TVMV) (Johansen *et al.*, 2001). U hrachu byly popsány např. gen *mo*, který zprostředkovává rezistenci proti *Bean yellow mosaic virus* (BYMV) a *Watermelon mosaic virus* (Olsen *et* Johansen, 2001) nebo geny *sbm-1*, *sbm-2*, *sbm-3* a *sbm-4*, které zprostředkovávají rezistenci proti různým patotypům viru semenem přenosné mozaiky hrachu (PSbMV) (Provvidenti *et* Alconero, 1988).

### 3.3 Křížová ochrana

Tato ochrana, která byla poprvé pozorována v roce 1929, je založená na primární infekci rostliny slabým virovým izolátem, který může zabránit následné infekci silným izolátem viru, vyvolávajícím výrazné příznaky infekce (Waterhouse *et al.*, 1999).

Podstatou křížové ochrany je skutečnost, že ochranný neboli oslabený (atenuovaný) virus navozuje jen mírné nebo žádné příznaky na celé hostitelské rostlině. Jakmile je mírný izolát viru inokulován na rostlinu, může vyvolat izolátovou nebo sekvenčně-specifickou rezistenci proti soutěžícímu viru, který za normálních podmínek vyvolá silné příznaky

infekce. Fenomén křížové ochrany je velmi podobný imunitní odpovědi u zvířat, která je vyvolaná oslabenou virovou vakcínou (Lin *et al.*, 2007).

Tato ochrana byla úspěšně využita řadou vědců pro kontrolu chorob vyvolaných RNA nebo DNA viry jako např. *Tobacco mosaic virus* (TMV), *Citrus tristeza virus* (CTV), *Papaya ringspot virus* (PRVS) a *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) (Rast, 1972; Muller *et Costa*, 1977; Yeh *et Gonsalves*, 1984; Lecoq *et al.*, 1991).

Přestože molekulární podstata křížové ochrany není zcela známá, je pravděpodobné, že je zprostředkovaná buď proteinem, RNA nebo kombinací obou mechanismů (Lin *et al.*, 2007).

## 4 Od patogenu odvozená rezistence (Pathogen-derived resistance)

V roce 1983 byla poprvé úspěšně začleněna cizí DNA do rostlinných buněk, které následně regenerovaly v celé transgenní rostliny, což otevřelo nové možnosti využití transgenních technologií pro umělé navození virové rezistence v rostlinách (Lin *et al.*, 2007).

Strategii od patogenu odvozené rezistence (PDR) poprvé představili v roce 1985 Sanford a Johnston, když navrhli použití části patogenu vlastního genetického materiálu pro navození hostitelské obrany proti samotnému patogenu. Principem této strategie bylo, že některé z patogenu odvozené geny nebo jejich produkty mohou být rozhodující pro vlastní virovou patogenezí. Jejich funkční nebo i nefunkční formy tak mohou zabraňovat replikaci viru, skládání nebo pohybu virových částic (Sanford *et al.*, 1985).

### 4.1 Plášťovým proteinem zprostředkovaná ochrana (*Coat protein-mediated protection*)

Pro první demonstraci z viru (patogenu) odvozené rezistence byl použit plášťový protein *Tobacco mosaic virus* (CP-TMV) (Abel *et al.*, 1986).

V těchto experimentech bylo zjištěno, že transgenní rostliny tabáku, které obsahovaly více CP TMV byly odolnější vůči infekci celými virovými částicemi TMV, než vůči jejich RNA a to z toho důvodu, že plášťovým proteinem (CP) zprostředkovaná ochrana inhibuje rozložení virové částice v rostlině (Abel *et al.*, 1986; Register *et al.*, 1988). Bylo také prokázáno, že ochrana zprostředkovaná CP závisí na produkci plášťového proteinu v infikovaných epidermálních buňkách (Reimann-Philipp *et al.*, 1993). Metoda předpokládá, že dochází k ovlivnění počátečního stádia infekce, kdy transgenní CP může zabránit virionům se v rostlině rozbít. V tomto stádiu musí virová částice částečně odhalit 5'konec své RNA, a tím se mohou navázat ribozomy CP a přepsat otevřený čtecí rámec (ORF) (Shaw *et al.*, 1986). Pokud tedy napadající virus uvolňuje své 5'terminální RNA podjednotky, ochranný transgenní CP virové částice okamžitě zabalí a tím zabrání infekci (Lu *et al.*, 1998).

Nevýhodou je, že tento typ rezistence je efektivní proti virovým izolátům, ze kterých byl transgen (CP gen) odvozen (Lin *et al.*, 2007).

#### **4.2 *Movement proteinem zprostředkovaná ochrana (Movement protein-mediated protection)***

Movement proteinem (MP) zprostředkovaná ochrana je založena na transgenní expresi mutovaných virových movement proteinů rostlinou, které soutěží o vazebná místa na plasmodesmatech s normálními MP viru (Lapidot *et al.*, 1993). MP rostliny musí být mutované nebo dysfunkční, protože při expresi funkčních MP dochází ke zvýšení vnímavosti rostliny k viru nebo transgenní MP nemají žádný vliv na virovou infekci (Baulcombe, 1996).

Zajímavým a užitečným znakem ochrany zprostředkované MP je široké spektrum účinnosti. Ochrana zprostředkovaná mutovanými MP odvozených z *Tobacco mosaic virus* (TMV) například zprostředkovala ochranu rostlin tabáku proti potexvirům, cucumovirům a tobnavirům (Cooper *et al.*, 1995). Tento příklad širokého spektra ochrany ukazuje, že MP různých virů mohou interagovat se stejnými plasmodesmaty (Baulcombe, 1996).

U skupin *Potexvirus*, *Carlavirus*, *Hordeivirus* a *Furovirus* se vyskytují tři MP které jsou kódovány sérií překrývajících se úseků označovaných jako 'triple gene block' (TGB). Exprese mutovaného TGB proteinu umožňuje rezistenci k užšímu spektru virů než exprese MP, což ukazuje, že reagují s plasmodesmaty odlišným způsobem (Beck *et al.*, 1991; Beck *et al.*, 1994).

#### **4.3 *Replikázou zprostředkovaná ochrana (Replicase-mediated resistance)***

Úspěšně navozená rezistence za použití genů kódujících virovou RNA-dependentní RNA-polymerázou (RdRp) byla poprvé pozorována u tabáku a jeho ochraně vůči TMV (*Tobacco mosaic virus*) (Golemboski *et al.*, 1990). Replikázou zprostředkovaná ochrana se zdá být specifická proti infekci vyvolané jak TMV viriony, tak RNA (Prins *et al.*, 2008).

Podstata této ochrany není zcela jasná, existují dohady o jaký typ ochrany se jedná, zda je zprostředkovaná proteinem nebo RNA (Prins *et al.*, 2008).

Pro teorii proteinem zprostředkované ochrany svědčí například pokus, který provedli Donson *et al.* (1993). Ti ke zprostředkování ochrany použili RdRp z *Tobacco mosaic virus* (TMV), která byla modifikována vložением bakteriálního transpozomu. Rostliny nesoucí tento konstrukt byly rezistentní k TMV i tobamovirům. Dále také zjistili, že rozdíly mezi replikázovými sekvencemi v transgenu a sekvencemi v napadajících virech nebyly slučitelné s vysvětlením založeným na RNA zprostředkované ochraně (Donson *et al.*, 1993).

Pro druhou teorii o zapojení RNA svědčí pokus provedený Tenlladem *et al.* (1995, 1996), kteří k vyvolání rezistence použili konstrukt RdRp o délce 54 kDa získaný z tobamoviru: *Pepper mild mottle virus*. Ukázalo se, že k navození stejné rezistence není nutné použít celý protein, ale stačí pouze zkrácený konstrukt, který kóduje jen 30% proteinu. Takto TMV replikázou navozená rezistence byla připsaná RNA umlčování (Marano *et Baulcombe*, 1998).

Zajímavý experiment uskutečnili Goregaoker *et al.* (2000), kteří se pokusili navodit rezistenci vůči TMV za pomoci 9-ti různých překrývajících se segmentů pokrývajících methyltransferázovou, helikázovou a polymerázovou (POL) doménu RdRp polymerázy. Ve své práci zaznamenali vysokou úroveň ochrany při použití polymerázové domény a naopak nižší ochranu při použití methyltransferázových a helikázových domén. Ukázalo se, že k nižší úrovni ochrany experimentálních rostlin nebyla nutná vlastní exprese proteinů. Nicméně vyšší ochrana byla přiznána úsekům pokrývajících polymerázovou doménu proteinu (Goregaoker *et al.*, 2000). Z toho vyplývá, že proteinem zprostředkovaná ochrana je aktivnější ve spolupráci s méně aktivní RNA zprostředkovanou ochranou (Prins *et al.*, 2008).

