

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra ochrany rostlin



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

Použití rostlinných virů pro transientní expresi

Doktorská disertační práce

Ing. Jakub Dušek

Zemědělská a lesnická fytopatologie a ochrana rostlin

Školitel: prof. Ing. Pavel Ryšánek, CSc.

Konzultant: Mgr. Tomáš Moravec, Ph.D.

© 2022 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Použití rostlinných virů pro transienční expresi" jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 14. 4. 2022

Poděkování

Rád bych touto cestou poděkoval školiteli práce prof. Ing. Pavlu Ryšánkovi, CSc. za možnost pracovat na tomto zajímavém tématu. Ústavu experimentální botaniky AV ČR, v. v. i., konkrétně laboratoři virologie a jejímu vedoucímu Mgr. Tomáši Moravcovi, Ph.D. za cenné rady, trpělivost a ochotu kdykoli pomoci. Dále bych rád poděkoval dalším členům laboratoře - Doc. RNDr. Noemi Čeřovské, CSc. a RNDr. Oldřichu Navrátilovi, Ing. Jitce Svobodové a Lence Kolčabové za to, že jsem s nimi mohl strávit příjemné chvíle a pomohli mi vždy, když jsem potřeboval. Nakonec chci poděkovat i své rodině za podporu při studiu.

Použití rostlinných virů pro transientní expresi

Souhrn

Předkládaná doktorská disertační práce se zabývá transientní expresí proteinů v rostlinách pomocí virových vektorů. Sledování průběhu exprese bylo usnadněno použitím reportérových genů, zejména fluorescenčních. Byly použity reportéry GFP, DsRed a GUS. Expresní konstrukty byly vytvořeny na základě tobamoviru TMV (virus mozaiky tabáku) a geminiviru BeYDV (virus žluté zakrslosti fazolu). U konstruktů odvozených od BeYDV byl sledován vliv přítomnosti replikačního/replikačního asociačního proteinu (Rep/RepA) v cis/trans konfiguraci na sílu exprese. Kromě silného konstitutivního promotoru 35S byly vytvořeny plazmidy obsahující dva různé, chemicky indukovatelné, promotory 5xM a LexA. Ty aktivují expresi v rostlinách *N. benthamiana* u markerových genů nebo Rep/RepA po přidání příslušných aktivačních chemikálií.

Virové vektory byly detekovány pomocí PCR, fluorescenční a elektronové mikroskopie. Jedním z cílů práce bylo i vytvoření RNA-proteinových VLP částic. Proběhla i úspěšná sekundární inokulace rostlin pomocí vytvořených VLP.

V rámci této práce byla rozšířena současná klonovací strategie GoldenBraid o 4 nové destinační plazmidy, které urychlují, usnadňují a zlevňují tvorbu komplexnějších, vícegenových konstruktů. Z dat získaných v této části práce vznikla vědecká publikace, a plazmidy byly uloženy v depozitáři Addgene aby byly dostupné všem uživatelům.

Klíčová slova: Syntetická biologie, Viru podobné částice, Virové vektory, Virus mozaiky tabáku, Virus žluté zakrslosti fazolu

Use of plant viruses for transient expression

Summary

This dissertation deals with the transient expression of proteins in plants using viral vectors. Monitoring the progress of expression was facilitated by the use of reporter genes, particularly fluorescent genes, namely GFP, DsRed and GUS reporters were used. The expression constructs were based on TMV tobamovirus (tobacco mosaic virus) and BeYDV geminivirus (bean yellow dwarf virus). The effect of the presence of Rep/RepA proteins (Rep/RepA) in the cis/trans configuration on expression levels was investigated for the BeYDV-derived constructs. In addition to the strong constitutive 35S promoter, plasmids were generated containing two different chemically inducible promoters - 5xM and LexA. These promoters drive marker or Rep / RepA gene expression upon addition of appropriate activating chemicals in *N. benthamiana* plants.

The viral vectors were detected by PCR, fluorescence and electron microscopy. One of the aims of the work was to generate RNA-protein VLPs. Successful secondary inoculation of plants with established VLPs was also carried out.

As a part of this work, 4 new target plasmids were added to the current GoldenBraid cloning strategy, making the creation of more complex multi-gene constructs faster, easier and cheaper. A scientific publication was produced from the data obtained in this part of the work and the plasmids were stored in the Addgene repository so that they are available to all users.

Keywords: Synthetic biology, Virus-like particles, Viral vectors, Tobacco mosaic virus, Bean yellow dwarf virus

Obsah

1	Úvod.....	9
2	Vědecké hypotézy a cíle práce	10
3	Literární rešerše	11
3.1	Rostlinné viry	11
3.1.1	Způsoby přenosu.....	12
3.2	Šíření viru v rostlině.....	12
3.3	Obrana rostlin proti virům	13
3.3.1	Hypersenzitivní reakce.....	14
3.4	Expresní systémy založené na rostlinných buňkách	15
3.4.1	Permanentní rostlinná exprese	15
3.4.2	MAR sekvence.....	16
3.4.3	Promotory.....	16
3.5	Transientní rostlinná exprese	17
3.5.1	Transientní exprese pomocí rostlinných virových vektorů	17
3.5.1.1	RNA virové vektory	20
3.5.1.2	DNA virové vektory.....	20
3.6	Geminiviridae	20
3.7	Alphaflexiviridae	21
3.8	Virgaviridae	22
3.9	Syntetická biologie	23
3.9.1	Metoda GoldenBraid	24
3.9.1.1	Klonovací struktura <i>LacZ</i>	25
3.10	Reportérové geny	26
3.10.1	β -glukuronidáza (GUS).....	26
3.10.2	Zelený fluorescenční protein (GFP)	27
3.10.2.1	Žlutý fluorescenční protein (YFP).....	28
3.10.3	Červený fluorescenční protein (DsRed)	28
4	Metodika	29
4.1	Složení použitých médií a pufřů	29
4.1.1	Kultivační a infiltrační média	29
4.1.2	Pufry.....	29
4.2	GoldenBraid klonování	30
4.2.1	Domestikace DNA sekvencí metodou GoldenBraid do vstupních plazmidů pUPD 30	
4.2.2	Domestikace DNA sekvencí metodou GoldenBraid do binárních plazmidů pDGB 33	

4.3	Transformace <i>Escherichia coli</i> pomocí teplotního šoku a jejich kultivace ...	35
4.3.1	Izolace plazmidové DNA	35
4.4	Kontrolní restriční štěpení plazmidové DNA.....	35
4.5	Sekvenace plazmidové DNA.....	36
4.6	Pěstování rostlin.....	37
4.6.1	Tabáky	38
4.6.2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	38
4.6.3	Pěstování rostlin <i>in vitro</i>	38
4.7	Transformace <i>Agrobacterium tumefaciens</i> pomocí teplotního šoku a jeho kultivace	39
4.8	Agroinfiltrace	40
4.9	Měření a zobrazování fluorescence.....	40
4.9.1	Fotografie.....	40
4.9.2	Fluorescenční mikroskopie	40
4.9.3	Měření fluorescence	41
4.10	Sekundární inokulace rostlin virovými vektory	41
4.11	Extrakce rostlinné DNA.....	41
4.12	Extrakce virové RNA pomocí filtračního papíru	42
4.13	Reverzní transkripce	43
4.14	PCR (Polymerázová řetězová reakce)	44
4.15	Horizontální agarózová gelová elektroforéza	44
4.16	Purifikace VLP.....	45
4.17	Transmisní elektronová mikroskopie	45
4.18	Stabilní transformace rostlin	46
4.18.1	Transformace rostlin <i>N. benthamiana</i>	46
4.18.2	Transformace rostlin <i>A. thaliana</i>	47
4.19	Aktivace inducibilních promotorů.....	48
5	Výsledky	49
5.1	Rozšíření konvence GoldenBraid o nové alfa plazmidy.....	49
5.2	Přizpůsobení BeYDV vektorů pro konvenci Golden Braid	49
5.3	Transientní exprese pomocí replikujících se a nereplikujících se vektorů ...	50
5.3.1	Nekrózy na listech <i>N. benthamiana</i>	52
5.4	Systém tvorby TMV VLP.....	53
5.4.1	Tvorba TMV VLP.....	54
5.4.2	Detekce VLP pomocí PCR.....	58
5.4.3	Sekundární inokulace TMV VLP	59
5.5	Detekce VLP pomocí transmisní elektronové mikroskopie	59
5.6	Vliv přítomnosti replikázy na tvorbu proteinu pomocí geminivirových vektorů	61
5.7	Permanentní rostlinná transformace	63

5.8	Transientní inducibilní exprese	64
6	Diskuze	66
6.1	Rozšíření konvence GoldenBraid o nové plazmidy	66
6.2	Replikující a nereplikující se virové vektory.....	67
6.2.1	Tvorba TMV VLP.....	68
6.2.2	Nekrotizující listy <i>N. benthamina</i>	69
6.3	Transientní inducibilní exprese	69
6.4	Aplikace GoldenBraid ve strategii CRISPR/Cas9	70
6.5	Transgenní rostliny	71
7	Závěr	72
8	Literatura.....	73
9	Seznam použitých zkratk a symbolů	81
10	Seznam grafů	83
11	Seznam obrázků	83
12	Seznam tabulek.....	84
13	Samostatné přílohy	I

1 Úvod

Rostlinné viry jsou obligátními vnitrobuněčnými parazity rostlin. Často napadají kulturní plodiny a v napadených porostech mohou způsobovat značné škody. Na tyto parazity však můžeme pohlížet z více stránek. Virus nemusí být pouze fytopatogenem, ale může sloužit i ve vědě a výzkumu – například k expresi cenných proteinů, k umlčování exprese endogenních genů, nebo pro rozšíření genové informace v rostlině.

Expresní systémy založené na rostlinných buňkách představují zajímavou alternativu k současným expresním systémům. Mohou být ve formě buněčné kultury/suspense nebo i celé rostliny. Mezi výhody rostlin patří nepřítomnost živočišných patogenů a toxinů, podobné post-translační modifikace jako v savčích buňkách, nezávislost na nedefinovaných komplexních živných mediích odvozených ze zvířat (například FBS, fetal bovine serum) a v neposlední řadě i výhodná cena finálního produktu (Yusibov & Mamedov 2010). Pro laboratorní expresi rekombinantních peptidů/proteinů je nejpoužívanější rostlina tabáku *Nicotiana benthamiana*, a pro expresi v rostlinné buněčné kultuře/suspenzi jsou to buňky tabáku *Nicotiana tabacum* cv. BY-2.

2 Vědecké hypotézy a cíle práce

Dílčí hypotézy:

- Na úroveň exprese markerového proteinu u geminivirových vektorů má vliv přítomnosti virové replikázy a i její pozice (cis/trans).
- Úroveň exprese markerového proteinu u geminivirových vektorů závisí na pozici (pořadí) jednotlivých genů ve vektoru.
- Pro vytvoření viru podobné částice odvozené od TMV je nezbytná přítomnost pouze dvou komponent – obalového proteinu a RNA s enkapsidačním počátkem. Vzniklé VLP mohou být použity pro přenos nereplikující se RNA na další rostliny.

Cíle práce byly:

- Rozvinout stávající způsob klonování GoldenBraid o nové plazmidy a tím zjednodušit a urychlit tvorbu nových konstruktů. Tento způsob aplikovat na tvorbu viru podobných částic odvozených od virů čeledí *Geminiviridae* a *Virgaviridae*.
- Vytvořit virové vektory společně s reportérovými geny, pomocí kterých bude možné detekovat hladinu exprese a možnost jejich přenosu na další rostliny. U viru žluté zakrslosti fazolu sledovat úroveň exprese závislé na přítomnosti (nepřítomnosti) Rep/RepA.

3 Literární řešerše

3.1 Rostlinné viry

Jako rostlinné viry označujeme všechny viry, které jsou schopny infikovat rostlinné buňky a replikovat se v nich. Na rozdíl od živočišných buněk jsou rostlinné buňky chráněny buněčnou stěnou. Rostlinné viry nejsou samy o sobě schopny aktivně proniknout přes buněčnou stěnu do rostlinné buňky. Viry tak mohou do buňky proniknout pouze poškozenými místy. K těmto poškozením dochází buď mechanicky, nebo působením jiného organismu (tzv. vektoru). Pomocí vektorů je přenášeno asi 80 % virů. Nejčastějším vektorem je hmyz – mšice, křísi a molice. Některé rostlinné viry jsou ale přenášeny i houbami, roztoči a parazitickými rostlinami (například kokotice). Virus se do buňky dostává pomocí ústního ústrojí hmyzu. Další možností je přenos pomocí pylu, semenem nebo roubováním infekčního materiálu na zdravé pletivo (Gray & Banerjee 1999; Andret-Link & Fuchs 2005; Hull 2009).

Mezi nejrozšířenější a ekonomicky nejškodlivější virové patogeny patří například: virus svinutky bramboru (potato leafroll virus, PLRV), který může způsobit až 90% redukci výnosu bramborových hlíz, Y virus bramboru (potato virus Y, PVY) způsobující až 80% redukci výnosu hlíz, nebo virus šarky švestky (plum pox virus, PPV). Tento virus je nejškodlivější a nejrozšířenějším virem peckovin v Evropě (Dědič 2014; García et al. 2014).

Většina rostlinných virů má název odvozen od hlavního symptomu a převládajícího hostitele (občas i hostitele, u kterého byl virus poprvé popsán). Některé viry jsou schopny infikovat celou rostlinu bez zjevných příznaků. Stávají se tak zdrojem pro další šíření viru. Zdrojem infekce tak mohou být jak planě rostoucí rostliny, tak i bezpříznakové okrasné rostliny (Hull 2009).

Rostlinné viry se skládají z genetické informace uložené ve formě RNA nebo DNA a proteinu, který obaluje tuto genetickou informaci – kapsidového proteinu. Genetická informace může být buď ve formě jednovláknové (single-stranded, ss) nebo dvouvláknové (double-stranded, ds). Většina rostlinných virů obsahuje genetickou informaci ve formě (+)ssRNA (přibližně 75 %). Dále existují viry s (-)ssRNA, dsRNA, ssDNA a dsDNA (Agrios 2005). V laboratořích se nejčastěji pracuje s viry obsahujícími (+)ssRNA.

3.1.1 Způsoby přenosu

Podle charakteru interakce virus - vektor můžeme u hmyzu a roztočů rozlišit přenos na perzistentní, neperzistentní nebo na semiperzistentní.

U neperzistentního přenosu se rostlinný virus váže na receptor v ústním ústrojí. K tomu stačí krátké akviziční sání (řádově vteřiny). Vektor je infekční pouze krátkou dobu, přibližně v řádu hodin. Virus není schopen se ve vektoru šířit ani množit. Tímto způsobem se šíří například virus mozaiky kvěťáku (cauliflower mosaic virus, CaMV) nebo virus mozaiky vojtěšky (alfalfa mosaic virus, AMV).

Pro perzistentní přenos je nutné dlouhé sání z infikované rostliny. Virus v přenašeči přechází do hemolymfy, odtud do slinných žláz a zpět do slin. Časový úsek, kdy prochází virem tělem živočicha, se nazývá inkubační doba. Hmyz během tohoto období není infekční. Po prodělání inkubace se hmyz stává infekčním. Vektor si ponechává infekčnost po dlouhou dobu, někdy i celý život. Pokud je virus schopný pomnožit se v orgánech vektoru, mluvíme o přenosu perzistentním cirkulativním. Mezi tyto viry patří například virus bronzovitosti rajčete (tomato spotted wilt virus, TSWV) nebo virus žluté zakrslosti ječmene (barley yellow dwarf virus, BYDV).

Pro semiperzistentní přenos stačí obvykle kratší sání z nakažené rostliny než u přenosu perzistentního a doba infekčnosti vektoru je delší než u neperzistentního přenosu, maximálně však do jeho svlékání. Virus neprochází latentní periodou, jako je tomu u přenosu perzistentního (Regenmortel & Mahy 2009; Caranta & Aranda 2011; Dědič 2014).

3.2 Šíření viru v rostlině

V případě, že je infikovaná rostlinná buňka k viru vnímavá, dochází během několika hodin k změně jejího metabolismu – započne replikační cyklus viru. Infekce první buňky je odlišný proces od systémové infekce. Tento proces začíná v místě inokulace první buňky a po namnožení se virus dále šíří celou rostlinou. Ve vstupním místě viru do rostliny se mohou vyvíjet lokální příznaky (Hull 2009; Matthews 2012).

Rostlinné buňky jsou vzájemně propojeny plasmodesmaty, která spojují cytoplasmu jednotlivých buněk. Virus se tedy může šířit mezi jednotlivými buňkami prostým pohybem v cytoplasmě. Následně tak dochází k sekundární infekci dalších buněk v pletivu (Hull 2013). Pro tento transport využívají viry tzv. pohybové proteiny (MP – movement proteins).

Pohybové proteiny zvyšují propustnost plazmodezmat a umožňují tak transport virových částic nebo virových ribonukleoproteinových komplexů, které by bez přítomnosti pohybových proteinů plazmodezmaty neprošly. Pohybové proteiny jsou kódovány virovým genomem. Tento způsob přenosu z buňky do buňky se nazývá cell-to-cell movement (Lucas 2006).

Většina rostlinných virů má pohybové proteiny dobře definované. Můžeme identifikovat viry s jediným pohybovým proteinem, se dvěma pohybovými proteiny (DGB – double-gene block) a dokonce se třemi pohybovými proteiny (TGB – triple-gene block). Do skupiny s TGB patří například X virus bramboru. Nezastupitelnou úlohu ve všech fázích interakce virus rostlina má i obalový protein, bez kterého by pohyb nebyl možný (Morozov & Solovyev 2003). Do skupiny DGB patří například virus nekrotické skvrnitosti melounu (melon necrotic spot virus, MNSV), který náleží do čeledi *Tombusviridae* (Navarro et al. 2006).

Na větší vzdálenosti se viry šíří vodivými pletivy (především floémem) – těmi se viriony roznášejí do jiných částí rostliny. Faktory ovlivňující rychlost šíření viru jsou např. druh viru, druh rostliny a vnější podmínky (Hull 2013).

3.3 Obrana rostlin proti virům

Rostliny se brání vůči virové infekci různými mechanismy a adaptacemi. Z důvodu svého stacionárního způsobu života se rostlina vůči infekci brání většinou pasivně – anatomickými a morfologickými vlastnostmi rostliny – první obrannou bariérou vůči napadení mikroorganismem. Mezi tyto pasivní způsoby ochrany patří například: voskem pokrytá buněčná stěna, přítomnost kutikuly, či jiná úprava pokožky, která zabraňuje vniknutí patogena (vektora) do organismu, ale i antimikrobiální látky v rostlině, tzv. fytoanticipiny. (“Odolnost rostlin k patogenům | Genetika rostlin | Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity” n.d.).

Rostliny mohou reagovat na patogeny různě. Vnímavé rostliny mohou vykazovat příznaky onemocnění. Odolné rostliny mají receptory, které se nachází v cytoplasmě a v jádře buněk. Ty interagují s patogeny a spouštějí obranné mechanismy. Tyto receptory jsou zaměřené pouze na určitý protein konkrétního viru (monogenně). K jejich překonání často stačí i bodová mutace virového genomu, ta však může na druhou stranu přinést omezení biologické zdatnosti viru. Viry překonávající rezistenci jsou výsledkem přirozené evoluce a nedá se proti nim účinně bránit (Godiard et al. 1994; Al-Kaff et al. 1998).

Většina rostlin je k většině virů imunní, protože nejsou vhodnými hostiteli, to je tzv. nehostitelská rezistence (Broekaert et al. 1995). Nehostitelská rezistence, kterou projevuje celý rostlinný druh vůči specifickému parazitovi nebo patogenu, je nejběžnější a nejtrvalejší formou odolnosti rostlin vůči choroboplodným organismům (Mysore & Ryu 2004; Baeshen et al. 2014).

3.3.1 Hypersenzitivní reakce

Častou reakcí rostlin k infekci virem je tzv. hypersenzitivní reakce (HR – Hypersensitive response). Tento proces popisuje E. C. Stakman již v roce 1915. Ve svém článku popisuje rychlou smrt hostitelských buněk u rostlin ječmene, pšenice a ova infikovaných patogenem *Puccinia graminis*.

HR je klasifikována jako forma programované buněčné smrti (PCD - programmed cell death), představující jeden z mechanismů rostlinné obrany před infekcí. Ta představuje nekrózu infikovaných buněk a tím zabránění dalšího šíření viru. Rostlina raději obětuje část zdravých buněk, aby vytvořila fyzickou bariéru mezi infikovaným a neinfikovaným pletivem. Mezi látky, které doprovázejí HR, patří například: reaktivní formy kyslíku, ethylen, rostlinné hormony, jako jsou kyselina salicylová a jasmonová (Iakimova et al. 2005; Soosaar et al. 2005). Během PCD dochází navíc k posílení buněčné stěny ukládáním různých fenolických sloučenin, syntéze toxických sloučenin (fytoalexinů) a akumulaci proteinů s antimikrobiální aktivitou - fytoanticipiny (Dangl et al. 1996).

Aby rostlina spustila HR, je nutná přítomnost rostlinných proteinů kódovaných dominantními geny rezistence (tzv. dominantní R geny). Proteiny kódované dominantními R geny mají povahu receptorů rozpoznávajících patogeny (PRR - pathogen recognition receptors) a rozeznávají kromě bakteriálních a houbových také virové molekulární motivy spojené s patogenitou (PAMP - pathogen-associated molecular patterns). Mezi ně patří například nukleové kyseliny, struktury kapsidových a pohybových proteinů. Tím je například gen Rx1 u PVX, který je obsažen v genetickém kódu pro tvorbu kapsidového proteinu (de Ronde et al. 2014).

3.4 Expresní systémy založené na rostlinných buňkách

Rostliny slouží lidstvu již dlouhou dobu jako zdroj potravy, krmiva, energie, stavebního materiálu, textilních vláken a i v mnoha dalších oblastech potřebných pro člověka. Významné jsou i pro svoji schopnost biosyntézy mnoha zajímavých sekundárních metabolitů. Tyto metabolity mohou člověku sloužit jako léčiva, ochucovadla nebo barviva. Sekundární metabolity rostlinám také slouží jako ochrana před hmyzem, houbami, býložravci nebo konkurenčními rostlinami (Wink 1988). V poslední době se stále častěji rostliny využívají i k produkci rekombinantních proteinů pro využití v medicíně nebo průmyslu. Rostliny zde představují zajímavou alternativu k jiným expresním systémům, jako jsou například bakterie, kvasinky, nebo savčí buňky (Frommer & Ninnemann 1995; Baeshen et al. 2014).

3.4.1 Permanentní rostlinná exprese

Při permanentní (stabilní) expresi dojde k trvalému začlenění genetické informace do genomu rostliny. Vložený gen se pak stabilně dědí z generace na generaci (Gleba et al. 2007). Transformace rostlin pomocí *Agrobacterium tumefaciens* je nejčastější metodou k dosažení trvalé transformace. Tyto bakterie obsahují Ti plazmid, do kterého je možné vložit příslušný konstrukt, který má být exprimován. Po inokulaci bakteriemi je do genomu hostitelské rostliny začleněna T – DNA, část bakteriálního plazmidu ohraničená tzv. hraničními (border) oblastmi. Tato DNA je náhodně integrována do jaderného genomu (Baulcombe et al. 1995; Kapila et al. 1997).

Další metodou je biolistická metoda – principem této metody je adsorpce DNA na částice kovu (nejčastěji zlata), kterými jsou bombardovány rostlinné buňky pomocí genové pistole. Tímto způsobem může dojít k poškození jak jaderného, tak i chloroplastového genomu a k integraci transgenů za přispění buněčných DNA-opravných mechanismů. V případě chloroplastu dochází k homologní rekombinaci – gen je vložen do specifické oblasti genomu. V jaderném genomu je gen vložen do náhodného místa (Kikkert et al. 2005; Scotti et al. 2012).

Obě tyto metody využívají schopnosti totipotence – z pouhé jediné buňky s integrovaným genem může vzniknout celá rostlina. Použití *Agrobacterium* (oproti biolistické metodě) obecně snižuje pravděpodobnost tvorby tandemových a dalších vysokokopiových

genových inzertů, a tedy i menší pravděpodobnost transkripční inaktivace (Wang & Ma 2011). Biolistická metoda rovněž není vhodná pro velmi velké genové konstrukty, které se během integrace často rozpadnou na menší fragmenty (Ondřej & Drobník 2002).

3.4.2 MAR sekvence

MAR (Matrix Attachment Region) se vyskytují v genomech vyšších eukaryot a jsou organizovány do smyčkových domén chromatinu. Tyto úseky jsou dlouhé 200 až 1000 bp a jsou bohaté na nukleotidy AT. MAR plní funkci ve strukturní organizaci genomu a mohou usnadňovat transkripci genů, prostřednictvím tvorby méně kondenzované struktury chromatinu (Řepková 2013).

MAR tedy mohou zlepšit expresi a stabilitu transgenů u trvalé transformace (Halweg et al. 2005 p. 7), ale i u transienční exprese (Diamos et al. 2016). Bylo popsáno několik sekvencí MAR vyskytujících se u tabáku: RB7 (Allen et al. 1996; De Bolle et al. 2007), TM2 (Xue et al. 2005 p. 2) nebo TM6 (Ji et al. 2013 p. 6). Sekvence byly popsány i u sóji – P1 (Breyne et al. 1992; Petersen et al. 2002).

3.4.3 Promotory

Promotor označuje nukleotidovou sekvenci, která je rozpoznávána RNA polymerázou. Po jejich rozeznání se polymeráza naváže a je zahájena iniciace transkripce genu (Lewin 2007).

Dle funkce rozeznáváme více různých typů promotorů - konstitutivní, tkáňové nebo vývojově regulované, nebo promotory, které reagují na různé vnější podněty. V této práci jsme používali hlavně promotory konstitutivní a syntetické indukibilní promotory. Konstitutivní promotory jsou aktivní v různých rostlinných pletivech po celou dobu jejich existence (Alberts et al. 1998). Mezi konstitutivní promotory patří například 35S promotor pocházející z CaMV, který se často používá pro expresi transgenů v rostlinách. Inducibilní promotory spouštějí transkripci pouze za přítomnosti specifických chemických látek (Maizel & Weigel 2004) nebo fyzikálních stimulů. Fyzikálními stimuly mohou být například teplota u promotoru P_{hsp16} , který byl popsán u kvasinek (Fujita et al. 2006), nebo světlo u promotoru P-RbcS proteinu rubisco. P-RbcS je promotorem malých podjednotek proteinu RuBisCO a je indukován světlem (Outchkourov et al. 2003; Gautier et al. 2014).

Příkladem chemicky inducibilního promotoru je LexA, který společně s chimérickým transkripčním aktivátorem XVE a estradiolem (hormon z řady estrogenů) dosáhne aktivace (Zuo et al. 2000). Obdobně funguje promotor 5xM s aktivátorem VGE a chemickou látkou methoxyfenozidem (Koo et al. 2004).

Mezi další chemikálie (s příslušným inducibilním promotorem), které se dají použít k regulaci exprese, patří například měďnaté ionty, ethanol nebo dexamethason (Padidam 2003).

3.5 Transientní rostlinná exprese

Dosažení stabilní transformace a exprese v rostlinách je často zdlouhavý proces. Důvodem jsou dlouhé protokoly pro transformaci, které typicky vyžadují přibližně 3-4 měsíce, ale u některých rostlin se tato doba může prodloužit k jednomu roku. Po samotné transformaci je typicky nutné ještě z několika linií vybrat ty s vysokou a stabilní expresí a úroveň exprese sledovat po několik generací. Dosažení transientní (dočasné) exprese je oproti stabilní expresi mnohem rychlejší (řádově dny oproti měsícům až rokům), není tak náročná a velmi často produkuje větší množství požadovaného proteinu. Při transientní expresi se také využívá *A. tumefaciens* – gen kódující příslušný protein je pomocí této bakterie vpraven do jádra pouze některých rostlinných buněk (buňky listů, kořenů, semen a plodů). Zde dochází k přechodné extrachromozomální expresi. Exprese z integrované DNA hraje pouze malou roli – pravděpodobnost integrace DNA je pouze asi 5 %. Žádaný protein je možné detekovat již po několika hodinách až dnech (24 hod – 4 dny). Jako binární vektory se často využívají rostlinné virové vektory (Kapila et al. 1997; Chen et al. 2013).

3.5.1 Transientní exprese pomocí rostlinných virových vektorů

Rostlinné viry mohou být použity jako univerzální expresní vektory, které se využívají pro produkci rekombinantních proteinů v rostlinách (Yusibov et al. 2006). U transientní exprese, která je založená na rostlinných virech, nedochází k začlenění genetické informace do genomu rostliny. Virová infekce rostliny začíná vstupem infekčního materiálu do buňky. Následuje amplifikace a akumulace viru, který se poté za určitých okolností může rozšířit do celé rostliny. Většina rostlinných virů má RNA genom a replikuje se v buněčné cytoplazmě, nedochází k jejich začlenění do genomu hostitele. Používané viry také nebývají přenosné

semeny, tudíž nedochází k dědění expresního vektoru na následující generace. Některá uspořádání virových vektorů vytvářejí infekční virové částice, které mohou být purifikací z rostliny zpětně izolovány a použity pro infekci velkého množství rostlin bez nutnosti použití *Agrobacteria* (Koprowski & Yusibov 2001).

Inokulace hostitelské rostliny by měla být co nejjednodušší. Provádí se pomocí bakterie *A. tumefaciens* s vloženým virovým vektorem – ten zajišťuje systémovou distribuci v rostlině (Koprowski & Yusibov 2001). Nejprve za pomoci kompatibilních *vir* genů dojde k přenosu T-DNA do jádra buňky (Kapila et al. 1997; Jiang et al. 2003). Virový vektor většinou obsahuje úplnou nebo téměř úplnou infekční cDNA sekvenci rostlinného RNA viru pod kontrolou silného nebo inducibilního rostlinného promotoru pro DNA polymerázu II. Rostlinná buňka přepíše cDNA do formy mRNA. Zde se mohou vyskytnout jistá technická úskalí. Protože se RNA viry normálně replikují v cytoplazmě, nikdy nepřijdou do styku s rostlinným mechanismem sestřihu intronů z mRNA. Proto mohou sekvence některých virů přirozeně obsahovat kryptické introny, které je nutné pracně odstranit. Jindy může být transport infekční mRNA z jádra do cytoplasmy neúčinný a je nutné naopak nějaký intron do infekčního klonu přidat. Další úskalí spočívá v tom, že genomy některých virů neobsahují polyA konec, běžný pro většinu rostlinných mRNA. V takovém případě je zapotřebí na konec cDNA přidat autokatalytický ribozym (Siegel 1985; Verch et al. 1998; Cody & Scholthof 2019).

Sestavení strukturních virových proteinů do organizované makromolekulární struktury, která napodobuje autentické viry, se nazývá viru podobné částice (VLP, virus-like particles). Jedná se o jakési „prázdné obaly“, do kterých je možné vložit požadovaný obsah. Rekombinantní VLP mohou být produkovány v různých prokaryotických i eukaryotických organismech, tedy i v rostlinách (Santi et al. 2006; Huang et al. 2009).

Rostlina by měla být k viru tolerantní – tím dosáhneme vysoké koncentrace virů a tím i vysokého výtěžku (Koprowski & Yusibov 2001).

Genomy rostlinných virů nejsou příliš velké. Velikost genomů TMV a PVX se pohybuje v rozmezí 6 až 7 kb (Gleba et al. 2007). Geminivirové vektory jsou ještě menší. Například genom BeYDV má pouze 2561 bází (Liu et al. 1997). Z toho vyplývají i rozdíly v kapacitě prázdných virových vektorů, které jsou okolo 2000 bp pro geminivirové vektory a okolo 6000 bází pro vektory založené na TMV. Vektory založené na jiných RNA virech jsou zpravidla ještě větší. Vektory s menší celkovou velikostí jsou zpravidla i vhodnější a stabilnější během

klonování. Nevýhodou virových vektorů může být nestabilita genomu a omezená kapacita – většinou pouze jeden protein kódující gen (Chapman et al. 1992).