Jako možné účinné zdroje proteinem zprostředkované ochrany byly popsány i další replikázové geny ostatních skupin virů jako například: *Tobravirus* (MacFarlane *et Davies*, 1992), *Potexvirus* (Braun *et Hemenway*, 1992), *Potyvirus* (Audy *et al.*, 1994), *Alfamovirus* (Brederode *et al.*, 1995) a *Cucumovirus* (Anderson *et al.*, 1992).



#### **4.4 RNA zprostředkovaná ochrana (RNA mediated protection)**

RNA zprostředkovaná ochrana může fungovat pokud transgenní nukleové kyseliny slouží jako „vnadidlo“. Toto „vnadidlo“ může konkurovat infikujícímu viru (případně jeho genomu) za přesměrování hostitelsky nebo virově kódovaných proteinů do interakcí, které jsou nevýhodné pro replikaci nebo šíření viru v infikovaných rostlinách (Baulcombe, 1996).

Jedná se o obranný mechanismus hostitele namířený proti invazivním nebo mobilním RNA elementům, jako jsou například viry či retroelementy, který vede k sekvenčně specifické RNA degradaci.

RNA zprostředkovaná ochrana probíhá prostřednictvím tzv. umlčování genů, které probíhá na dvou různých úrovních. První úroveň je transkripční genové zhášení (TGS), které je založeno na metylaci promotoru. Metylace pravděpodobně promotor inaktivuje tím, že zablokuje jeho interakce s transkripčními faktory nebo tím, že přiláká proteiny, které přemění strukturu chromatinu. Druhou úrovní je posttranskripční genové umlčování (PTGS), které je spuštěno, když množství virové RNA je větší než prahová úroveň (Wang *et Waterhouse*, 2001; Savenkov *et al.*, 2002).

##### **4.4.1 RNA zprostředkovaná ochrana proti RNA virům**

Zahájení RNA umlčování je závislé na přítomnosti dsRNA, kterou si rostlina může sama vyrábět přepisem části genomu nebo je dsRNA odvozená z virové sekvence a do buněk rostliny se dostává transformací prostřednictvím *Agrobacterium tumefaciens* (Tenllado *et al.*, 2001). Pro účinné zahájení RNA umlčování je také důležitá sekvenční podobnost mezi transgenem a infikujícím virem (Savenkov *et al.*, 2002). Například u transgenních rostlin hrachu exprimujících ´nuclear inclusion b´ replikázový gen (NIB) z *Pea seed-borne mosaic virus*, byla pro aktivaci rezistence nutná 89% sekvenční identita (Jones *et al.*, 1998). K podobným závěrům dospěli i De Haan *et al.* (1992), když zjistili, že RNA zprostředkovaná ochrana byla neúčinná proti virům, jejichž sekvence se od transgenu lišila o více než 10 %.

Lindbo *et al.* (1993) vymysleli strategii, která byla založena na myšlence, že sekvenčně specifická RNA degradace vyvolaná transgeny se zaměří na všechny RNA se sekvenční identitou s transgenní RNA. V případě virových transgenů má tento proces za následek virovou rezistenci. Sekvenční specifitu určují malé interferující RNA (siRNA) odvozené z transgenů, které vznikají rozštěpáním dsRNA (Hamilton *et al.*, 1999). Tyto siRNA byly pozorovány i u volně žijících rostlin infikovaných viry a viroidy (Baulcombe, 1996).

Ve spojení s RNA umlčováním můžeme pozorovat i tzv. zotavení rostliny po infekci virem. Termín zotavený zde znamená, že transgenní rostliny jsou zpočátku citlivější k homologním virům a ukazují typické příznaky, ale nové listy, které vznikají později, jsou bez příznaků a odolné vůči následným infekcím způsobeným stejným virem (Savenkov *et al.*, 2002).

#### **4.4.2 Posttranskripční umlčování genů (Post-transcriptional gene silencing, PTGS)**

Posttranskripční genové umlčování poprvé popsal v roce 1990 Napoli *et al.* v petúnii (Yu *et al.*, 2003). Je to velice konzervativní mechanismus regulace mRNA, který se přirozeně vyskytuje u rostlin, zvířat a hub (Lin *et al.*, 2007). V rostlinách PTGS neslouží pouze jako součást obranného mechanismu, ale podílí se také na regulaci endogenní exprese genů v různých vývojových procesech (Yu *et al.*, 2003).

PTGS je založen na degradaci RNA prostřednictvím sekvenčně specifických nukleotidových interakcí vyvolaných dvouvláknovou RNA (dsRNA). Signály intracelulárního RNA umlčování mohou být přenášeny floémem z buňky do buňky na dlouhé vzdálenosti pravděpodobně prostřednictvím tzv. mobilních umlčujících signálů, kam patří krátké interferující RNA (siRNA), aberantní RNA a dsRNA. Pozoruhodné je, že některé viry mohou kódovat proteiny, které potlačují RNA umlčování v rostlinách. Příkladem mohou být například viry skupiny *Potexvirus* a *Cucumovirus*. V jejich genomu je jeden specifický otevřený čtecí rámec, který kóduje protein TGBp1, který je základní složkou tří proteinů společně označovaných jako 'triple gene block' (TGB). TGBp1 je virový movement protein (MP), který je nezbytný nejen pro efektivní přenos viru z buňky do buňky, ale také je spojen s inhibicí systémového přenosu PTGS signálu (Yu *et al.*, 2003).

PTGS má dva hlavní kroky: zahajovací a efektorový krok. Zahajovací krok spočívá v rozštěpení dsRNA na siRNA dlouhé 21-26 nukleotidů s 2 nukleotidovými přesahy na 3' konci. V efektorovém kroku jsou siRNA přijímány do multiproteinového komplexu RISC (RNA-induced silencing complex), který degraduje cílovou mRNA prostřednictvím dokonalého či téměř dokonalého párování bází mezi siRNA a cílovou sekvencí (Yu *et al.*, 2003). PTGS se vyskytuje také u netransgenních rostlin jako přirozený obranný mechanismus proti virové infekci (Tenllado *et al.*, 2001).

Mechanismus PTGS je rozdělen na dvě cesty: siRNA a miRNA cesta, v závislosti na tom, jaké malé molekuly RNA se v něm zapojují (Lin *et al.*, 2007).

### **siRNA cesta**

siRNA cestou je PTGS spouštěno jednovláknovou virovou RNA nebo dvouvláknovou RNA produkovanou hostitelskou nebo virovou RNA dependentní RNA polymerázou (RdRp) (Moissiard *et Voinnet*, 2006).

RdRp využívají jednovláknovou RNA (ssRNA) jako templát pro tvorbu dvouvláknové RNA (dsRNA), která slouží jako substrát pro Dicer (typ RNase III). Dicer rozstříhá dsRNA na siRNA o délce 21-25 nukleotidů. siRNA je následně začleněna do komplexu RISC, který řídí rozštípání cílové RNA a ta je v cytoplazmě degradovaná exonukleázami (Germundsson *et Valkonen*, 2006; Baulcombe, 2004).

Případně se siRNA používá jako primer pro RdRp k transkripci cílové RNA na dsRNA a tím k produkci většího množství siRNA. Aktivita RdRp zesiluje PTGS, což vede k zesílení umlčování (Lin *et al.* 2007).

Rezistence založená na siRNA poskytuje ochranu nejen proti RNA virům, ale i proti DNA virům narozdíl od rezistence zprostředkované proteinem (Lomonosoff, 1995). Nicméně tento druh rezistence je účinný jen proti virům s blízce příbuznou sekvencí (Baulcombe 1996). Pro praktické využití bylo tedy nezbytné vyvinout strategii, která by poskytla široké spektrum virové rezistence. Jan *et al.* (2000) vytvořili chimerický transgen se sekvencemi ze dvou různých virů, jehož exprese může navodit RNA zprostředkovanou rezistenci proti více virům.