Některé virové vektory jsou odvozeny od virů s multipartitním genomem, jako má například virus kadeřavosti tabáku (tobacco rattle virus, TRV) (Ratcliff et al. 2001). V takovém případě se většinou modifikuje pro účely genové exprese jenom menší genom, zatímco větší část genomu je pouze zaklonována do binárního vektoru.

Další nevýhodou vektorů založených na RNA virech je, že úspěšná exprese požadovaného proteinu je zpravidla podmíněna pohybem vektoru z buňky do buňky a rozšířením virové infekce v listě. Je to dáno tím, že přenos kompletní virové RNA z jádra do cytoplasmy rostlinné buňky je málo pravděpodobný. V infiltrovaném sektoru dochází k produktivní virové infekci pouze v některých buňkách. Pokud je však virus schopen autonomního pohybu, velmi rychle dojde k jeho rozšíření. V některých virových vektorech je nový gen vložen na místo genu pro pohybový protein(γ), nebo plášťový protein. Tyto proteiny nejsou nezbytné pro replikaci viru. Takto dekonstruovaný virový vektor zvyšuje bezpečnost expresního systému – protože nedochází k tvorbě infekčních virových částic. Virová RNA se rostlinou zpravidla nešíří a nevznikají nové virové částice (Lindbo 2007). Chybějící funkce těchto genů je možné nahradit jinak – buďto pomocí transientní ko-exprese, nebo pomocí transgenních rostlin, které zajistí chybějící funkci.

Fitness přirozeného viru závisí na jeho schopnosti provádět různé funkce, jako jsou například: počáteční infekce hostitele, amplifikace/replikace nukleových kyselin, translace proteinů, sestavení kompletních virionů, šíření z buňky do buňky, rozšíření infekce na větší vzdálenosti, přeprogramování hostitelských biosyntetických procesů včetně zastavení některých buněčných funkcí, potlačení silencingu hostitele, interakce s vektorem a přenos do další rostliny a další schopnosti. U virového vektoru jsou vyžadovány pouze některé z těchto funkcí. Účinný virový vektor by měl mít navíc alespoň jednu novou funkci, kterou je hlavně vysoká úroveň exprese jednoho nebo více heterologních genů (Gleba et al. 2014).

Jedním z cílů exprese je i výroba vakcín. Oproti tradiční výrobě vakcín v mikrobiálních nebo zvířecích systémech má produkce v rostlinách několik výhod – nedochází k potenciální kontaminaci zvířecími nebo i lidskými patogeny (např. viry a priony); rostlinné systémy jsou efektivnější (levnější) než průmyslová zařízení využívající fermentaci nebo bioreaktorové systémy; v praxi je již většinou technika umožňující sběr a zpracování rostlinného materiálu ve velkých množstvích známá; například, nemusí probíhat purifikace vakcíny, pokud je antigen

vakcíny určen k orální imunizaci; dále se využívá větší rychlost exprese a většinou i množství produkovaného proteinu; snížení nákladů a doby potřebné na výzkum a vývoj; vysoká flexibilita (Koprowski & Yusibov 2001; Streatfield et al. 2001; Daniell et al. 2001; Mason et al. 2002).

3.5.1.1 RNA virové vektory

Mezi nejpoužívanější RNA virové vektory v dnešní době patří TMV a PVX. Tyto virové vektory využívají genomy odvozené od (+) ssRNA zmíněných virů (Scholthof et al. 1996).

Po agroinfiltraci (+)ssRNA genomu viru do jádra buňky dojde k transkripci. Vzniklý transkript je transportován do cytoplazmy a reprezentuje virový genom. Rostlinné (+)ssRNA viry se běžně do jádra buňky nedostávají - jejich životní cyklus se odehrává v cytoplazmě. Proto je často nutné virový genom optimalizovat, a to například odstraněním kryptických míst pro splicing. To umožní bezproblémový transport infekčního transkriptu do cytoplazmy (Gleba et al. 2007).

3.5.1.2 DNA virové vektory

Kromě virů s RNA genomem jsou populární i DNA vektory na bázi geminivirů, jako je například BeYDV. Tento virový vektor popisují Regnard et al. (2010).

U geminivirů je nutné agroinfiltrací vpravit do buňky i expresní kazetu pro replikázu. Ta zajišťuje vyštěpení virového ssDNA genomu z T-DNA, jeho následnou cirkulizaci a replikaci. Díky tomu připadá na jednu infikovanou buňku až několik tisícovek episomů (Hefferon 2014).

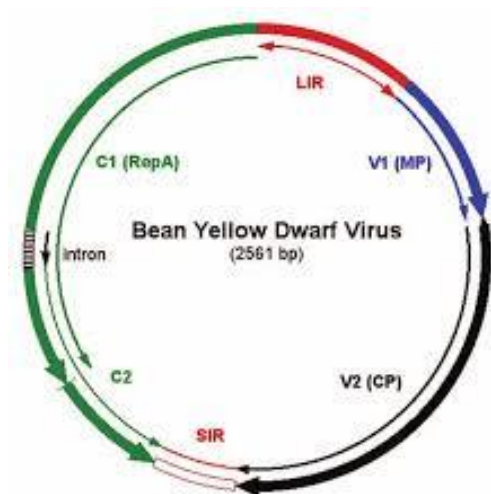
3.6 Geminiviridae

Virus žluté zakrslosti fazolu je mastrevirus z čeledi *Geminiviridae*. Má jednovláknovou kruhovou DNA, která se dokáže intenzivně množit. Každá částice obsahuje právě jednu kruhovou molekulu DNA (Murphy et al. 2012). Genom se skládá z dlouhého intergenového regionu (LIR – long intergenic region), krátkého intergenového regionu (SIR – short intergenic region), a čtyř otevřených čtecích rámců (ORF – open reading frame). LIR sekvence tvoří vlásenku, obsahující konzervovanou sekvenci TAATATTAC, díky které dochází k iniciaci replikace. Naproti tomu SIR sekvence obsahuje obousměrný polyadenylační signál, ukončující replikaci. Otevřené čtecí rámce jsou: V1, V2, C1 a C2. Tyto čtecí rámce jsou obousměrné a kódují vznik čtyř proteinů: pohybový protein, obalový protein a dva replikační proteiny – Rep

a RepA (Lazarowitz & Shepherd 1992; Liu et al. 1997). Schéma virového genomu je vidět na Obrázku 1.

Výhodou DNA vektorů je vyšší přesnost replikace oproti RNA vektorům, které se nacházejí v cytosolu, schopnost v jediné buňce exprimovat několik genů zároveň, možnost použití standardních rostlinných promotorů. RNA replikony s velkými inserty navíc často trpí nestabilitou (Palmer & Rybicki 1998).

K cirkulaci a replikaci geminivirových replikonů v hostitelských buňkách je zapotřebí jen několik relativně krátkých sekvencí. Těmito částmi jsou LIR, SIR a Rep/RepA čtecí rámec. T-DNA s replikonem obsahuje kopie LIR, které vytvoří hranice cirkulující DNA. Sekvence Rep/RepA může být umístěna na stejný plazmid (pozice cis), nebo může být na odděleném/samostatném plazmidu (pozice trans). Pokud je Rep/RepA v pozici cis, je obvykle vložen v antisense orientaci mezi částmi SIR a LIR2 (Hefferon et al. 2004; Regnard et al. 2010).



Obrázek 1: **Schéma genomu viru BeYDV.** LIR obsahuje obousměrný promotor, který spouští obousměrnou transkripci: (V1 pohybový protein, V2 plášťový protein) v jednom směru (sense) s (C1 RepA, C1/C2 Rep obsahujícím intron) v antisense (Chen et al. 2011).

3.7 Alphaflexiviridae

X virus bramboru patří do rodu *Potexvirus*. Virová částice tvoří flexibilní, vláknitou, helikální strukturu, připomínající pružné vlákno. Délka je v okolo 500 nm. Průměr částice je cca 13 nm (Francki et al. 2012).

Jeho genom je tvořen (+) ss RNA o délce 6 435 nukleotidů (Skryabin et al. 1988). Genom je rozdělen do pěti ORFs. První čtecí rámec (ORF1) kóduje virovou replikázu. ORF 2, 3 a 4 tvoří TGB. Ty slouží k tvorbě pohybového proteinu. ORF5 má funkci tvorby obalového proteinu,

jehož hlavní funkcí je ochrana virové RNA, ale je nepostradatelný i při šíření viru z buňky do buňky a pro šíření viru systémem rostliny. Genom obsahuje 5' čepičku a na 3' konci má poly-A sekvenci. Nepřekládaná oblast na 5' konci virové RNA (5' UTR; untranslated region) je dlouhá 84 nukleotidů, obsahuje enkapsidační signál, reguluje syntézu subgenomových RNA a její součástí je translační zesilovač (enhancer) (Verchot-Lubicz et al. 2007).

PVX je v přírodě přenášen pouze mechanicky – není přenášen vektory ani semeny. Po ulpění na povrch zůstává infekční až 6 hodin. Jeho hostitelem jsou převážně rostliny z čeledi lilkovitých (*Solanaceae*) – například lilek brambor a tabák selský. Symptomy jsou závislé na typu virového izolátu a odrůdě daného hostitele. Nejčastěji se ale jedná o mozaiku, zvlnění listů a retardace růstu (Francki et al. 2012; Yardımcı et al. 2018).

3.8 Virgaviridae

Virus mozaiky tabáku patří do rodu *Tobamovirus*. Stejně jako PVX virion obsahuje jednovláknovou molekulu RNA s kladnou polaritou (+) ssRNA. Délka genomu tohoto viru činí 6 395 nukleotidů. 3' konec neobsahuje poly-A sekvenci. Genom TMV byl osekvenován již v roce 1982, tedy jako jeden z prvních v historii (Goelet et al. 1982; Dawson & Lehto 1990).

Genom tobamovirů obsahuje informaci pro vznik 4 proteinů. Dva proteiny tvoří RdRp polymerázu, další tvoří pohybový a plášťový protein (Cann 2011). Plášťové proteiny tvoří dutou šroubovici, která má tvar tuhé tyčinky. Délka virové částice je 300 nm a šířka je v průměru 19 nm (Namba et al. 1989).

Proces sbalování částice můžeme rozdělit do dvou hlavních částí: iniciace a elongace. Iniciace enkapsidace je specifický proces. Dochází při něm k rozpoznání sekvence počátku sbalování částic (Origin of assembly sequence - OAS), která se nachází na virové RNA a vždy obsahuje nukleotidovou sekvenci AAGAAGUCG. Tato sekvence interaguje s vazebným místem v kapsidovém proteinu a nachází se v blízkosti 3' konce virové RNA (Turner et al. 1988; Hwang et al. 1994). OAS sekvence byla osekvenována již v roce 1977 (Zimmern 1977).

Elongace je již nespecifický proces, který není závislý na sekvenci enkapsidované RNA. Velikost složené částice je závislá na délce RNA, která interaguje s kapsidovými proteiny a společně tvoří celý virion. V některých případech mohou vznikat i pseudočástice, které neobsahují RNA. Takovéto částice nemají délku závislou na molekule RNA a jejich délka je náhodná (Butler 1984; Harrison et al. 1999).

TMV má široký rozsah hostitelů – bylo popsáno více než 200 rostlinných druhů v 11 čeledích, o nichž je známo, že mohou být hostitely. Mezi ně patří například lilkovité (*Solanaceae*), tykvovité (*Cucurbitaceae*), pryskyřníkovité (*Ranunculaceae*) nebo kakostovité (*Geraniaceae*). Nejčastějšími příznaky jsou mozaika, malformace listů, výrazné žloutnutí (především žilnatiny) a nekrózy, které jsou často na stoncích (Shew & Lucas 1991).

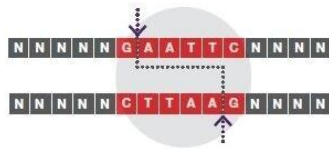
3.9 Syntetická biologie

Na pomezí několika vědních oborů (například výpočetní techniky, bioinženýrství, molekulární biologie a evoluční biologie) vzniká v současné době nový obor - syntetická biologie (Haseloff & Ajioka 2009). Jednou z hlavních výzev v syntetické biologii rostlin je přenos složitějších multigenních struktur do rostlinného genomu. K jejich sestavování slouží nové techniky modulárního klonování – jednotlivé, předem připravené části (moduly), jsou pomocí předem stanovených pravidel - konvencí, sestaveny dohromady. Tento postup byl vřele přijat, protože nabízí hned několik výhod. Mezi ně patří například rychlost, univerzálnost, tj. možnost sdílet již připravené a otestované části mezi laboratořemi pro nové aplikace, kombinatorické možnosti a nízká cena (Ellis et al. 2011). Lze očekávat, že tyto postupy přispějí k vývoji biologie podobnou měrou, jako měla standardizace průmyslových výrobků pro průmyslovou revoluci v druhé polovině 19. století.

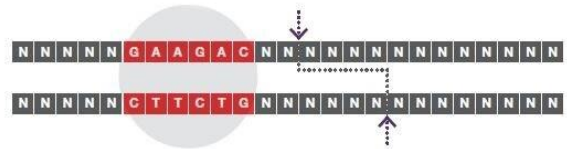
Výhodou živých buněk je jejich schopnost se replikovat. S vloženou DNA sekvencí je možno z buněk vytvořit továrnu na výrobu požadovaného proteinu (Gibson et al. 2008). I přes všechny výhody, které syntetická biologie nabízí, se tento obor potýká s množstvím problémů, jako jsou například regulace, etika, politické a společenské otázky související s tímto oborem. To znamená i případné zneužití umělých organismů (Haseloff & Ajioka 2009; Huang et al. 2016).

Jedním ze způsobů modulárního klonování je způsob nazvaný Golden Gate (Engler et al. 2009). Tento systém využívá restričních enzymů typu IIS. Ty jsou podobné klasickým restričním enzymům typu II (například *EcoRI/EcoRV/PstI*). Nicméně, namísto štěpení přímo v cílové sekvenci, enzymy IIS (například *BbsI/Bsa/BsmBI*) štěpí mimo cílovou sekvenci (viz Obrázek 2).

Typ restrikčního enzymu II

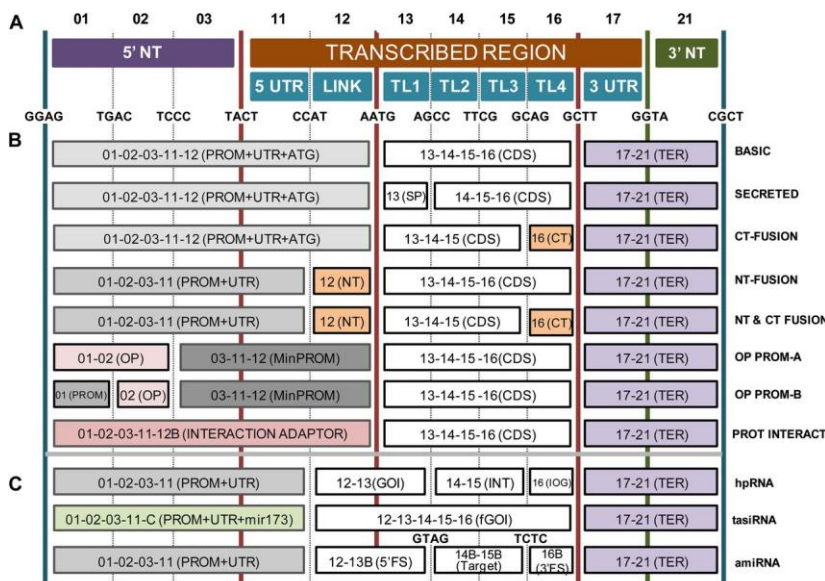


Typ restrikčního enzymu IIS



Obrázek 2: Ukázka rozdílu mezi restrikčními enzymy typu II a IIS. Na levé straně je konkrétně zobrazen enzym *EcoRI*, na pravé straně enzym *BbsI*. Převzato z webových stránek Thermo Fisher Scientific, upraveno.