## **miRNA (mikroRNA) cesta**

microRNA je jednořetězová RNA o délce 20-24 nukleotidů, která vzniká rozstříháním miRNA vlásenkových prekurzorů (pre-miRNA) Dicerem (Bartel, 2004). Zralá miRNA v cytosolu je odváděna do RISC komplexu a umožňuje tak rozeznat cílovou virovou RNA, která je poté nastříhaná (Jones-Rhoades *et al.*, 2006).

U metazoi se vytváří primární miRNA transkript (pri-miRNA), který je dlouhý několik kilobází a má 5'čepičku a polyA konec. Tyto pri-miRNA jsou zpracovány enzymem Drosha (typ ribonukleázy III) ve spojení s kofaktorem DGCR8. DGCR8 má dsRNA vazebné domény, které mohou rozpoznat přechod mezi dsRNA a ssRNA. Pri-miRNA je tedy zpracována na 65 nukleotidů dlouhou vlásenku pre-miRNA (Lee *et al.*, 2003; Han *et al.*, 2006).

Znalost principu PTGS v rostlinách a v jeho interakci virus-rostlina vedly k jeho praktickému využití v transgenozí. Pro konstrukci transgenních rostlin se na rozdíl od výše popsaných přístupů využívají transgeny, které samy o sobě nekódují kompletní molekulu RNA nebo gen, který je následně exprimován do proteinu (RNA nebo proteinem zprostředkovaná rezistence). Tyto krátké fragmenty patogenního původu se vnašejí do rostliny a jsou schopny vyvolat proces PTGS.

O charakteru takových transgenů se vedou diskuse. Jako nejúčinnější se jeví transgeny, které exprimují dvouvláknovou RNA nebo jednovláknovou semikomplementární RNA vlásenku. Warehouse *et al.* (1998) a Wesley *et al.* (2001) zjistili, že mají v rostlinách podobný posttranskripční umlčující efekt, jaký byl dříve popsán u živočichů. V téže laboratoři navíc prokázali, že v nejméně dvou případech účinek PTGS výrazně zvýšilo použití transgenu nesoucího navíc intron. 100% takto transformovaných rostlin vykazovalo umlčování (Smith *et al.*, 2000). Tyto výsledky vedly k otázkám, zda hpRNA technologie může být využita pro objev genů v rostlinách.

V poslední době je diskutován nový mechanismus navození PTGS v rostlinách, který by mohl nahradit doposud používané techniky transgenozí a také nahradit pěstování transgenních rostlin. Tato metoda je založena na mechanické inokulaci přímo samotnou dsRNA.

#### 4.4.2.1 Navození PTGS prostřednictvím dsRNA

Mnoho rostlinných virů má genom tvořen jednovláknovou RNA (ssRNA), která se, jak je všeobecně uznáváno replikuje prostřednictvím tvorby komplementární templátové RNA. Má se za to, že v průběhu tohoto procesu replikace, genomická ssRNA a její komplementární templátové RNA alespoň dočasně vytvoří dvouvláknovou RNA (dsRNA).

Na základě této skutečnosti Watanabe *et al.* (1995) vyslovili hypotézu, že pokud by se podařilo získat ribonukleázy ('RNases') specifické k dsRNA, a vnést je do rostlin, mohly by pak představovat možnost jak napadnout replikaci meziproductů mnoha rostlinných virů. Zároveň předpokládali, že exprese takového transgenu nebude mít žádný negativní vliv na růst a fyziologii rostlin a že takto navozená rezistence bude namířena proti většímu množství rostlinných virů. Ve svých pokusech zavedli do rostlin tabáku (*Nicotiana tabacum*) RNazový gen nazvaný '*pac 1*' odvozený z kvasinky (*Schizosaccharomyces pombe*). Takto transformované transgenní rostliny měly méně lézí při napadení *Tomato mosaic virus* a také vykazovaly zpoždění v objevení se příznaků při inokulaci *Cucumber mosaic virus* a *Potato virus Y*.

Další pokus, který potvrzuje hypotézu, že dsRNA odvozená z virové sekvence funguje jako induktor PTGS, provedl Tenllado *et al.* 2001. Narozdíl od předchozí práce se zaměřili na možnost navození rezistence pomocí mechanické inokulace rostliny *Nicotiana tabacum* dsRNA odvozené z virové sekvence společně s virem (virovou infekcí). Za těchto podmínek dsRNA interferovala s virovou infekcí způsobenou virem *Pepper mild mottle virus* (PMMV), *Tobacco etch virus* (TEV) a *Alfalfa mosaic virus* (AMV) sekvenčně specifickým způsobem a rostliny nevykazovaly příznaky infekce, což ukazovalo, že dsRNA aktivovala PTGS v rostlinách. Za významné považovali autoři i dávku aplikované dsRNA a společnou inokulaci viru a dsRNA.

## 5 Rezistence vůči virům zprostředkovaná transgeny nevirového původu

Kromě proteinem zprostředkované rezistence existuje i řada alternativních transgenních strategií k zprostředkování virové rezistence využívajících různé genetické zdroje (Prins *et al.*, 2008).

Příkladem může být využití exprese antivirových protilátek nebo exprese rostlinných virově rezistentních genů v jiných rostlinách než v těch, ze kterých byly izolovány (Prins *et al.*, 2008). Dalším možností může být umlčování rostlinných genů, které jsou nepostradatelné pro životní cyklus viru (Asano *et al.*, 2005).

### 5.1 Navození rezistence pomocí 'plantibodies'

Biotechnologické postupy otvírají možnosti navození rezistence rostlin pro ně naprosto novými cestami. Jednou z nich je jejich exprese protilátek běžně využívaných živočichy k rozpoznávání patogenů. Ačkoliv se u rostlin imunitní systém, spojený s těmito proteiny u živočichů, nevyskytuje, afinita vybraných protilátek může být dostatečně velká k tomu, aby došlo k narušení základních funkcí virových proteinů v rostlinách (Prins *et al.*, 2008).

První úspěšné použití 'plantibodies' vedlo ke snížení vnímavosti vůči *Artichoke mottle crinkle virus* za použití scFv protilátek (single-chain variable fragment antibodies) namířených proti plášťovému proteinu (CP, coat protein) viru (Tavladoraki *et al.*, 1993). Později bylo také prokázáno, že pomocí specifické scFv je možné přerušit replikaci viru v počáteční fázi infekce (Prins *et al.*, 2005).

Mechanismus, kterým protilátka navozuje rezistenci, zatím zůstává bez odpovědi (Goldbach *et al.*, 2003). Do budoucnosti se předpokládá, že lepší znalosti o struktuře protilátek umožní zvýšení jejich stability (Ewert *et al.*, 2004).

## 6 Virus semenem přenosné mozaiky hrachu

Virus semenem přenosné mozaiky hrachu (PSbMV) infikuje luštěniny v našich podmínkách především hrách (Piáková et al., 2006) a může způsobit významné výnosové ztráty (Lin et al., 2007).

*Pea seed-borne mosaic virus* (PSbMV) je zástupcem rodu *Potyvirus*, čeledi *Potyviridae* (<http://www.ictvonline.org/>) a je pravděpodobně rozšířen celosvětově. PSbMV byl poprvé posán v roce 1966, v Československu (Musil, 1966).

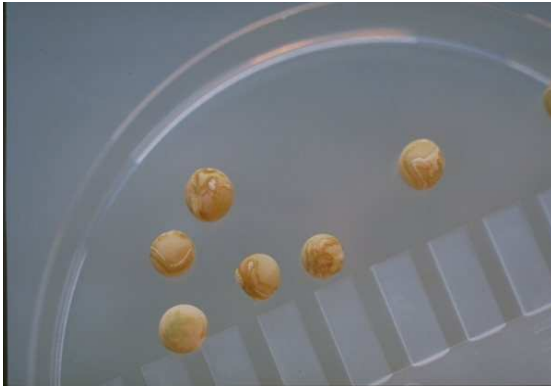
Typickými symptomy infekce rostlin je svinutí listů (viz. Obr. 2), dále se objevuje prosvětlování žilek, mozaika (viz. Obr. 4) a někdy i nekrózy. Napadená rostlina má obvykle také zdeformované, sterilní květy, zakrnělý vzrůst a často produkuje zdeformované lusky, které mají málo často zdeformovaných semen (viz. Obr. 3). Intenzita příznaků na napadené rostlině závisí na teplotních podmínkách a virovém izolátu (ICTVdB; Plant viruses online, 1984; <http://www.inra.fr>).



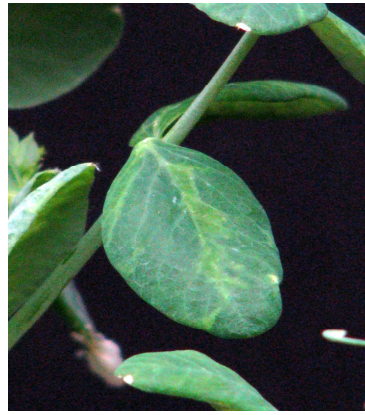
Obr. 1: Zdravá rostlina hrachu  
(podle: [botanika.wendys.cz/kytky/foto.php?488:2](http://botanika.wendys.cz/kytky/foto.php?488:2))



Obr. 2: Příznaky infekce PSbMV -  
svinutka listů



Obr. 3: Příznaky infekce PSbMV - nekrotické linie na semenech  
(podle: <http://www.inra.fr/hyp3/images/6034235.jpg>)



Obr. 4: Příznaky infekce PSbMV - mozaika na listech hrachu.

Oblast přirozených hostitelů pro PSbMV je omezena na *Fabaceae* (bobovité). Z hospodářsky významných zástupců virus infikuje především luštěniny (hrách, cizrnu, bob, čočku). Druhy specificky vnímavé v experimentálně indukované infekci virem jsou např.: *Beta vulgaris*, *Chenopodium album*, *Ch. amaranticolor*, *Ch. capitatum*, *Brassica campestris*, *B. oleracea*, *Cucurbita maxima* atd. (ICTVdB; Plant viruses online, 1984).

PSbMV je přenášen mšicemi jako například: *Acyrtosiphon pisum*, *Aphis craccivora*, *A. fabae*, *Dactynotus escalanti*, *Macrosiphum crataegarius*, *Rhopalosiphum padi*. Dále může být přenášen mechanickou inokulací, semeny (ICTVdB; Plant viruses online, 1984).

Byly popsány 4 patotypy PSbMV a to P-1, P-2, P-3 a P-4. Patotyp P1 není schopen infikovat hrách, který nese recesivní gen rezistence *sbm-1*. Patotyp P2 neinfikuje hrách s recesivními geny rezistence *sbm-2* a *sbm-3*. Patotyp P3 není schopen překonat rezistenci, kterou uděluje recesivní gen rezistence *sbm-3* a patotyp P4 není schopen infikovat rostliny hrachu s genem rezistence *sbm-4* (Alconero *et al.*, 1986; Johansen *et al.*, 2001).



## 7 Experimentální část

### Stanovení úrovně rezistence T3 generace transgenních rostlin hrachu

Cílem praktické části této bakalářské práce bylo vyhodnocení úrovně rezistence T3 generace transgenních rostlin hrachu vůči viru semenem přenosné mozaiky hrachu (PSbMV). Tato generace představuje potomstvo dříve selektovaných perspektivních linií hrachu, označených jako 10025/1 a 10025/2. K navození rezistence u těchto rostlin byl použit konstrukt pWell07a nesoucí dva krátké fragmenty genu pro plášťový protein PSbMV oddělené intronem, získané z izolátu PSB204CZ.

#### 7.1 *Materiál a metody*

##### 7.1.1 Rostlinný materiál

Pro experimentální část byly použity transgenní rostliny hrachu T3 generace kultivaru 'Raman', které byly získány z rostlin transformovaných konstruktem pWell07a nesoucím fragment *cp* genu PSbMV (Švábová *et al.*, 2005, 2007). Jako kontroly byly použity netransgenní rostliny hrachu téhož kultivaru. Rostliny byly pěstované v zemině v květináčích o průměru 10 cm, ve fytotronu s fotoperiodou 16h/8h (den/noc) při teplotě 22 °C ve dne a 18 °C v noci.

##### 7.1.1.1 Chemikálie pro DAS-ELISA

###### **PBS pufr (pH 7,4; 1000 ml):**

8 g	NaCl
0,2 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
2,9 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . 12 H <sub>2</sub> O
0,2 g	KCl

###### **Extrakční pufr (pH 7,4; 1000 ml):**

1000 ml	PBS pufru
0,5 ml	Tween 20
20 g	polyvinylpyrolidon K-25
10 g	vaječný albumin

###### **Koutovací pufr (pH 9,6; 1000 ml):**

1,59 g	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
2,93 g	NaHCO <sub>3</sub>

###### **Substrátový pufr (pH 9,8; 1000 ml):**

97 ml	diethanolamine
pH se upravuje koncentrovanou HCl	

<b>Konjugační pufr (pH 7,4; 1000 ml):</b>		<b>Promývací pufr:</b>	
1000 ml	PBS	1000 ml	1/5 PBS
20 g	polyvinylpyrolidon K-25	0,5 ml	Tween 20
2 g	vaječný albumin		
0,5 ml	Tween 20		

## 7.1.2 Metody

### 7.1.2.1 Mechanická inokulace

Pro experimentální inokulaci virem byl použit izolát PSbMV vykazující nejvyšší homologii s předpokládaným transgenem. Byl použit izolát PSB204CZ. Bylo inokulováno 60 rostlin hrachu T3 generace kultivaru 'Raman'.

Inokulát byl připraven tak, že bylo odebráno 15-20 listů z rostliny hrachu infikované izolátem PSB204CZ. Listy byly zváženy, vloženy do třecí misky a homogenizovány s fosfátovým pufrem (v poměru 1:5) a malým množstvím aktivního uhlí a celitu. Inokulát byl poté pomocí houbičky nanesen na 2 a 2 listy rostliny hrachu T3 generace z různého patra a ponechán působit 15 minut. Poté byly rostliny opláchnuty vodou a umístěny do fytotronu (Šafářová *et al.*, 2008).

### 7.1.2.2 DAS-ELISA

Pro detekci přítomnosti viru v rostlině byl použit imunoenzymatický test DAS-ELISA (Loewe Biochemica GmbH), podle protokolu výrobce.

ELISA destička byla připravena napipetováním 200  $\mu$ l směsi pufru a 'coating' protilátek (ředění 1000x) proti viru PSbMV do jamek a byla inkubována při 30 °C, 4 hodiny. Poté byla destička třikrát promyta promývacím pufrem. Následně bylo do jamek napipetováno 250  $\mu$ l extraktu, který byl připraven z listů testovaných rostlin, které byly homogenizovány v extrakčním pufrem v poměru 1:10. Destička byla inkubována při 4 °C přes noc a poté promyta promývacím pufrem. Po promytí bylo do jamek napipetováno 200  $\mu$ l konjugovaných protilátek v konjugačním pufrem (ředění 1000x). Destička byla opět

inkubována při 35 °C, 3 hodiny a poté promyta promývacím pufrem. Poté bylo do jamek napipetováno 200 µl substrátu (0,86 mg p-nitrophenylfosfát.Na<sub>2</sub> na 1 ml substrátového pufru) a destička byla inkubována 1 hodinu ve tmě při pokojové teplotě. Hodnocení absorbance bylo provedeno pomocí ELISA-readeru při vlnové délce 405 nm.

### 7.1.2.3 Izolace RNA

Totální RNA byla izolována z 50-100 mg listu pomocí kitu NucleoSpin RNA Plant (Macherey-Nagel, kat. č. 740 949.250), podle pokynů výrobce. Izolovaná RNA byla rozpuštěna v 60 µl RNase-free destilované vodě a dlouhodobě uchovávána v -80 °C.

### 7.1.2.4 Kvantitativní Real-Time RT-PCR

Pro kvantifikaci virové infekce byla použita kombinace primerů PSB6K1F a PSB6K1R podle Šafářová *et al.* (2010).

Kvantitativní Real-Time RT-PCR byla provedena pomocí kitu Absolute Q-RT PCR SYBR kit (ABIgene) podle pokynů výrobce v konečném objemu 25 µl pomocí Real-time cykleru RotorGene 3000 (Corbett Research, Austrálie).

#### Podmínky RT-PCR:

Reverzní transkripce	47 °C	45 minut	
Inaktivace AMV polymerázy	94 °C	15 minut	
Denaturace	94 °C	45 sekund	} 40 cyklů
Hybridizace primerů	54 °C	45 sekund	
Syntéza	72 °C	45 sekund	

Specifita PCR produktů byla ověřena pomocí analýzy teploty tání produktů a velikost získaných produktů pak pomocí elektroforetické separace v 1,5% agarózovém gelu v TAE pufru.