Každý DNA fragment tak získává na koncích pseudonáhodné 4 nukleotidové přesahy. Tyto přesahy mohou být v následujících krocích spojeny pomocí T4 ligázy. Pokud jsou tyto přesahy standardizovány - například všechny promotory mají stejné koncové sekvence a jsou tudíž libovolně zaměnitelné, hovoříme o konvenci (obrázek 3).



Obrázek 3: Ukázka konvence GoldenBraid 2.0. Přehled 4 nukleotidových přesahů jednotlivých částí a jejich možné spojení v GB kazetu. Převzato z Sarrion-Perdigones et al. (2013).

3.9.1 Metoda GoldenBraid

GoldenBraid (GB) metoda vychází ze systému GoldenGate. Obě tyto metody využívají k tvorbě genových konstruktů standardizované, vzájemně zaměnitelné části – ty se nazývají kazety/GB parts (Engler et al. 2008). Metoda GoldenBraid využívá binárního (párového) přístupu.

Princip Golden Gate využívají dvě konvence MoClo (Weber et al. 2011) a GoldenBraid (Sarrion-Perdigones et al. 2011). Obě tyto metody využívají sestavování více fragmentových

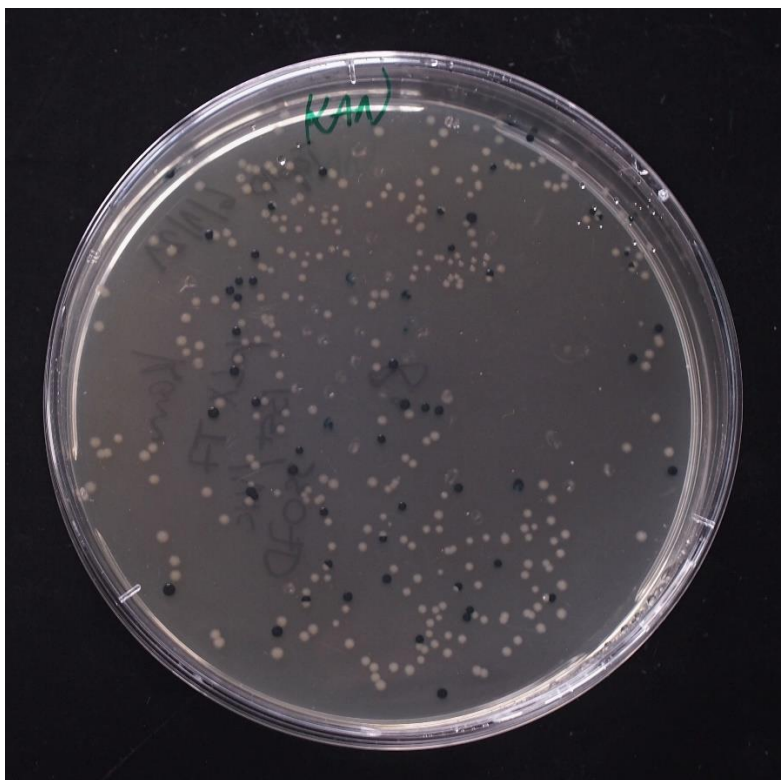
konstruktů systému Golden Gate a většina elementárních dílů je vzájemně zaměnitelných i mezi oběma systémy.

Z požadovaných DNA fragmentů jsou v průběhu domestikace (úprava sekvence dle požadované konvence) nejprve odstraněna vnitřní místa restrikčních enzymů *BsmBI* a *BsaI*. Na konce jsou přidány přesahy s restrikčními místy a určenými 4bp konvenčními přesahy. PCR fragmenty jsou poté v restrikčně-ligační reakci pomocí enzymu T4 ligázy a restriktaázy *BsmBI* vloženy do univerzálního vstupního plazmidu pUPD1 nebo pUPD2. pUPD plazmidy se zaklonovanými částmi „GB parts“ jsou následně spojovány do větších celků – jednotlivých transkripčních jednotek a vícegenových komplexů. Nejprve se z několika domestikovaných DNA fragmentů sestaví binární plazmid úrovně alfa s kanamycinovou rezistencí. Tím vzniká úplná transkripční jednotka, která obvykle obsahuje promotor, kódující oblast genu a terminátor (Sarrion-Perdigones et al. 2011). Dva alfa plazmidy se dále sestavují do plazmidu úrovně omega se spektinomycinovou rezistencí. Ze dvou omega plazmidů lze opět sestavit Alfa plazmid vyšší úrovně, a tak stále dokola, maximální počet složených transkripčních jednotek je omezen pouze stabilitou plazmidové DNA.

3.9.1.1 Klonovací struktura *LacZ*

Celá konvence obsahuje speciální zaklonovanou strukturu – gen *LacZ*, který kóduje enzym β -galaktosidázu. Tento gen umožňuje modrobílou selekci. Přidáním substrátu X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside), oddělíme plazmidy (buňky), které obsahují zaklonovaný gen, od buněk obsahujících prázdný plazmid – pokud se vkládaný gen správně umístí do vektoru, naruší gen *LacZ*, který přestane produkovat enzym β -galaktosidázu. Enzym β -galaktosidáza rozkládá X-gal za vzniku modré sloučeniny. Proto jsou kolonie, u kterých se gen správně nevloží, modře zbarvené (Padmanabhan et al. 2011; Juers et al. 2012).

Pro pozitivní transformanty je tedy použita dvojitá kontrola – antibiotiková rezistence a modrobílá selekce – viz Obrázek 4.



Obrázek 4: Ukázka modrobílé selekce na plotně s LB médiem a agarosou obsahujícím kanamycin a X-gal.

3.10 Reportérové geny

Reportérové (též signální nebo markerové) geny jsou takové geny, jejichž exprese (biochemický produkt) je snadné detekovat (vizuálním projevem) a kvantitavně stanovit. Tudíž mohou sloužit jako měřítko stupně exprese transgenů. Jejich projevem je nejčastěji barevná reakce nebo fluorescence (Bednář 2000). Oblíbené je použití zejména fluorescenčních reportérových genů ve fúzi se studovaným genem. Takové fúzní proteiny dobře prozrazují přesnou lokalizaci exprese transgenů (Ondřej & Drobník 2002).

3.10.1 β -glukuronidáza (GUS)

GUS reportérový systém je používán již od roku 1985. Tento systém funguje díky enzymu β -glukuronidáze. Tento enzym, pocházející z bakterie *Escherichia coli*, štěpí β -glykosidické vazby mezi kyselinou glukuronovou a necukernou složkou (aglykolem). Při inkubaci se specifickým bezbarvým/nefluorescenčním substrátem se přemění na barevný/fluorescenční produkt (Jefferson et al. 1986).

Aktivitu GUS enzymu lze detekovat fluorescenčně v homogenátu se substrátem 4-metylbelliferylglykuronidem (MUG), který fluoreskuje pouze tehdy, pokud je rozštěpen na β -glukuronid a 4-metylbelliferon. Další možností je použití barviva X-gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glukuronová kyselina), které po rozštěpení dává modrou krystalickou nerozpustnou sloučeninu a lze jej pozorovat přímo v pletivu (Ondřej & Drobník 2002).

Největší výhodou GUS metody je vysoká citlivost a její kvantifikace glukuronidázové aktivity. Při histochemickém barvení však bohužel dochází k usmrcení buněk (Thomasset et al. 1996).

3.10.2 Zelený fluorescenční protein (GFP)

Zeleně fluoreskující protein (GFP - Green fluorescent protein) byl poprvé izolován již v 60. letech z mořské medúzy *Aequorea victoria* japonským vědcem Osamu Shimomura (Shimomura 1979). Jako pomocný nástroj v molekulární biologii se ale mohl použít až po roce 1992 - Douglas Prasher navrhl a prezentoval klonování nukleotidové sekvence genu pro GFP (Prasher et al. 1992). O dva roky později se v laboratoři Martina Chalfie podařilo navodit expresi GFP v buňkách bakterie *E. coli* (Chalfie et al. 1994). V roce 1995 byl vytvořen mutant S65T s krystalickou strukturou díky Rogeru Y. Tsienovi a jeho skupině. Tato mutace dramaticky zvýšila fluorescenční úroveň a její stabilitu (Cubitt et al. 1995). V roce 2008 obdrželi Osamu Shimomura, Martin Chalfie a Roger Y. Tsien Nobelovu cenu za chemii za objev a výzkum tohoto proteinu.

GFP má schopnost přeměňovat modré nebo ultrafialové světlo na světlo zelené. Tento protein se skládá z 238 aminokyselin (26,9 kDa). GFP má unikátní sudovitý tvar (beta – barrel). Skládá se z jedenácti β -listů, tvořících stěnu a jedné α -helixové šroubovice probíhající jeho středem (Yang et al. 1996). Wild type GFP (wtGFP) má dvě absorpční maxima světla (395 nm a vedlejší 475 nm). Po excitaci světlem o vlnové délce 395 nm emituje světlo s maximem 509 nm, což je linie v zelené části viditelného spektra (pro lidské oko charakteristická zelená barva) (Heim & Tsien 1996; Tsien 1998).

Asi největší výhodou využití GFP a jeho derivátů je jeho možnost pozorování přímo v živém pletivu (pokud jde o rostliny) po excitaci vhodným zářením. Je to neinvazivní metoda, při které nedochází k poškození buněk. Není potřeba přidání žádného substrátu (jako je tomu u GUS) a jedná se tedy o autokatalyzovanou reakci. Nevýhodou této metody

může být často vysoká autofluorescence rostlinných pletiv a tím celkové snížení přesnosti dosažených dat (Haseloff & Amos 1995).

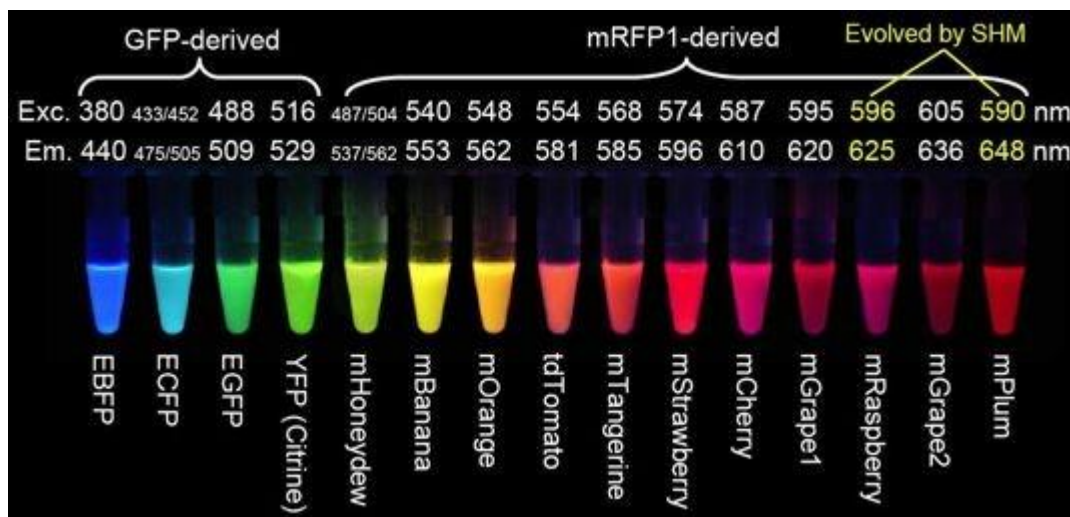
3.10.2.1 Žlutý fluorescenční protein (YFP)

Do praxe přešli mutanti se změněnou vlnovou délkou emitovaného světla. Vznika řada variant fluoreskujících v jiných barevných spektrech než je zelený kanál. Těmi jsou například modrý fluorescenční protein (BFP – Blue fluorescent protein) nebo žlutý fluorescenční protein (YFP – Yellow fluorescent protein). Rozdíl v barevném spektru je dán hlavně strukturou středového chromoforu. Žlutý fluorescenční protein má absorpční maximum 512 nm a emisní maximum 522 nm (Wachter et al. 1998).

Ukázka barevného spektra je zobrazena na Obrázku 5.

3.10.3 Červený fluorescenční protein (DsRed)

V roce 1999 byl publikován článek, který poprvé zmínil červený fluorescenční protein. Ten byl izolován z mořských korálů rodu *Discosoma*. Tento protein má absorpční maximum 558 nm a emisní maximum 583 nm. Tento protein je nyní označován jako DsRed (Matz et al. 1999).



Obrázek 5: Ukázka barevného spektra různých fluorescenčních proteinů.

<http://chemistry.berea.edu/~biochemistry/2016/cobalamin/>

4 Metodika

4.1 Složení použitých médií a pufřů

4.1.1 Kultivační a infiltrační média

LB médium – tekuté

1 % pepton, 0,5 % kvasničný extrakt, 1 % NaCl, rozpuštěno v dH₂O

LB médium – s agarosou

1 % pepton, 0,5 % kvasničný extrakt, 1 % NaCl, 1,6 % agar, rozpuštěno v dH₂O

MS médium - tekuté

0,44 % Murashige-Skoog s vitamíny, 2 % sacharóza, rozpuštěno v dH₂O

MS (Murashige-Skoog) médium – s agarosou

0,44 % Murashige-Skoog s vitamíny, 2 % sacharóza, 0,8 % agar, rozpuštěno v dH₂O

Infiltrační médium

10 mM MES, 10 mM MgCl₂, 100 μM acetosyringon, rozpuštěno v dH₂O

CIM

0,5 % kyselina 1-naftyloctová, 0,005 % 6-benzylaminopurin, 0,01 % karbenicilin, 0,0025 % BASTA, 0,8 % agar, rozpuštěno v MS médiu

SIM

0,2 % zeatin ribozid, 0,02 % kyselina 1-naftyloctová, 0,02 % kyselina gibberelová, 0,01 % karbenicilin, 0,0025 % BASTA, 0,8 % agar, rozpuštěno v MS médiu

RIM

0,01 % karbenicilin, rozpuštěno v MS médiu

4.1.2 Pufřy

PBS + Tween

137 mM NaCl, 7,8 mM Na₂HPO₄ · 12 H₂O, 1,5 mM KH₂PO₄, 2,7 mM KCl, 3,1 mM NaN₃, 0,05 % Tween 20, rozpuštěno v dH₂O, pH 7,4

RNA extrakční pufř

800 mM guanidinhydrochlorid, 50 mM Trisaminomethan, 0,5 % Triton X100, 1 % Tween-20, rozpuštěno v dH₂O

RNA promývací pufr

10 mM Trisaminomethan, 0, 1 % Tween-20, rozpuštěno v dH₂O

TBE

89 mM Tris-HCl, 89 mM H₃BO₃, 2, 5 mM EDTA, rozpuštěno v dH₂O, pH 8, 0

DNA extrakční pufr

100 mM Trisaminomethan, 50 mM EDTA, 500 mM NaCl, 10 mM Beta-merkaptoethanol, rozpuštěno v dH₂O

Fosfátový pufr pro purifikaci virových částic

0,5 M Na₂HPO₄, 0, 5 % kyselina askorbová, rozpuštěno v dH₂O, pH upraveno na 7, 2

4.2 GoldenBraid klonování

V celé práci byla použita klonovací metoda GoldenBraid, která byla navíc modifikována o pět nových alfa plazmidů (Dusek et al. 2020). Těmi jsou alfa 11, 12, 13, 14 a 13R. Tyto plazmidy jsou kompatibilní s původní konvencí GoldenBraid.