### **7.1.2.5 Hodnocení koncentrace viru v rostlině**

Koncentrace virové RNA v rostlině byla hodnocena pomocí  $C_T$  metody, RotorGene (Corbett Research). Jako standard (kalibrátor) byla použita koncentrace virové RNA zjištěná v infikované netransgenní kontrole.

## **7.2 Výsledky a diskuze**

Byla stanovena odolnost 34 rostlin T3 generace potomstva linie 10025/1 za pomoci mechanické inokulace rostlin virem PSbMV a následného sledování průběhu infekce a její detekce a kvantifikace pomocí ELISA testu a kvantitativní RT-PCR.

Vzhledem k charakteru a původu transgenu, který byl odvozen ze sekvence stejného izolátu použitého pro experimentální infekci, se očekávalo, že po vlastní infekci virem dojde k navození RNA zprostředkované rezistence a že rostliny budou vykazovat zvýšenou odolnost až rezistenci vůči viru.

### **7.2.1 Vizuální hodnocení odolnosti transgenních rostlin**

První příznaky infekce a šíření viru v rostlinách byly zaznamenány 17 dní po mechanické inokulaci virem. Byly pozorovány typické příznaky infekce PSbMV jako je mozaika, svinutka, prosvětlení žilek a zakrnělost rostlin. Jejich intenzita byla nižší než u kontrolních rostlin. U většiny rostlin došlo k výraznému zeslabení příznaků infekce při porovnání se silně příznakovými netransgenními kontrolními rostlinami. Po 39 dnech většina rostlin vykazovala jen slabou mozaiku (viz. Tabulka 1). Dále bylo pozorováno, že infikované transgenní rostliny byly stejně velké (vzrostlé) jako neinfikované kontrolní rostliny (viz. Příloha 3).

Tabulka 1: Vizuální hodnocení symptomů infekce na rostlinách kultivaru 'Raman'

Označení rostliny	Hodnocení symptomů		Označení rostliny	Hodnocení symptomů	
	15.12.2008 (14 dnů p.i.)	9.1.2009 (39 dnů p.i.)		15.12.2008 (14 dnů p.i.)	9.1.2009 (39 dnů p.i.)
10025/1/2/4	SV	SM	10025/1/3/8	SV	SM
10025/1/2/3	M	SM, SV	10025/1/4/1	-	SSV
10025/1/2/2	M, SV	SV, SM	10025/1/4/2	SV, PZ	SV, M
10025/1/2/1	SSV	SSV, SM	10025/1/4/3	SV, PZ	SSV, M
10025/1/1/6	SSV	SSV	10025/1/4/4	-	SSV
10025/1/1/5	SV	M, OSV	10025/1/2/5	SV	M
10025/1/1/4	SV	SV	10025/1/3/1	SSV	M
10025/1/1/3	SV, PZ	SV	10025/1/4/6	SSV	SV, Z
10025/1/1/2	SV, SM	SM, SSV	10025/1/5/1	-	O
10025/1/1/1	SV	SV	10025/1/5/2	SV	SV, M
10025/2/2/3	PZ	SM	10025/1/5/3	Z, SV	SM, Z
10025/2/2/12	PZ	SM	10025/1/5/4	Z, SV	SSV, Z
10025/1/3/2	SV, PZ	M	10025/1/5/5	SV	SM
10025/1/3/3	SV	SM	10025/1/5/6	SV	M
10025/1/3/4	SV, SM	SV, SM	10025/1/5/7	SV	OM
10025/1/3/5	SV, M	M	10025/1/6/1	SV	SSV
10025/1/3/6	SV	SSV, M	k8	Z, M	Z, M
10025/1/3/7	SV	SM			

Vysvětlivky: p.i.- po inokulaci, SV-svinutka, SM-slabá mozaika, M-mozaika, SSV-slabá svinutka, PZ-prosvětlení žilek, OSV-odrůstá svinutka, Z-zakrslost, O-odrůstá, OM-odrůstající rostlina, slabá mozaika, - -bez příznaků

## 7.2.2 Hodnocení infekce PSbMV pomocí DAS-ELISA

Vlastní přítomnost viru v rostlinách byla úspěšně detekována imunoenzymatickým testem DAS-ELISA ve všech testovaných 34 transgenních rostlinách kultivaru 'Raman'. Získané výsledky potvrdily stoprocentní úspěšnost mechanické inokulace virem, jeho replikaci a také šíření v rostlinách.

## 7.2.3 Stanovení relativní koncentrace viru v rostlině

Použitá metoda relativní kvantifikace viru za pomoci Q-RT-PCR při srovnání s infikovanou kontrolní rostlinou potvrdila předchozí výsledky vizuálního hodnocení a DAS-ELISA. Přítomnost viru byla prokázána ve všech rostlinách.

Z grafu 1 je patrné, že po 17 dnech po odběru byla koncentrace viru v transgenních rostlinách v některých případech nižší, ale srovnatelná s netransgenní infikovanou kontrolou a v některých případech byla koncentrace viru výrazně vyšší.

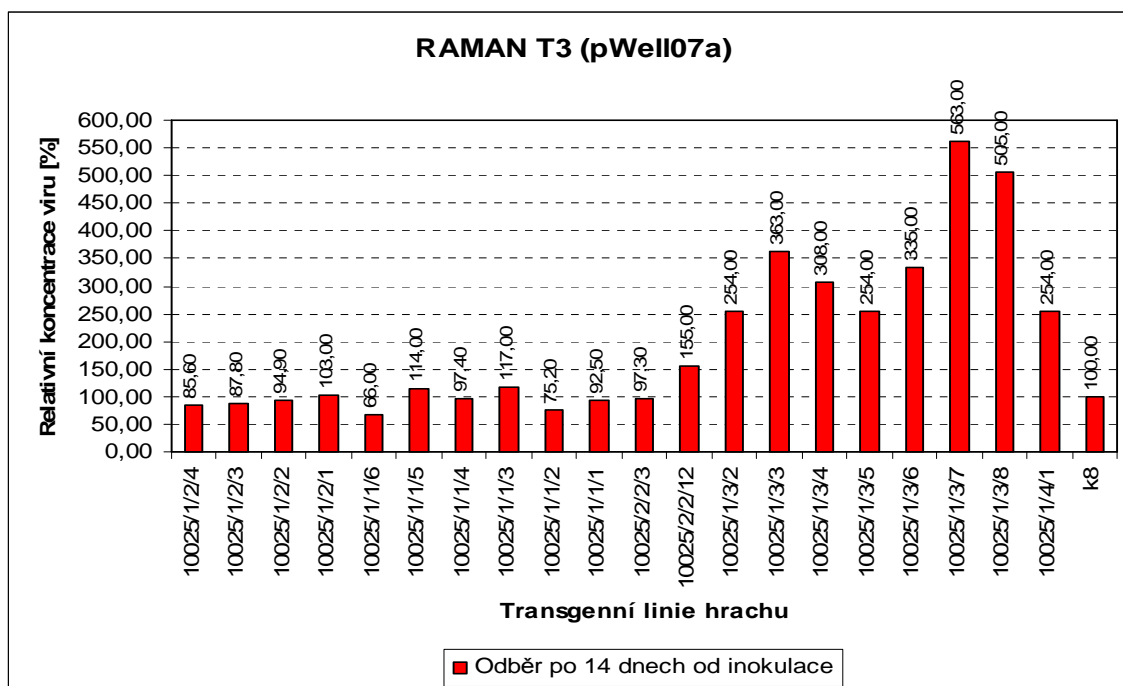
S cílem zjištění možných změn koncentrace viru a s ohledem na výrazné zeslabení symptomů infekce pozorované u transgenních rostlin byla u vybraného vzorku rostlin provedena opakovaná kvantifikace virové infekce po 17 a 39 dnech po inokulaci. Při druhé analýze (po 39 dnech) byla u všech analyzovaných rostlin zjištěna mnohonásobně nižší koncentrace viru ve srovnání s infikovanou natransgenní kontrolou (viz. Graf 2).

Analýza teploty tání potvrdila specifitu amplifikovaných fragmentů. Nebyl detekován žádný nespecifický produkt.

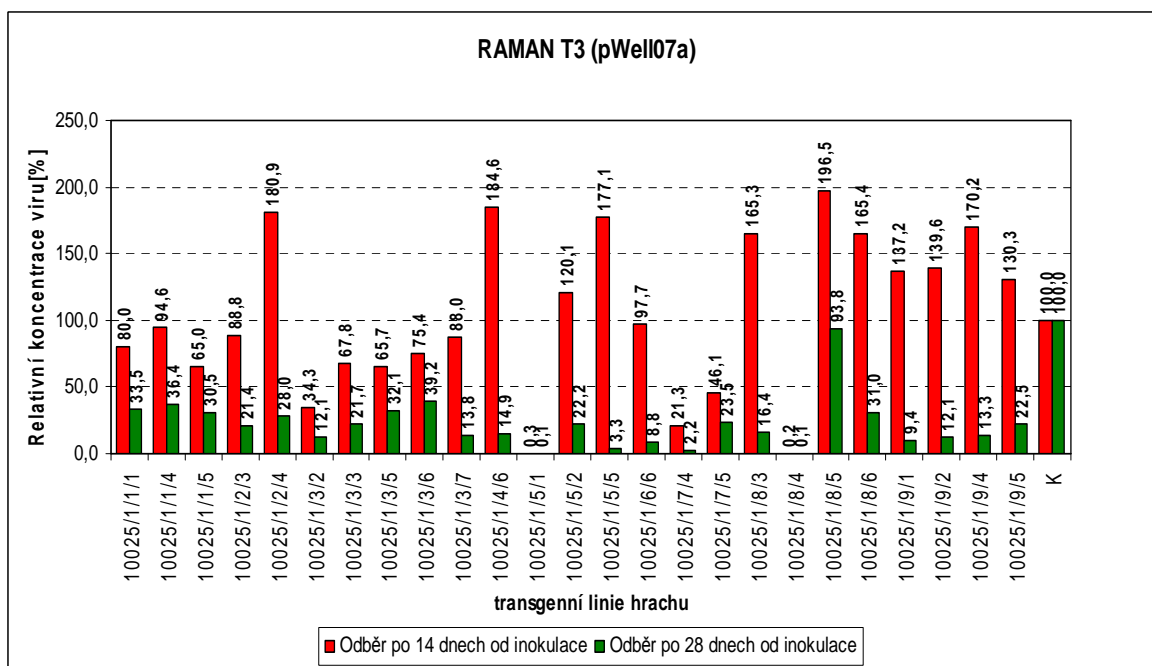
Pozorované změny intenzity příznaků infekce a zjištěný výrazný pokles koncentrace viru v testovaných rostlinách ukazují, že v rostlinách dochází k indukci rezistence. Rostliny si udržují odolnost vůči PSbMV, na základě které byly testované linie selektovány (Klocová, 2008).

Transgen vnesený do rostlin hrachu tedy pravděpodobně funguje, vzhledem k pozorovanému poklesu koncentrace viru v infikovaných transgenních rostlinách a aktivuje mechanismus PTGS.

Graf 1: Výsledky komparativní kvantifikace virové infekce



Graf 2: Výsledky komparativní kvantifikace virové infekce



## 8 Závěr

Všechny testované rostliny kultivaru 'Raman' T3 generace vykazovaly po inokulaci virem slabé příznaky PSbMV. Přítomnost viru byla detekována i pomocí DAS-ELISA testu, což potvrdilo úspěšnost mechanické inokulace, replikace a šíření viru v rostlinách.

Při hodnocení intenzity virové infekce pomocí kvantitativní RT-PCR a metody komparativní kvantifikace, byla po 17 dnech od inokulace zjištěna různorodá relativní koncentrace viru, v některých rostlinách byla nižší, v jiných vyšší, při srovnání s netransgenní infikovanou kontrolou. Při hodnocení po 39 dnech došlo u všech rostlin k výraznému poklesu koncentrace viru, což ukazuje, že v transgenních rostlinách docházelo k posttranskripčnímu umlčování virové infekce (PTGS) a tím ke snížení koncentrace viru, tj. v rostlinách je indukována rezistence vůči viru.



## 9 Seznam zkratek

<b>PSbMV</b>	- <i>Pea seed-borne mosaic virus</i> - virus semenem přenosné mozaiky hrachu
<b>R geny</b>	- Rezistentní geny
<b>avr geny</b>	- avirulentní geny
<b>HR</b>	- hypersenzitivní reakce
<b>HC-Pro</b>	- helper component protease
<b>ROS</b>	- reaktivní formy kyslíku
<b>PCD</b>	- programovaná buněčná smrt
<b>NB-LRR</b>	- nucleotide-binding site plus leucine-rich repeat - místo vázající nukleotidy a bohaté na leucinové opakování
<b>CC</b>	- coiled-coil doména
<b>LZ</b>	- leucine zipper doména
<b>TMV</b>	- <i>Tobacco mosaic virus</i>
<b>PMMV</b>	- <i>Pepper mild mottle virus</i>
<b>BYMV</b>	- <i>Bean yellow mosaic virus</i>
<b>TEV</b>	- <i>Tobacco etch virus</i>
<b>AMV</b>	- <i>Alfalfa mosaic virus</i>
<b>PVY</b>	- <i>Potato virus Y</i>
<b>PVX</b>	- <i>Potato virus X</i>
<b>TSWV</b>	- <i>Tomato spotted wilt virus</i>
<b>TVMV</b>	- <i>Tobacco vein mottling virus</i>
<b>CTV</b>	- <i>Citrus tristeza virus</i>
<b>PRVS</b>	- <i>Papaya ringspot virus</i>
<b>ZYMV</b>	- <i>Zucchini yellow mosaic virus</i>
<b>RNA</b>	- ribonukleová kyselina
<b>scFv</b>	- single-chain variable fragment
<b>CP</b>	- coat protein - plášťový protein
<b>PDR</b>	- Pathogen-derived resistance
<b>DNA</b>	- deoxyribonukleová kyselina
<b>ORF</b>	- otevřený čtecí rámeček
<b>TGB</b>	- triple gene block
<b>RdRp</b>	- RNA-dependent RNA-polymerase

<b>kDa</b>	- kiloDalton
<b>dsRNA</b>	- dvouvláknová RNA
<b>siRNA</b>	- malá interferující RNA
<b>PTGS</b>	- post-transcriptional gene silencing - posttranskripční genové umlčování
<b>TGS</b>	- transcriptional gene silencing - transkripční genové umlčování
<b>mRNA</b>	- mediátorová RNA
<b>miRNA</b>	- mikro RNA
<b>ssRNA</b>	- jednovláknová RNA
<b>RISC</b>	- RNA-induced silencing komplex

## 10 Seznam použité literatury

ABEL, P. P., NELSON, R. S., DE, B., HOFFMANN, N., ROGERS, S. G., FRALEY, R. T., BEACHY, R. N. (1986): Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science* 232: 738-743.

ALCONERO, L., PROVVIDENTI, R., GONSALVES, D. (1986): Three Pea seed borne mosaic virus pathotypes from pea and lentim germ plasm. *Plant Disease* 70: 783-786.

ANDERSON, J. M., PALUKAITIS, P., ZAITLIN, M. (1992): A defective replicase gene induces resistance to cucumber mosaic virus in transgenic tobacco plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 89: 8759-8763.

ASANO, M., SATOH, R., MOCHIZUKI, A., TSUDA, S., YAMANAKA, T., NISHIGUCHI, M., HIRAI, K., MESHI, T., NAITO, S., ISHIKAWA, M. (2005): Tobamovirus resistant tobacco generated by RNA interference directed against host genes. *FEBS Letters* 579: 4479-4484.

AUDY, P., PALUKAITIS, P., SLACK, S. A., ZAITLIN, M. (1994): Replicase mediated resistance to potato virus Y in transgenic tobacco plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 7: 15-22.

BARTEL, D. P. (2004): MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116: 281-297.

BAULCOMBE, D. C. (1996): Mechanisms of pathogen-derived resistance to viruses in transgenic plants. *The Plant Cell* 8: 1833-1844.

BAULCOMBE, D. C. (2004): RNA silencing in plants. *Nature* 431: 356-363.

BECK, D. L., GUILFORD, P. J., VOOT, D. M., ANDERSEN, M. T., FORSTER, R. L. S. (1991): Triple gene block proteins of white clover mosaic potexvirus are required for transport. *Virology* 183: 695-702.