4.2.1 Domestikace DNA sekvencí metodou GoldenBraid do vstupních plazmidů pUPD

V průběhu domestikace musí být nejprve z cílových DNA sekvencí odstraněna místa pro štěpení *BsmBI* a *BsaI* enzymů. Na konce jsou přidány přesahy s restrikčními místy a patřičnými 4bp konvenčními přesahy. PCR fragmenty jsou poté v restrikčně-ligační reakci pomocí T4 ligázy a restriktaázy *BsmBI* vloženy do univerzálního vstupního plazmidu pUPD1 nebo pUPD2. Genové mapy obou plazmidů jsou zobrazeny na Obrázcích 6 a 7. Základní rozdíly mezi těmito plazmidy jsou shrnuty v Tabulce 3. Oba tyto plazmidy obsahují gen pro *LacZ*, který ve vhodných buňkách umožňuje modrobílou selekci (Engler et al. 2008; Sarrion-Perdigones et al. 2013). Obecné složení a podmínky reakce jsou uvedeny v Tabulkách 1 a 2.

Složka reakce	Jednotka	Objem
PCR fragment s 4 bp příslušnými přesahy	ng	100 ng od každého plazmidu, 80 ng PCR fragmentu
Pufr 10x T4 ligáza	μl	1
T4 ligáza	μl	1
<i>BsmBI</i>	μl	1
ddH ₂ O	μl	Doplněno do 10 μl

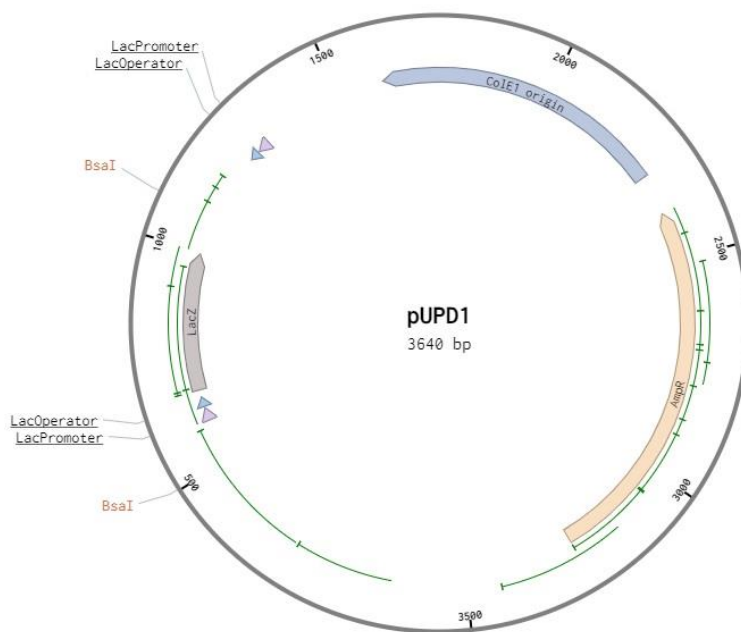
Tabulka 1: **Obecné složení pro restrikčně-ligační reakci.**

Fáze restrikčně-ligační reakce	Teplota (°C)	Čas (minuta)	Počet opakování
Počáteční fáze reakce	37	15	1
Restričně-ligační reakce	37	2	15-45
	16	5	
Konečná fáze reakce	37	15	1
Deaktivace enzymů	80	15	1

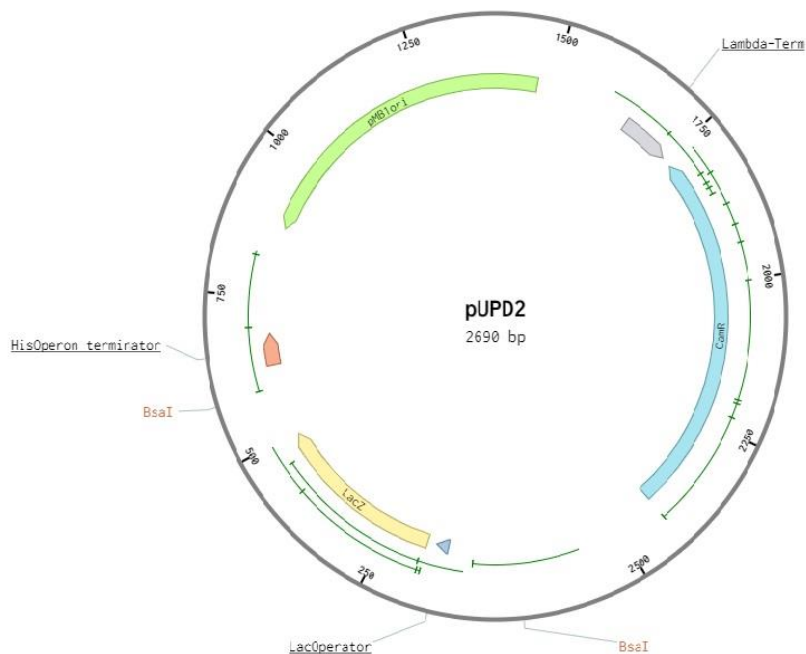
Tabulka 2: **Obecné podmínky restrikčně-ligační reakce.**

Název plazmidu	pUPD1	pUPD2
Rezistence	ampicilin	chloramphenicol
5' klonovací místo	CTCG	CTCG
3' klonovací místo	CGAG	TGAG
Velikost plazmidu	3 640 bp	2 690 bp

Tabulka 3: **Ukázka rozdílů mezi domestikačními plazmidy pUPD1 a pUPD2.**



Obrázek 6: Ukázka plazmidu pUPD1. Základní domestikační plazmid pro metodu GoldenBraid. Na obrázku jsou vyznačena restriční místa pro enzym *BsaI* – v pozici 502 a 1087. Vytvořeno v Benchlingu.



Obrázek 7: Ukázka plazmidu pUPD2. Základní domestikační plazmid pro metodu GoldenBraid. Na obrázku jsou vyznačena restriční místa pro enzym *BsaI* – v pozici 0 a 585. Vytvořeno v Benchlingu.

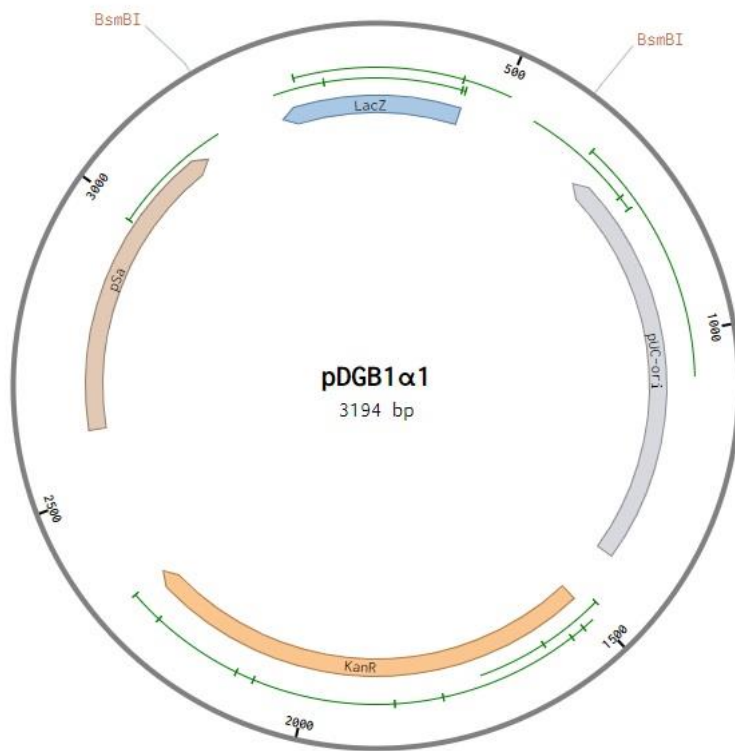
4.2.2 Domestikace DNA sekvencí metodou GoldenBraid do binárních plazmidů pDGB

V následujícím kroku byly pro sestavení větších celků použity vektory pDGB, a to původní destinační vektory pDGB1 α 1, 2 a pDDGB3 Ω 1, 2 – a nově vytvořené pDGB1 α 11, 12, 13, 14 a 13R.

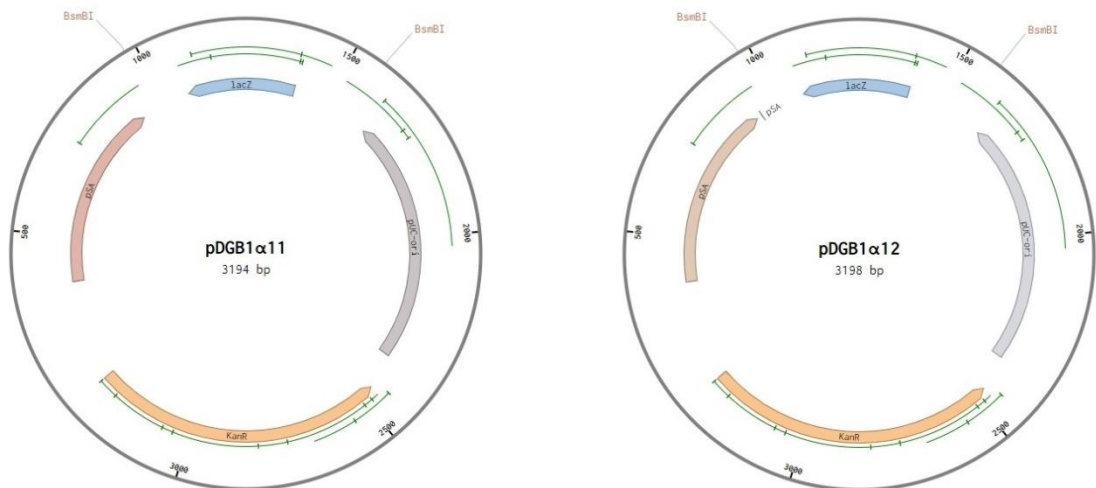
Plazmidy pDGB jsou binární vektory, obsahující speciální klonovací strukturu, tzv. GB kazetu. Tyto plazmidy také nesou gen *LacZ*, který byl popsán již dříve. GB kazeta, obsažená v plazmidu, je ohraničena rozpoznávacími místy restričních enzymů typu IIS (*BsmBI* a *BsaI*). Číslo a písmena řecké abecedy v názvu plazmidů slouží k rozpoznání cílového plazmidu dle přilehlých přesahů, vytvořených IIS enzymy (Sarrion-Perdigones et al. 2011).

Název plazmidu	pDGB1 α 1, 2, 2R 11, 12, 13, 14 a 13R	pDDGB3 Ω 1, 2
Rezistence	kanamycin	spektinomycin
Velikost plazmidu	3 195 bp	6 800 bp
Restriční enzym pro vložení	<i>BsaI</i>	<i>BsmBI</i>
Restriční enzym pro vyjmutí	<i>BsmBI</i>	<i>BsaI</i>

Tabulka 4: Srovnání destinačních vektorů pDGB1 α a pDDGB3 Ω .



Obrázek 8: Ukázka plazmidu pDGB1α1. Původní destinační vektor. Na obrázku jsou vyznačena místa pro restrikci enzymem *BsmBI*. Vytvořeno v Benchlingu.



Obrázek 9: Ukázka plazmidu pDGB1α11 a pDGB1α12 . Nově vytvořené destinační vektory rozšiřující původní konvenci. Na obrázku jsou vyznačena místa pro restrikci enzymem *BsmBI*. Vytvořeno v Benchlingu.

4.3 Transformace *Escherichia coli* pomocí teplotního šoku a jejich kultivace

Pro klonování byl použitý bakterie *Escherichia coli* kmenů DH5 α a TOP10. DNA pro domestikační reakci byla metodou teplotního šoku transformována do *E. coli* (Van Die et al. 1983). 5 μ l plazmidu bylo smícháno s 40 μ l kompetentních buněk. Směs byla ponechána 30 minut na ledu, zahřáta na 42 °C na 2 minuty a poté znovu dána na led na 2 minuty. Následně bylo přidáno 600 μ l tekutého LB média bez antibiotik a inkubováno za konstantního třepání 220 otáček/minutu - 30 minut při 37 °C (Shaking incubator NB-205, USA). Směs byla stočena při 12 500 g 2 minuty. Následně bylo odsáno 500 μ l supernatantu a peleta resuspendována ve zbylém médiu.

100 μ l transformační směsi bylo vyseto na misky s pevným Luria-Bertani (LB) médiem obsahujícím příslušné selekční antibiotikum (100 μ g/ml spektinomycinu pro alfa plazmidy, 50 μ g/ml kanamycinu pro omega plazmidy, 50 μ g/ml chloramfenikolu pro UPD plazmidy) a inkubováno při 37 °C přes noc (Heraeus B6 incubator, Německo). Misky s pevným LB médiem obsahovaly i substrát X-gal (5-bromo-4-chloroindol-3-yl β -D-galactopyranoside), který sloužil k modrobílé selekci. Narostlé bílé kolonie (pozitivní transformanty) byly pěstovány v 5 ml LB média s příslušnými antibiotiky za konstantního míchání (250 otáček / min) při 37 °C /24 hodin.

Všechny bakteriální kultury byly z důvodu větší úspěšnosti nasazovány v duplikátech.

4.3.1 Izolace plazmidové DNA

Z narostlé 5 ml bakteriální LB kultury mohla být izolována plazmidová DNA pomocí kitu GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific, USA), který využívá alkalickou lýzu (Sambrook & Russell 2006). Plazmidová DNA byla kontrolována restrikčním štěpením a sekvenována příslušnými primery (GATC Biotech, Německo). Takto vytvořená DNA se skladuje při - 20 °C.

4.4 Kontrolní restrikční štěpení plazmidové DNA

Z důvodů ověření správnosti transformace plazmidové DNA do bakteriálních buněk *E. coli* je využívána restrikční analýza. Pro každý typ plazmidové kostry byly vybírány rozdílné restrikční enzymy. Destinační vektory jsou navrženy tak, že kontrolní restrikční místo se konstantně nachází na plazmidové kostře mimo úsek určený pro vkládanou DNA sekvenci. Díky tomu je pokaždé úsek plazmidové kostry konstantní.

Kostra plazmidu	Restrikční enzymy	Velikost plazmidové kostry po štěpení
pUPD1	<i>EcoRI</i>	2 997 bp
pUPD2	<i>EcoRI + PstI</i>	2 029 bp
pDGB...α1, 11, 12, 13, 14	<i>EcoRI</i>	pDGB1 = 2 600 bp pDGB2 = 6 220 bp pDGB3 = 6 300 bp
pDGB...α2	<i>HindIII</i>	
pDGB...α2R	<i>EcoRV</i>	
pDGB...Ω1	<i>BamHI</i>	
pDGB...Ω2	<i>EcoRV</i>	

Tabulka 5: **Ukázka restrikčních enzymů** použitelných pro kontrolu úspěšnosti transformace DNA do buněk *E. coli* a izolaci plazmidové DNA. Ve všech reakcích byl použit pufr CutSmart (New England Biolabs, USA).

Kontrolní restrikční reakce probíhala při objemu 20 µl, při teplotě v 37 °C buď 3 hodiny, nebo přes noc. Její obecný předpis je v Tabulce 6.

Složka reakce	Objem
Restrikční enzym	0, 25 µl
Pufr CutSmart	2 µl
Plazmidová DNA	4 µl (cca 200 až 500 ng)
ddH2O	13, 25 µl

Tabulka 6: **Obecný předpis pro kontrolní restrikční reakci.** Objem celkové reakce je 20 µl.

4.5 Sekvence plazmidové DNA

Na základě restrikční reakce byly vybrány klony pro DNA sekvenaci. Sekvenaci zajišťuje firma Eurofins Genomics (Německo). Obecný předpis pro reakční směs je 5 µl sekvenačního primeru (koncentrace 5 µmol) a 5 µl plazmidové DNA (koncentrace 80–100 ng/µl). Získané údaje byly vyhodnoceny pomocí programu Vector NTI Advance 11.

Ve většině případů jsme pro sekvenaci použili obecné primery navržené dle sekvenační kostry destinačního vektoru. V případě, že byl vložený inzert příliš veliký, byly použity ještě genově specifické primery (viz Tabulka 7).