BECK, D. L., VAN DOLLEWEERD, C. J., LOUGH, T. J., BALMORI, E., VOOT, D. M., ANDERSEN, M. T., O'BRIEN, I. E. W., FORSTER, R. L. S. (1994): Disruption of virus movement confers broad-spectrum resistance against systemic infection by plant viruses with a triple gene block. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 91: 10310-10314.

BENDAHMANE, A., KANYUKA, K., BAULCOMBE, D. C. (1999): The *Rx* gene from potato controls separate virus resistance and cell death responses. *Plant Cell* 11: 781-792.

BRAUN, C. J., HEMENWAY, C. L. (1992): Expression of amino-terminal portion or full-length viral replicase genes in transgenic plants confers resistance to Potato virus X infection. *Plant Cell* 4: 735-744.

BREDERODE, F. T., TASCHNER, P. E., POSTHUMUS, E., BOL, J. F. (1995): Replicase-mediated resistance to alfalfa mosaic virus. *Virology* 207: 467-474.

- BRIGNETI, G., VOINNET, O., LI, W. X., JI, L. H., DING, S. W., BAULCOMBE, D. C. (1998): Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *EMBO Journal* 17: 6739-6746.
- BROMMONSCHENKEL, S. H., FRARY, A., FRARY, A., TANKSLEY, S. D. (2000): The broad-spectrum tospovirus resistance gene *Sw-5* of tomato is a homolog of the root-knot nematode resistance gene *Mi*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13: 1130-1138.
- COOPER, B., LAPIDOT, M., HEICK, J. A., DODDS, J. A., BEACHY, R. N. (1995): A defective movement protein of TMV in transgenic plants confers resistance to multiple viruses whereas the functional analog increases susceptibility. *Virology* 206: 307-313.
- DE HAAN, P., GIELEN, J. J. L., PRINS, M., WIJKAMP, I. G., VAN SCHEPEN, A., PETERS, D., VAN GRINSVEN, M. Q. J. M., GOLDBACH, R. (1992): Characterization of RNA-mediated resistance to tomato spotted wilt virus in transgenic tobacco plants. *Bio-Technology* 10: 1133-1137.
- DIAZ-PENDON, J. A., TRUNIGER, V., NIETO, C., GARCIA-MAS, J., BENDAHMANE, A., ARANDA, M. A. (2004): Advances in understanding recessive resistance to plant viruses. *Molecular Plant Pathology* 5: 223-233.
- DONSON, J., KEARNEY, C. M., TURPEN, T. H., KHAN, I. A., KURATH, G., TURPEN, A. M., JONES, G. E., DAWSON, W. O., LEWANDOWSKI, D. J. (1993): Broad resistance to tobamoviruses is mediated by a modified tobacco mosaic virus replicase transgene. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 6: 635-642.
- EWERT, S., HONEGGER, A., PLÜCKTHUN, A. (2004): Stability improvement of antibodies for extracellular and intracellular applications: CDR grafting to stable frameworks and structure-based framework engineering. *Methods* 34: 184-199.
- GERMUNDSSON, A., VALKONEN, J. P. T. (2006): P1- and VPg-transgenic plants show similar resistance to *Potato virus A* and may compromise long distance movement of the virus in plant sections expressing RNA silencing-based resistance. *Virus Research* 116: 208-213.
- GOLDBACH, R., BUCHER, E., PRINS, M. (2003): Resistance mechanisms to plant viruses: an overview. *Virus Research* 92: 207-212.
- GOLEMBOSKI, D. B., LOMONOSSOFF, G. P., ZAITLIN, M. (1990): Plants transformed with a tobacco mosaic virus nonstructural gene sequence are resistant to the virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 87: 6311-6315.
- GOODMAN, R. N., NOVACKY, A. J. (1994): *The Hypersensitive Reaction in Plants to Pathogens*. St Paul: APS Press.
- GOREGAOKER, S. P., ECKHARDT, L. G., CULVER, J. N. (2000): Tobacco mosaic virus replicase-mediated cross-protection: contributions of RNA and protein-derived mechanisms. *Virology* 273: 267-275.

- GURR, S. J., RUSHTON, P. J. (2005): Engineering plants with increased disease resistance: what are we going to express? *Trends in Biotechnology* 23: 275-282.
- HAMILTON, A. J., BAULCOMBE, D. C. (1999): A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286: 950-952.
- HAN, J., LEE, Y., YEOM, K. H., NAM, J. W., HEO, I., RHEE, J. K., SOHN, S. Y., CHO, Y., ZHANG, B. T., KIM, V. N. (2006): Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell* 125: 887-901.
- HEATH, M. C. (2000): Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Current Opinion in Plant Biology* 3: 315-319.
- JAN, F. J., FAGOAGA, C., PANG, S. Z., GONSALVES, D. (2000): A single chimeric transgene derived from two distinct viruses confers multi-virus resistance in transgenic plants through homology-dependent gene silencing. *Journal Of General Virology* 81: 2103-2109.
- JOHANSEN, E., LUND, O. S., HJULSAGER, CH. K., LAURSEN, J. (2001): Recessive resistance in *Pisum sativum* and Potyvirus pathotype resolved in a Gene-for-cistron correspondence between host and virus. *Journal of Virology* 75: 6609-6614.
- JONES, A. L., THOMAS, C. L., MAULE, A. J. (1998): *De novo* methylation and co-suppression induced by a cytoplasmically replicating plant RNA virus. *EMBO Journal* 17: 6385-6393.
- JONES-RHOADES, M. W., BARTEL, D. P., BARTEL, B. (2006): MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annual Review of Plant Biology* 57: 19-53.
- KANG, B. C., YEAM, I., JAHN, M. M. (2005): Genetics of plant virus resistance. *Annual Review of Phytopathology* 43: 581-621.
- KASSCHAU, K. D., CARRINGTON, J. C. (1998): A counter-defensive strategy of plant viruses: suppression of post-transcriptional gene silencing. *Cell* 95: 461-470.
- KLOCOVÁ, B. (2008): Rezistence hrachu vůči viru semenem přenosné mozaiky hrachu (bakalářská práce). Univerzita Palackého v Olomouci.
- LAPIDOT, M., GAFNY, R., DING, E., WOLF, S., LUCAS, W. J., BEACHY, R. N. (1993): A dysfunctional movement protein of tobacco mosaic virus that partially modifies the plasmodesmata and limits virus spread in transgenic plants. *Plant Journal* 4: 959-970.
- LECOQ, H., LEMAIRE, J. M., WIPF-SCHEIBEL, C. (1991): Control of zucchini yellow mosaic virus in squash by cross protection. *Plant Disease* 75: 208-211.
- LEE, Y., AHN, C., HAN, J., CHOI, H., KIM, J., YIM, J., LEE, J., PROVOST, P., RADMARK, O., KIM, S., KIM, V. N. (2003): The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425: 415-419.

- LIN, S-S., HENRIQUES, R., WU, H-W., NIU, Q-W., YEH, S-D., CHUA, N-H. (2007): Strategies and mechanisms of plant virus resistance. *Plant Biotechnology Reports* 1: 125-134.
- LINDBO, J. A., SILVA-ROSALES, L., PROEBSTING, W. M., DOUGHERTY, W. G. (1993): Induction of a highly specific antiviral state in transgenic plants: Implications for regulation of gene expression and virus resistance. *Plant Cell* 5: 1749-1759.
- LOMONOSSOFF, G. P. (1995): Pathogen-derived resistance to plant viruses. *Annual Review Of Phytopathology* 33: 323-343.
- LU, B., STUBBS, G., CULVER, J. N. (1998): Coat protein interactions involved in tobacco mosaic tobamovirus cross-protection. *Virology* 248: 188-198.
- MACFARLANE, S. A., DAVIES, J. W. (1992): Plants transformed with a region of the 201-kilodalton replicase gene from pea early browning virus RNA1 are resistant to virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 89: 5829-5833.
- MARANO, M. R., BAULCOMBE, D. (1998): Pathogen-derived resistance targeted against the negative-strand RNA of tobacco mosaic virus: RNA strand-specific gene silencing? *Plant Journal* 13: 537-546.
- MOISSIARD, G., VOINET, O. (2006): RNA silencing of host transcripts by cauliflower mosaic virus requires coordinated action of the four Arabidopsis Dicer-like proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 103: 19593-19598.
- MULLER, G. W., COSTA, A. S. (1977): Tristeza control in Brazil by preimmunization with mild strains. *Proc Int Soc Citric* 3: 868-872.
- MUSIL, M. (1966): Über das vorkommen des Blattrollens der Erbse in der Slowakei (Vorläufige mitteilung). *Biologia* 21: 133-138.
- OLSEN, B. S., JOHANSEN, I. E. (2001): Nucleotide sequence and infectious cDNA clone of the L1 isolate of *Pea seed-borne mosaic potyvirus*. *Archives of Virology* 146: 15-25.
- PIÁKOVÁ, Z., POKORNÝ, R., DOSTÁLOVÁ, R. (2006): Výskyt virových patogenů hrachu na území ČR. *Úroda* 2: 10-11.
- PRINS, M., LAIMER, M., NORIS, E., SCHUBERT, J., WASSENEGGER, M., TEPFER, M. (2008): Strategies for antiviral resistance in transgenic plants. *Molecular Plant Pathology* 9: 73-83.
- PRINS, M., LOHUIS, D., SCHOTS, A., GOLDBACH, R. (2005): Phage display-selected single-chain antibodies confer high levels of resistance against *Tomato spotted wilt virus*. *Journal of General Virology* 86: 2107-2113.
- PROVVIDENTI, R., ALCONERO, R. (1988): Inheritance of resistance to a lentil strain of pea seed-borne mosaic virus in *Pisum sativum*. *Journal of Heredity* 79: 45-47.

PROVVIDENTI, R., ALCONERO, R. (1988): Inheritance of resistance to a third pathotype of pea seed-borne mosaic virus in *Pisum sativum*. *Journal of Heredity* 79: 76-77.

RAST, A. T. B. (1972): MII-16, an artificial symptomless mutant of tobacco mosaic virus for seedling inoculation of tomato crops. *North J Plant Pathol* 78 :110-112.

REGISTER III, J. C., BEACHY, R. N. (1988): Resistance to TMV in transgenic plants results from interference with an early event in infection. *Virology* 166: 524-532.

REIMANN-PHILIPP, U., BEACHY, R. N. (1993): Coat protein-mediated resistance in transgenic tobacco expressing the tobacco mosaic virus coat protein from tissue-specific promoters. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 6: 323-330.

SANFORD J. C., JOHNSTON S. A. (1985): The concept of parasite-derived resistance: deriving resistance genes from the parasite's own genome. *Journal of Theoretical Biology* 113: 395-405.

SAVENKOV, E. I., VALKONEN, J. P. T. (2002): Silencing of a viral RNA silencing suppressor in transgenic plants. *Journal of General Virology* 83: 2325-2335.

SHAW, J. G., PLASKITT, K. A., WILSON, T. M. (1986): Evidence that tobacco mosaic virus particles disassemble contrantranslationally in vivo. *Virology* 148: 326-336.

SMITH, N. A., SINGH, S. P., WANG, M. B., STOUTJESDIJK, P., GREEN, A., WATERHOUSE, P. M. (2000): Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature* 407: 319-320.

SPASSOVA, M. I., PRINS, T. W., FOLKERTSMA, R. T., KLEIN-LANKHORST, R. M., HILLE, J., GOLDBACH, R. W., PRINS, M. (2001): The tomato gene *Sw-5* is a member of the coiled coil, nucleotide binding, leucine-rich repeat class of plant resistance genes and confers resistance to TSWV in tobacco. *Molecular Breeding* 7: 151-161.

ŠAFÁŘOVÁ, D., NAVRÁTIL, M., PETRUSOVÁ, J., POKORNÝ, R., PIÁKOVÁ, Z. (2008): Genetic and biological diversity of the Pea seed-borne mosaic virus isolates occurring in Czech Republic. *Acta virologica* 52: 53-57.

ŠAFÁŘOVÁ, D., NAVRÁTIL, M., ŠVÁBOVÁ, L., HORÁČEK, J., GRIGA, M., HANÁČEK, P., REINÖHL, V. (2010): Phenotypic Behaviour of GM Peas Expressing PSbMV Coat Protein Sequences after Mechanical Inoculation with Pea Seed-borne Mosaic Virus. *Proceedings of 5th International Food Legume Research Conference (IFLRC) & 7th European Conference on Grain Legumes (AEP)*, April 26-30, Antalya (v tisku).

ŠVÁBOVÁ, L., SMÝKAL, P., GRIGA, M., ONDŘEJ, V. (2005): *Agrobacterium*-mediated transformation of *Pisum sativum* *in vitro* and *in vivo*. *Biologia Plantarum* 49 (3): 361-370.

ŠVÁBOVÁ, L., SMYKAL, P., GRIGA, M. (2007): *Agrobacterium*-mediated transformation of pea (*Pisum sativum* L.): Transformant production *in vitro* and by non-tissue culture approach. *Proceeding of The Fourt International Food Legumes Research Conference (IFLRC-IV)*, 12pp.

TAVLADORAKI, P., BENVENUTO, E., TRINCA, S., DEMARTINIS, D., CATTANEO, A., GALEFFI, P. (1993): Transgenic plants expressing a functional single-chain Fv antibody are specifically protected from virus attack. *Nature* 366: 469-472.

TENLLADO, F., DÍAZ-RUÍZ, J. R. (2001): Double-stranded RNA-mediated interference with plant virus infection. *Journal of virology* 75: 12288-12297.

TENLLADO, F., GARCIA-LUQUE, I., SERRA, M. T., DIAZ-RUIZ, J. R. (1995): *Nicotiana benthamiana* plants transformed with the 54-kDa region of the pepper mild mottle tobamovirus replicase gene exhibit two types of resistance responses against viral infection. *Virology* 211: 170-183.

TENLLADO, F., GARCIA-LUQUE, I., SERRA, M. T., DIAZ-RUIZ, J. R. (1996): Resistance to pepper mild mottle tobamovirus conferred by the 54-kDa gene sequence in transgenic plants does not require expression of the wild-type 54-kDa protein. *Virology* 219: 330-335.

WANG, M. B., WATERHOUSE, P. M. (2001): Application of gene silencing in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 146-150.

WATANABE, Y., OGAWA, T., TAKAHASHI, H., ISHIDA, I., TAKEUCHI, Y., YAMAMOTO, M., OKADA, Y. (1995): Resistance against multiple plant viruses in plants mediated by a double stranded-RNA specific ribonuclease. *FEBS Letters* 372: 165-168.

WATERHOUSE, P. M., GRAHAM, M. W., WANG, M. B. (1998): Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 95: 13959-13964.

WATERHOUSE, P. M., SMITH, N. A., WANG, M-B. (1999): Virus resistance and gene silencing: killing the messenger. *Trends in Plant Science* 4: 1360-1385.

WESLEY, S. V., HELLIWELL, CH. H., SMITH, N. A., WANG, M. B., ROUSE, D. T., LIU, Q., GOODING, P. S., SINGH, S. P., ABBOTT, D., STOUTJESDIJK, P. A., ROBINSON, S. P., GLEAVE, A. P., GREEN, A. G., WATERHOUSE, P. M. (2001): Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *The Plant Journal* 27: 581-590.

WHITHAM, S., MCCORMICK, S., BAKER, B. (1996): The N gene of tobacco confers resistance to tobacco mosaic virus in transgenic tomato. *Proceedings of the national academy of sciences of the USA* 93: 8776-8781.

YEH, S. D., GONSALVES, D. (1984): Evaluation of induced mutants of papaya ringspot virus for control by cross protection. *Phytopathology* 74: 1086-1091.

YU, H., KUMAR, P. P. (2003): Post-transcriptional gene silencing in plants by RNA. *Plant Cell Rep* 22: 167-174.

Plant viruses online: <http://www.agls.uidaho.edu/ebi/vdie/descr575.htm> (1984).

ICTVdB-The Universal Virus Database: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdB/ICTVdB/>



## **Přílohy**



Příloha 1:  
příznaky infekce PSbMV na rostlinách hrachu - list infikované netrasgenní rostliny hrachu (nahore), list infikované transgenní (ozdravené) rostliny (dole).



Příloha 2:  
příznaky infekce PSbMV na rostlinách hrachu: slabá mozaika a svinutka listů.



**Příloha 3:**

Porovnání symptomů infekce PSbMV na rostlinách hrachu - infikovaná netrasgenní rostlina (vlevo), infikovaná transgenní rostlina (uprostřed), zdravá netrasgenní kontrola (vpravo).