Název primeru	Nukleotidová sekvence	Délka primeru (bp)
Insert zaklonovaný do pUPD2 plazmidu		
pUPD2-F2	CCCGATCAACTCGAGTGCCA	20
pUPD2-R2	GAGGAAGCCTGCATAACG	18
Insert zaklonovaný do alpha plazmidu		
GB-alfa-F2	GGGCTTCTGGATTTCCGATC	20
GB-alfa-R2	TTTTGCTCACATGAGATCTC	20
Insert zaklonovaný do omega plazmidu		
Omega-Seq-F	GCCGTTCTTCCGAATAGCATCG	22
Omega-Seq-R	TACAAATGGACGAACGGATAAA	22
Inzert zaklonovaný vedle MAR sekvence		
P1-MAR-3	ATTTGGGTAAAATGTGAGAG	20
P1-MAR-5	AAGAGAGTGC GGAAATTATA	20
RB7-MAR-3	AAAGAATGGCAGTTTTTCCTT	20
RB7-MAR-5	GGTTCGAATTTGTTTTACTC	20
Inzert zaklonovaný vedle DsRed sekvence		
DsRed-seq-3	AACCGAGGGACGCCACCA	18
DsRed-seq-5	GTTCTTCCATGCGAACCTT	20
Inzert zaklonovaný vedle GFP sekvence		
GFP-seq-3	CATGGTCCTGCTGGAGTTCGT	21
GFP-seq-5	AGCTCGACCAGGATGGGCA	19

Tabulka 7: Přehled vybraných sekvenčních primerů uzpůsobených pro metodu GoldenBraid.

4.6 Pěstování rostlin

Teplota v růstové místnosti byla během experimentu nastavena na 24 °C. V místnosti bylo umělé osvětlení a byla udržována denní šestnáctihodinová světelná perioda. Rostliny byly pěstovány pod zářivkami 36 W / 840 G13 MASTER TL-D (Philips, Nizozemsko) a specifickým LED osvětlením - 8BEN-120cm-15W-GL-230V-T-G13 (FrontierTechnologies, Česká republika). Tyto zářivky byly nainstalovány v poměru 1:1 a intenzita světla se pohybovala od 90 do 140 $\mu\text{mol}\cdot\text{s}$ (Janda et al. 2015). Díky těmto podmínkám mohly být rostliny pěstovány po celý rok.

4.6.1 Tabáky

Dvou až třítydenní sazenice *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana rustica*, *Nicotiana glutinosa* a *Nicotiana tabacum* byly jednotlivě rozsazovány do směsi zahradního substrátu s perlitem v poměru 3 : 1. První 2 dny po přesazení byly přiklopeny minipařeništěm. Po dalších 2 – 3 týdnech byly rostliny připravené na inokulaci.

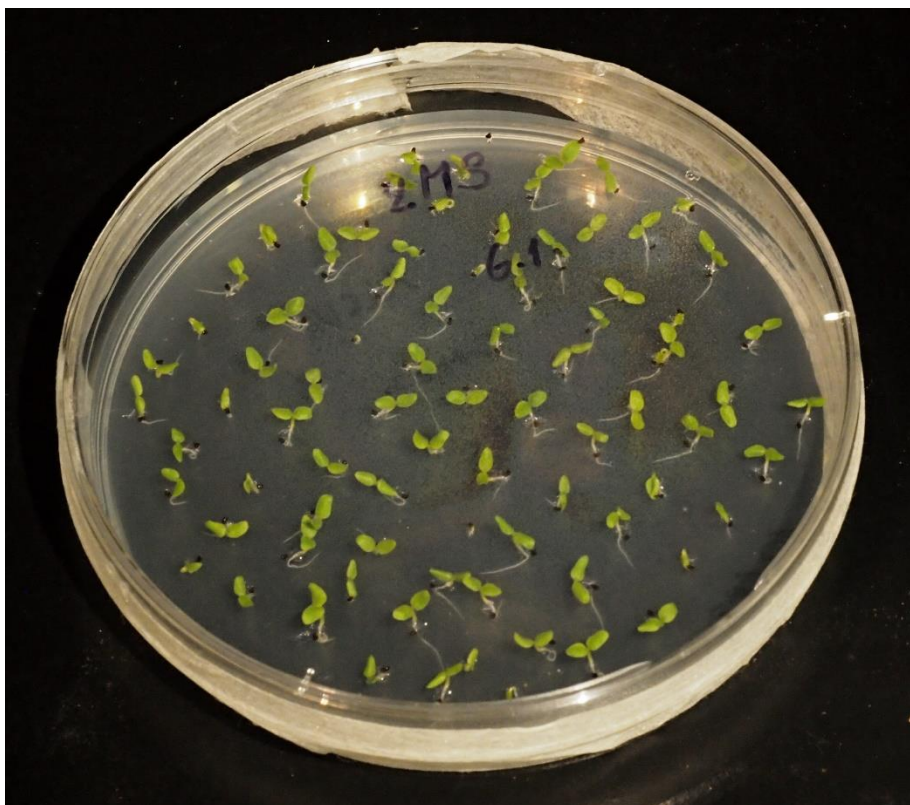
4.6.2 *Arabidopsis thaliana*

Semena rostlin byla nejprve sterilizována. Jednotlivé alikvoty (max. 20 mg/zkumavka) byly promyty 1 ml desinfekčního roztoku (15 ml SAVO, 35 ml ddH₂O, 0,01 ml Tween20). Poté byly třikrát promyty ddH₂O a ponechány ve tmě, ve 4 °C po dobu dvou dní. Tím došlo ke stratifikaci semen a zvýšení jejich klíčivosti. Semena byla hustě vysazena do sadbovací tablety Jiffy (Jiffy International AS, Norsko) a po 7 – 10 dnech přepikýrována do jednotlivých květníků. Po dalších 2 – 3 týdnech byly rostliny dostatečně odrostlé.

4.6.3 Pěstování rostlin *in vitro*

Semena rostlin *N. benthamiana* musela být nejprve sterilizována proti výskytu mikroorganismů. Nejdříve je alikvot ponořen do 30% SAVA na 5 minut. Semena jsou poté dvakrát omyta v destilované vodě a nechána oschnout. Poté jsou rozmístěna na Petriho misku a vložena společně s 0, 5 l vody v kádince (zabraňuje poškození) do mikrovlnné trouby. Sterilizuje se dvěma cykly po 4 minutách. Mezi cykly se vymění voda za novou a semena se nechají vychladnout.

Sterilní semena jsou rozmístěna na Petriho misku obsahující MS medium s agarózou (viz Obrázek 10). Po vzejití rostlin a dostatečném odrostu (cca 14 dní), byly jednotlivé rostliny přeneseny do sterilních růstových nádob - magentTM (Merck, Německo), které obsahují MS médium. MagentyTM (Merck, Německo) byly přeneseny do růstové místnosti s 24 °C a šestnáctihodinovou denní světelnou periodou. Zde rostly další 2 – 3 týdny.



Obrázek 10: Výsev *in vitro* rostlin *N. benthamiana*. Petriho miska obsahuje MS medium s agarózou bez antibiotik.

4.7 Transformace *Agrobacterium tumefaciens* pomocí teplotního šoku a jeho kultivace

Buňky *A. tumefaciens* byly metodou teplotního šoku (freeze-thaw shock method) transformovány příslušným binárním vektorem (An 1987). Pro klonování byl použitý bakterie kmenů GV3101 a EHA105. 100 ng plazmidu (přibližně 2 μ l) bylo smícháno s 40 μ l kompetentních buněk. Směs byla ponořena do tekutého dusíku na 5 minut, poté vložena do termobloku zahřátého na 37 °C, do té doby, dokud směs nerozmrzla. Tento krok se zopakoval a po následném roztátí se směs vložila na 5 minut do ledu. Ke směsi bylo přidáno 500 μ l tekutého LB média bez antibiotik a inkubováno za konstantního třepání 220 otáček/minutu – 1 hodinu při 28 °C (Shaking incubator NB-205, USA). Směs byla stočena 12 500 g / 2 minuty. Následně bylo odsáno 400 μ l supernatantu a peleta resuspendována ve zbylém médiu.

100 μ l transformační směsi bylo vyseto na misky s pevným LB médiem obsahujícím příslušné selekční antibiotikum (100 μ g/ml spektinomycinu, 50 μ g/ml kanamycinu, 50 μ g/ml rifampicinu) a inkubováno při 26 °C přes noc (Heraeus B6 incubator, Německo). Narostlé kolonie byly použity pro následné pěstování.

4.8 Agroinfiltrace

Agrobakterie byly pěstovány v 5 ml LB média s příslušnými antibiotiky (100 µg/ml spektinomycinu, 50 µg/ml kanamycinu, 50 µg/ml rifampicinu) za konstantního třepání (250 otáček/min) při 26 °C 24 hodin. Poté byly bakterie peletovány pomocí centrifugace - 10 minut při 3700 g (Heraeus Biofuge Pico, Německo) poté resuspendovány v infiltračním pufu. Optická densita (OD 600) byla měřena přímo v čirých polystyrénových kultivačních zkumavkách (Gama, Česká republika) pomocí denzitometru DEN-1 (Biosan, Lotyšsko). Použitá bakteriální koncentrace byla OD = 1. Výsledná bakteriální suspenze byla vpravena do spodní strany listu pomocí injekční stříkačky bez jehly (Huang & Mason 2004). Tlak z injekční stříkačky umožňuje průnik bakterií do rostlinného pletiva. Pro větší efektivitu byly rostliny před infiltrací oroseny vodou, aby došlo k otevření průduchů na spodní straně listů.

4.9 Měření a zobrazování fluorescence

Jak bylo již dříve řečeno, GFP (wtGFP) má dvě absorpční maxima (395 nm a vedlejší 475 nm) a emisní maximum 509 nm. DsRed má absorpční maximum 558 nm a emisní maximum 583 nm.

4.9.1 Fotografie

Celé rostliny byly zobrazeny pomocí digitálního fotoaparátu Olympus E-PL3 s objektivem Zeiss Pancolar (50 / 1,8). GFP byl vizualizován pomocí samostatně sestavených UV LED svítidel (přibližně 400 nm) a LEE 124 DarkGreen filtru. Podobně byla vizualizována fluorescence DsRed pomocí zelených LED svítidel (přibližně 530 nm) a filtru LEE 019 (oba filtry Thomann, Německo).

4.9.2 Fluorescenční mikroskopie

Pro fluorescenční mikroskopii byl použit přístroj Leica CTR 5000 s filtrovými kombinacemi GFP, FluoA, N2.1 a I3 (Leica Microsystems, Německo). Díky těmto filtrům byla možná vizualizace markerových proteinů GFP, YFP a DsRed na buněčné úrovni.

4.9.3 Měření fluorescence

Fluorescence listových extraktů obsahujících exprimované proteiny GFP a DsRed byla měřena na přístroji Tecan-F200 (Tecan, Rakousko) pomocí sady filtrů GFP (485/20 nm excitace; 535/25 nm emise) a sady filtrů DsRed (535/25 nm excitace; 586/20 nm emise).

Pro každý vzorek byly odebrány 5 dní po inokulaci (Day post inoculation – DPI, pokud není uvedeno jinak) tři listové disky vykrojené z naočkovaných částí listů (35 mg), a byly zmrazeny v tekutém dusíku. Takto zmražené pletivo bylo homogenizováno ve zkumavkách s 1 g 1,3 mm kuliček z oxidu křemičitého ve 300 μ l PBS + T pomocí FastPrep-24 (MP Biomedicals, USA). Vzorky byly poté normalizovány na celkovou koncentraci proteinu 1 mg/ml s použitím soupravy Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, USA).

4.10 Sekundární inokulace rostlin virovými vektory

Jako zdroj virových částic slouží infiltrované listy s příslušnými bakteriemi. Tři listové disky vybrané z naočkovaných částí listů (35 mg), byly odebrány pro každý vzorek, 5 dní po inokulaci a byly zmrazeny v tekutém dusíku. Takto zmražené pletivo bylo homogenizováno ve zkumavkách s 1 g 1,3 mm kuliček z oxidu křemičitého ve 300 μ l PBS + T pomocí FastPrep-24 (MP Biomedicals, USA). Poté byly zbytky rostlinných pletiv sedimentovány pomocí centrifugace - 5 minut při 13 000 g. Supernatant byl použit jako následné virové inokulum.

Listy *N. benthamiana* byly lehce poprášeny karborundem, na každý list bylo přidáno 20 μ l příslušného inokula, a to bylo jemně rozetřeno po listu prstem v jednorázové nitrilové rukavici.

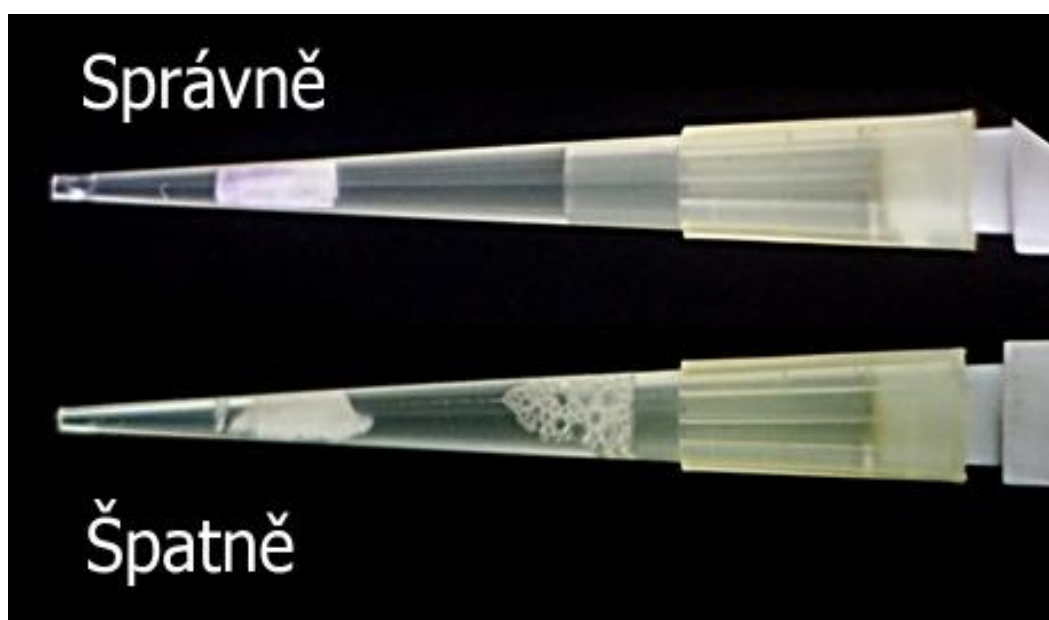
4.11 Extrakce rostlinné DNA

Postup je založen podle Dellaporta et al. (1983) s několika úpravami. Tři listové disky (35 mg) byly zmrazeny v tekutém dusíku. Takto zmražené pletivo bylo homogenizováno ve zkumavkách s 1 g 1,3 mm kuliček z oxidu křemičitého. Poté bylo přidáno 400 μ l DNA extrakčního pufru a znovu homogenizováno. Ze směsi bylo odebráno 350 μ l do nové mikrozukavky a smícháno s 10 % SDS a zahřáto na 65 °C/10 minut. Následně se přidá 125 μ l 5 M octanu draselného a vzorek se dá na 15 minut do ledu.

Vzorek se stočí 12 500 g/10 minut, supernatant se odebere do nové mikrozkušavky a přidá se 250 μ l isopropanolu. Mikrozkušavka se umístí do mrazáku (- 20 °C) na 15 minut, stočí se 12 500 g/10 minut a odebere se supernatant. Usazená peleta se promyje v 250 μ l 70% ethanolu, stočí se 12 500 g/5 minut. Veškerý ethanol se odebere a peleta se nechá přibližně 10 minut vyschnout (nutno kontrolovat, aby nedošlo k přeschnutí). Nakonec se přidá 100 μ l ddH₂O a vzorek se inkubuje 10 min/65 °C. Tím dojde k rozpuštění DNA.

4.12 Extrakce virové RNA pomocí filtračního papíru

Extrakce virové RNA byla založena na článku Zou et al. 2017 s jistými modifikacemi. Namísto papírových disků nebo proužků byly používány malé papírové obdélníky (filtrační papír) 6x4 mm srolované ve 200 μ l špičkách. Důležité je správné vložení filtračního papíru do špičky, aby tekutina při odběru vzorku nevytvářela bubliny (viz Obrázek 11).



Obrázek 11: Ukázka špiček s vloženým filtračním papírem pro odběr DNA/RNA. V horní části je filtrační papír správně srolovan a vzorek nevytváří při odběru bubliny. Ve spodní části nebyl filtrační papír správně srolovan a při odběru dochází ke tvorbě bublin.

Tři listové disky odebrané z naočkovaných částí listů (35 mg), byly odebrány pro každý vzorek 5 DPI a byly zmrazeny v tekutém dusíku. Takto zmražené pletivo bylo homogenizováno ve zkumavkách s 1 g 1,3 mm kuliček z oxidu křemičitého ve 250 μ l RNA extrakčního pufru pomocí FastPrep-24 (MP Biomedicals, USA).

Připravený extrakt byl přes filtrační papír třikrát nasát pipetou do špičky. Tím došlo k přichycení VLP k filtračnímu papíru. Následně byl filtrační papír třikrát propláchnut RNA

promývacím pufrům od nečistot. Nakonec je přes filtrační papír třikrát nasáta reakční směs pro RT-PCR (Moravec, nepublikováno).

4.13 Reverzní transkripce

Použité VLP jsou odvozené od TMV, což je virus obsahující +ssRNA. Reverzní transkripce je reakce, během které dochází k přepisu RNA do molekuly cDNA. Katalyzátorem reakce je reverzní transkriptáza (použita M-MLV Reverzní transkriptasa RNase H minus (Promega, USA)). Produktem reverzní transkripce je hybrid RNA/DNA, který je následně možný amplifikovat pomocí PCR reakce.

V prvním kroku byla reakční směs 3krát nasáta přes filtrační papír. Tím došlo k uvolnění VLP do reakční směsi. Směs obsahovala:

- 10 μ l M-MLV PUFR 5x (Promega, USA)
- 2 μ l dNTP (10 mM) (Thermo Scientific, USA)
- 2 μ l Primer F
- 2 μ l Primer R
- 31,5 μ l ddH₂O

Poté byla směs na 10 minut zahřáta na 70 °C. Díky tomu došlo k porušení virových částic a uvolnění RNA do směsi (Thomson & Dietzgen 1995). V dalším kroku bylo po vychladnutí do reakce přidáno:

- 0,5 μ l RNAsin/ RiboLock RNase Inhibitor (40 U/ μ l) (Thermo Scientific, USA)
- 2 μ l M-MLV reverzní transkriptáza RNase H minus (Promega, USA).

Finální objem reakce byl 50 μ l. Vzorky byly inkubovány 60 minut při 42 °C a poté ještě 5 minut při 70 °C z důvodu inaktivace enzymu reverzní transkriptázy. Vzniklé produkty byly použity v následné PCR.

4.14 PCR (Polymerázová řetězová reakce)

Obecný předpis pro PCR reakci používanou pro amplifikaci DNA fragmentů je uveden v Tabulce 8. Pokud není uvedeno jinak, tak teploty a časy použité v reakci jsou v Tabulce 9.

Složka reakce	Objem	Finální koncentrace
Pufr 10x	2, 5 μ l	
dNTP	0, 75 μ l	300 μ M
Primer F	0, 75 μ l	300 μ M
Primer R	0, 75 μ l	300 μ M
Taq polymeráza	0, 25 μ l	1 U na reakci
Templát	1 μ l	
ddH ₂ O	19 μ l	

Tabulka 8: **Obecné složení směsi pro Polymerázovou řetězovou reakci.**

Fáze PCR	Teplota (°C)	Čas (sekundy)	Počet opakování
Počáteční denaturace	94	180	1
Denaturace	94	30	30
Annealing	55	30	
Elongace	72	35	
Deaktivace enzymů	72	600	1

Tabulka 9: **Obecné podmínky pro Polymerázovou řetězovou reakci.**

4.15 Horizontální agarózová gelová elektroforéza

Pro potřeby rozdělení jednotlivých DNA fragmentů podle jejich velikosti byl v této práci použit 1% agarózový gel. Elektroforéza využívá rozdílnou pohyblivost jednotlivých fragmentů danou právě jejich různou velikostí. Nukleová kyselina nese díky záporně nabitým fosfátům záporný náboj, a proto se v elektrickém poli pohybuje od záporného pólu (katody) ke kladnému (anodě).

K 100 ml TBE pufru byl přidán 1 gram agarózy (Cambrex, USA) a tato směs byla po dobu cca 5 minut zahřívána v mikrovlnné troubě, dokud nedošlo k úplnému rozpuštění agarózy. Poté bylo do roztoku přidáno vazebné barvivo Midori Green Advance (Elisabeth Pharmacon, Česká republika) o objemu 4 μ l a připravený roztok byl nalit do aparatury pro přípravu gelů (BIO-RAD, USA). Po zatuhnutí byl gel přenesen do elektroforetické vany (BIO-RAD, USA). Do jamek byly nanесeny vzorky z PCR reakce o objemu 10 μ l na jamku. Jako molekulový marker byl použit GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific, USA).

Celá reakce probíhala v 1xTBE elektroforetickém pufru, při konstantním napětí 100 V 40 minut. Gel byl zobrazen a vyfotografován v přístroji ChemiDoc™ MP Imaging System (BIO-RAD, USA).

4.16 Purifikace VLP

Inokulované listy byly zváženy (přibližně 40 g) a zmrazeny pomocí tekutého dusíku v třecí misce, kde byly následně homogenizovány. Po důkladném nadrcení rostlinného materiálu byl přidán 1,3 násobek fosfátového pufru. Výsledná směs byla přefiltrována přes plátno do 50 ml zkumavek a centrifugována 30 minut/ 4 100 g/4 °C (Heraeus Multifuge 3S-R, Německo). Supernatant byl odebrán do nové nádoby a byl k němu přidán NaCl (tak, aby výsledná koncentrace byla 3 %) a PEG 6000 (tak, aby výsledná koncentrace byla 5 %). Směs byla míchána přes noc při 4 °C. Vzorky byly přeneseny do 50 ml zkumavek a centrifugovány 20 minut/ 4 800 g/4 °C (Heraeus Multifuge 3S-R, Německo). Výsledný supernatant byl odstraněn a peleta byla resuspendována v ¼ původního objemu 50 x zředěným fosfátovým pufrům. Vzorky byly opět přeneseny do 50 ml zkumavek a centrifugovány 15 minut/ 4 100 g/4 °C (Heraeus Multifuge 3S-R, Německo). Supernatant byl přenesen do ultracentrifugačních kyvet v objemu 20 ml na sacharosový polštář (20% sacharóza v 50x zředěném fosfátovém pufru) a kyvety byly následně co nejpřesněji vyváženy. Takto vyvážené kyvety byly odstředěny na ultracentrifuze (Beckman L7-55, rotor Ti50.2, USA) – 3 hodiny/ 27 000 g/ 4 °C. Po ultracentrifugaci byl z kyvety odstraněn supernatant a vzniklá gelová peleta byla opatrně omyta od zbylých zelených nečistot 50x zředěným fosfátovým pufrům. V tomtéž pufru (1 ml) byla rozpuštěna.

4.17 Transmisní elektronová mikroskopie

Další metodou pro detekci TMV VLP je elektronová mikroskopie. Niklová elektronmikroskopická síťka, která má velikost ok (mesh) 300, potažená formvarovou vrstvou (Edge Scientific, Kanada) byla položena matnou stranou na kapku 10 µl VLP purifikátu a inkubována po dobu 15 minut v pokojové teplotě. Následně byla 2x promyta na kapce vody (20 µl a 10 µl). Síťky byly poté negativně kontrastovány na 20 µl kapce 2% molybdenanu amonného s 1% trehalózou (pH 6,4) po dobu 3 min při pokojové teplotě. Poté se nechaly přes noc vyschnout.

Snímky byly pořízeny na transmisním elektronovém mikroskopu Morgagni 268D (FEI, Česká republika) se zabudovanou digitální kamerou.

4.18 Stabilní transformace rostlin

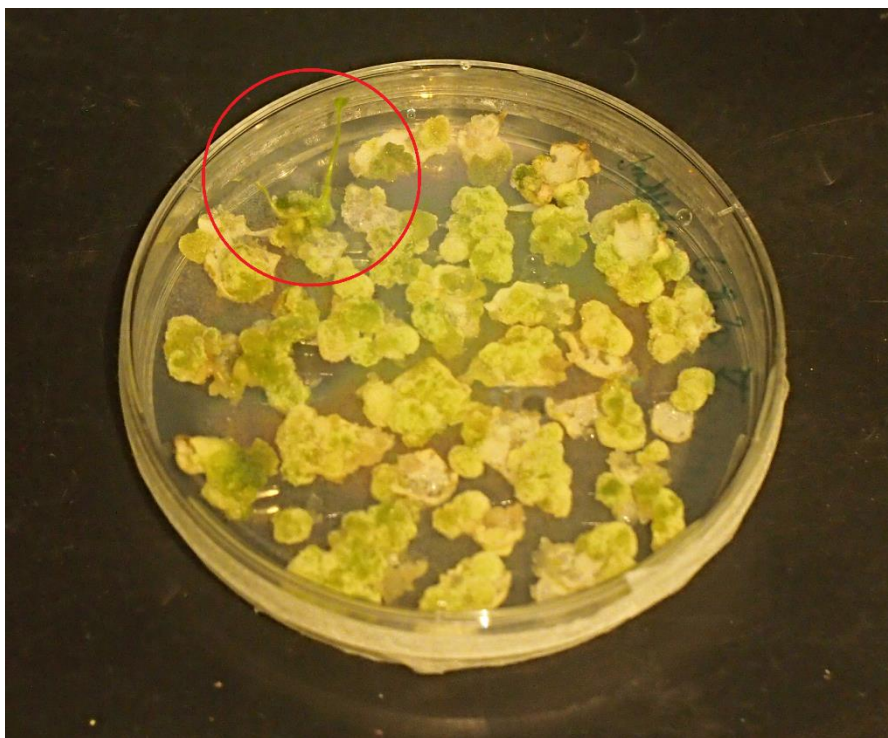
4.18.1 Transformace rostlin *N. benthamiana*

Tento protokol je vypracován podle předlohy (Clemente 2006), s jistými úpravami, které jsou uvedeny níže.

Bakterie *A. tumefaciens* byly pěstovány v 5 ml LB média s příslušnými antibiotiky (100 µg/ml spektinomycinu, 50 µg/ml kanamycinu, 50 µg/ml rifampicinu) za konstantního třepání (250 otáček/min) při 26 °C 24 hodin. Poté bylo odebráno 400 µl narostlé bakteriální suspenze a sedimentováno při 10 000 g 2 minuty. Peleta byla dvakrát promyta 2 ml MS média. Nakonec byla rozpuštěna v 700 µl téhož média a ponechána v ledu. Na transformaci byly použity listy z rostlin *N. benthamiana* pěstovaných *in vitro* (měsíc – měsíc a půl starých). Listy byly rozřezány na čtverečky o velikosti 0,5 x 0,5 cm. Rozřezané listy byly kladeny do Petriho misky s 10 ml MS média, pokaždé spodní stranou listu nahoru. Po pokrytí hladiny listovými čtverečky bylo přidáno 25 µl příslušné bakteriální suspenze a opatrně promícháno pipetou. Petriho misky byly poté uloženy na dva dny do tmy při 26 °C.

Po dvou dnech bylo médium odsáto, listové disky osušeny na sterilním filtračním papíru a přeneseny na Petriho misky s obsahující pokrácené CIM (callus-inducing medium). Misky byly oblepeny prodyšnou páskou a přeneseny do osvětlené růstové komory s šestnácti hodinovým denním režimem a 24 °C. Po dalším týdnu byly listové disky přeneseny na Petriho misky, které obsahovaly SIM (shoot-inducing medium). Misky byly opět oblepeny prodyšnou páskou a přeneseny zpět do růstové komory. Tento postup je nutné opakovat každý týden s čerstvým SIM, do té doby, než se objeví první rašící stonky na kalusech (viz Obrázek 12).

Stonky, které jsou minimálně jeden centimetr dlouhé, jsou odříznuty a přeneseny do magentyTM (Merck, Německo) s médiem RIM (root-inducing medium). V růstové komoře se pak magentyTM (Merck, Německo) nechají až do chvíle, než se vytvoří dostatečný kořenový systém. Pak lze rostliny přesadit do sadbovací tablety Jiffy (Jiffy Products International AS, Norsko). Do CIM a SIM se přidá příslušná selekční chemikálie.



Obrázek 12: **Ukázka kalusů pěstovaných v *in vitro* podmínkách.** Kalusy jsou pěstované v Petriho misce na SIM. Fotka byla pořízena po pátém pasážování na SIM. Červeným kruhem je označený rašící výhon.

4.18.2 Transformace rostlin *A. thaliana*

Protokol byl dělán dle (Logemann et al. 2006) s drobnými úpravami. Optimální rostliny mají velké množství shluků nerozvitých květů. Toho lze docílit zastřížením výhonů rostliny v rané fázi (5. – 6. týden po zastřížení je nejlepší čas na inokulaci).

Bakterie *A. tumefaciens* byly pěstovány v 30 ml LB média s příslušnými antibiotiky (100 µg/ml spektinomycinu, 50 µg/ml kanamycinu, 50 µg/ml rifampicinu) za konstantního třepání (250 otáček/min) při 26 °C 24 hodin. Takto narostlá bakteriální suspenze byla přidána do 400 ml 5% sacharóзовého roztoku s 0,03 % Silwetu L77. Celá rostlina se ponořila na 10 sekund do této směsi. Rostliny jsou následně vloženy na 16 hodin do navlhčených minipařeníšť na zastíněné místo. Poté se vyndají a nechají se za normálních podmínek růst. Po jednom týdnu je nutné proces zopakovat.

Rostliny se nechají odrůst a dozrát. Semena se sklídí, vysuší, stratifikují a vysejí na zahradní substrát s perlitem. Pro selekci transformantů se zvolí příslušné antibiotikum nebo herbicid (viz Obrázek 13).



Obrázek 13: **Výběr transformantů rostlin *A. thaliana***. Na rostliny byl použit selektivní herbicid BASTA 14 dní po výsevu.

4.19 Aktivace indukibilních promotorů

V práci byly použity dva indukibilní promotory LexA a 5xM. Chemickým aktivátorem promotoru LexA je estradiol, promotoru 5xM methoxyfenozid, který se nachází, jako účinná látka, v insekticidu Integro (Dow AgroSciences, Velká Británie). Do 5 ml bakteriální suspenze rozpuštěné v infiltračním pufru bylo přidáno 0,5 μ l Integra/5 μ l estradiolu (30 mM) těsně před infiltrací.

5 Výsledky

5.1 Rozšíření konvence GoldenBraid o nové alfa plazmidy

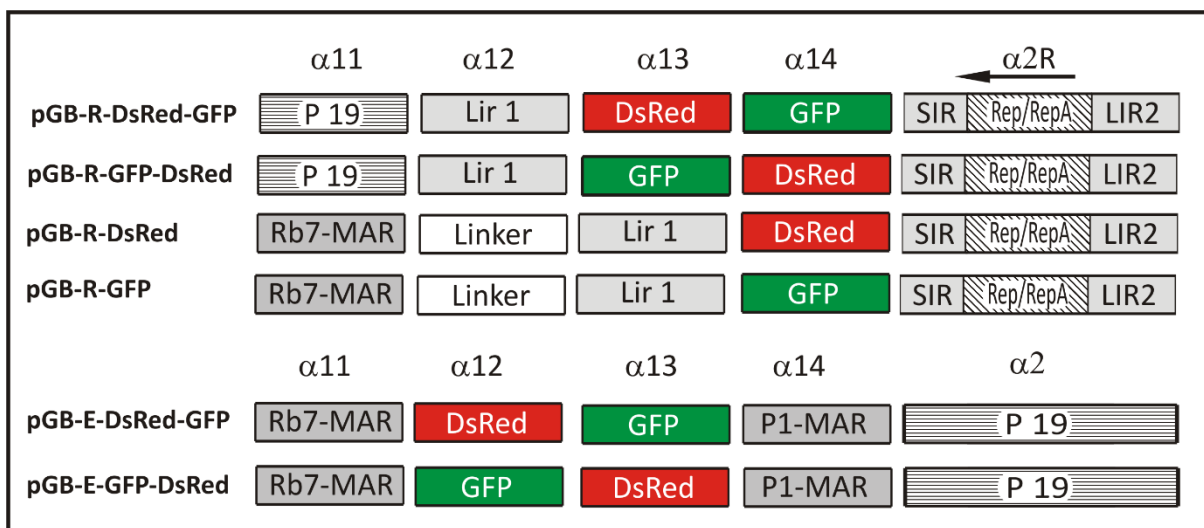
Pro rozšíření možností systému GoldenBraid byl stávající plazmid $\alpha 1$ nahrazen 4 novými plazmidy pojmenovanými $\alpha 11$, $\alpha 12$, $\alpha 13$ a $\alpha 14$. Plazmid $\alpha 13$ byl navíc navržen i v reverzní orientaci. Čtyřbázový přesah generovaný během reakce *BsmBI* na 5' konci u plazmidu $\alpha 1$ je totožný s přesahem $\alpha 11$. Podobně je přesah na 3' konci u plazmidu $\alpha 1$ totožný s přesahem $\alpha 14$. Nově navržené konce plazmidů jsou zobrazeny v Tabulce 10. Až na tyto nově navržené 4 bázové přesahy jsou vektory identické s rodičovským plazmidem pDGB1 $\alpha 1$. Proto jsou plazmidy $\alpha 2$ a všechny Ω plazmidy kompatibilní s nově navrženým systémem a následné reakce nejsou nijak omezeny.

Původní destinační vektory	5' klonovací místo	3' klonovací místo
$\alpha 1$	<u>GGAG</u>	<u>GTCA</u>
$\alpha 2$	GTCA	CGCT
Nově vytvořené destinační vektory	5' klonovací místo	3' klonovací místo
$\alpha 11$	<u>GGAG</u>	CCAT
$\alpha 12$	CCAT	GCTT
$\alpha 13$	GCTT	GGTA
$\alpha 14$	GGTA	<u>GTCA</u>
$\alpha 2$	GTCA	CGCT

Tabulka 10: **Přehled klonovacích míst po restrikci enzymem *BsmBI***. Podtržítka zobrazuje rozdělení plazmidu $\alpha 1$ do 4 nových plazmidů. Převzato z Dusek et al. 2020, upraveno.

5.2 Přizpůsobení BeYDV vektorů pro konvenci Golden Braid

Po domestikační reakci a jejím ověření sekvenací byl LIR1 zaklonován do vektorů alfa 11, 12 a 13. Genomová část LIR2-Rep/RepA-SIR byla vložena do vektoru pDB1 alfa 2R, který umožňuje sestavení této části v opačné orientaci (antisense orientation). Výsledný klon není zcela totožný se sekvencí wtBeYDV. Do genomu musely být zavedeny mutace pro odstranění míst *BsaI* a *BsmBI* a na hranicích jednotlivých kazet jsou 4-8 nt inzerce.

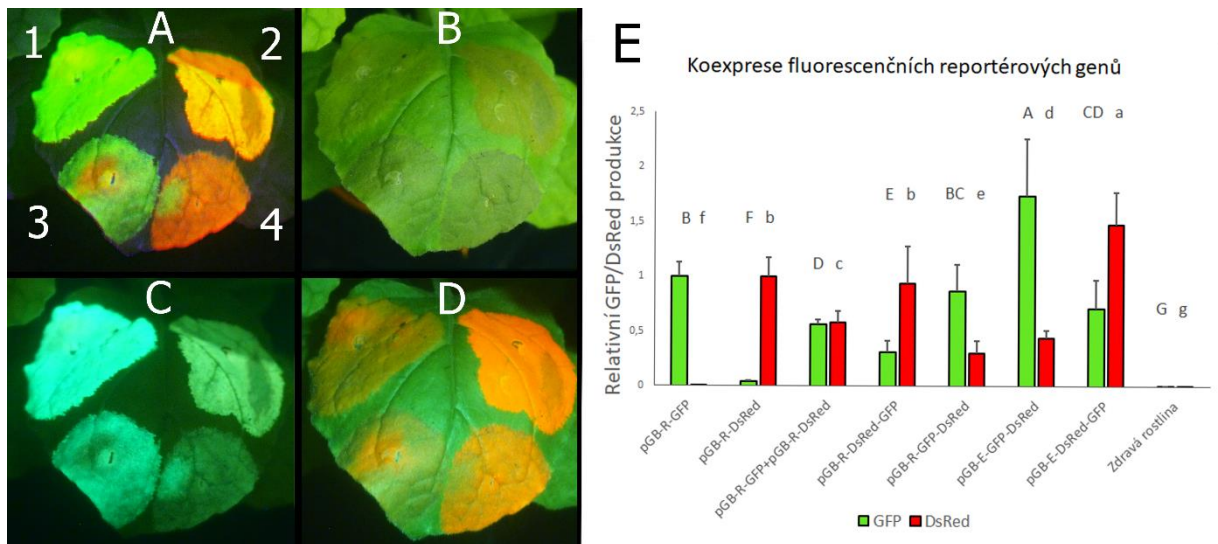


Obrázek 14: Schématické znázornění použitých konstruktů. pGB - plazmidy GoldenBraid; R- replikující se konstrukt; E – nereplikující se vektory odvozené od pEAQ; DsRed/GFP - fluorescenční reportérové geny pod promotorem 35S a Nos terminátorem s 5'/3' UTRs odvozenými od CPMV; MAR Rb7/P1 - matrix attachment regions; Linker - výplňový fragment, který je dlouhý 35bp; P 19 – potlačovatel silencingu odvozený od viru keříčkovitosti rajčete.

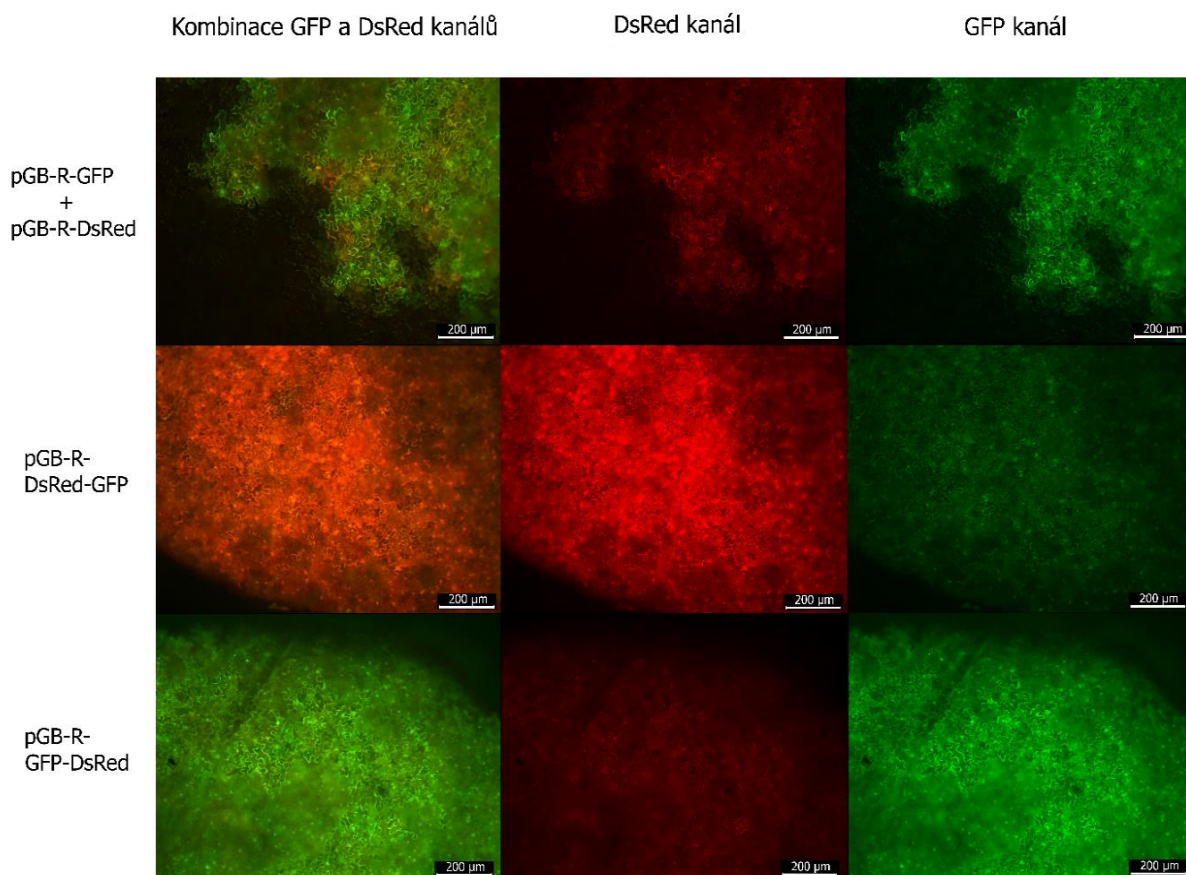
5.3 Transientní exprese pomocí replikujících se a nereplikujících se vektorů

Současná exprese dvou nebo více genů je důležitá pro produkci multimerních proteinů, jako jsou například protilátky (těžký a lehký řetězec). Proto jsme hledali optimální strategii pro současnou expresi dvou fluorescenčních reportérových genů. Vektory pEAQ jsou založené na vysoce translatovatelných 5'/3' UTR (Untranslated region) pocházejících z viru mozaiky vigny (cowpea mosaic virus, CPMV). Vektory pEAQ byly úspěšně použity k expresi protilátek v rostlinách (Sainsbury & Lomonosoff 2008; Sainsbury et al. 2009), stejně tak byly úspěšně použity i geminivirové replikující se vektory (Hefferon & Fan 2004; Regnard et al. 2010).

Výsledkem byla silnější exprese první transkripční jednotky (asi 2-3krát) v replikujících se i nereplikujících se konstruktech. Pro prostou celkovou koexpresi dvou proteinů se zdá být nejlepší kombinace dvou nezávislých nereplikujících se plazmidů, tedy směs dvou kmenů agrobakterií, smíchaných těsně před infiltrací (Obrázek 15). Zároveň je z Obrázku 16 patrné, že toto řešení vede k nevyrovnané expresi GFP a DsRed v jednotlivých buňkách, což je pro expresi vícejednotkových proteinů nevýhodné.



Obrázek 15: **Koexprese dvou fluorescenčních reportérových genů.** Listy *N. benthamiana* byly infiltrovány replikujícími a nereplikujícími se konstrukty exprimujícími fluorescenční markery GFP a DsRed, které byly buď přítomny na jednom plazmidu v jednom kmenu agrobakterií EHA 105, nebo na dvou společně infiltrovaných plazmidech (2 kmenech agrobakterií). Relativní exprese fluorescenčních reportérů byla měřena 5 dní po infiltraci. Fluorescence získaná z reportérového nereplikujícího se vektoru byla stanovena jako 1,0 (pGB-R-GFP a pGB-R-DsRed). A - Složený obraz; B - Viditelné světlo; C - GFP kanál; D – DsRed kanál
 1 - pGB-E-GFP-DsRed; 2 - pGB-E-DsRed-GFP; 3 - pGB-R-GFP-DsRed; 4 - pGB-R-DsRed-GFP
 E - Grafické znázornění koexprese GFP a DsRed. Data byla měřena na přístroji Tecan-F200 (Tecan, Rakousko). Jedná se o relativní hodnoty, takže byly normalizovány na jeden kazetový konstrukt pGB-R-GFP, respektive pGB-R-DsRed. Statisticky významné rozdíly při $p = 0,05$ jsou označeny různými písmeny. Převzato a upraveno z Dusek et al. 2020.



Obrázek 16: **Kombinovaný mikroskopický snímek ukazující fluorescenci replikujících se konstruktů 5 DPI.** Kombinované obrázky z červeného i zeleného kanálu jsou v levém sloupci, kanál DsRed uprostřed a kanál GFP vpravo. Horní řádek ukazuje signál ze dvou nezávislých agrobakterií (plazmidů), střední a dolní řádek jsou replikační konstrukty se 2 transkripčními jednotkami. (pGB-R-DsRed-GFP a pGB-R-GFP-DsRed). Převzato a upraveno z Dusek et al. 2020.

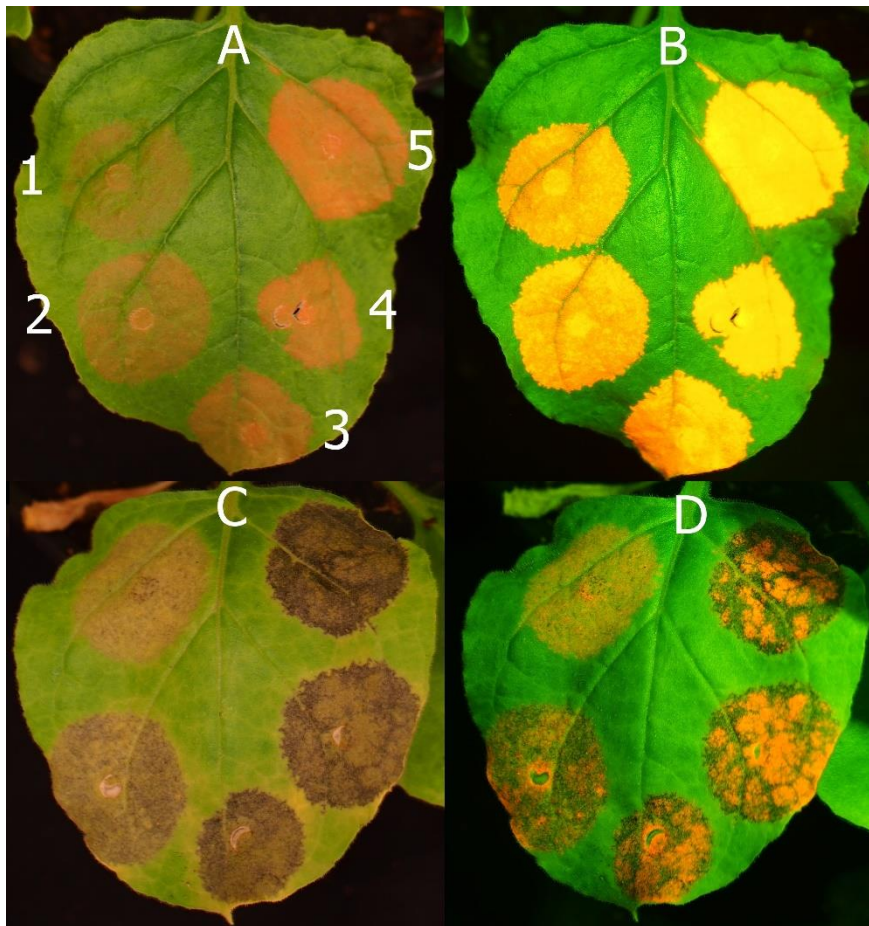
5.3.1 Nekrózy na listech *N. benthamiana*

Již dříve byly prokázány nekrózy vyvolané replikací BeYDV v listech *N. benthamiana*. Tyto příznaky mohou být zredukovány použitím různých kmenů agrobakterií (Diamos et al. 2016) nebo vložím MAR za expresní kazetu.

Proto jsme se pokusili vyzkoušet dva rozdílné kmeny *A. tumefaciens* - GV3103 a EHA105. Ani jeden z těchto kmenů neměl výrazný vliv na tvorbu nektróz. Pouze relativně mírný účinek byl pozorován při použití RB-7 MAR. Jiné MARY (TM2 a TM6 odvozené od tabáku a P1 odvozený od sóji) nevykazovaly žádný účinek.

Další možnost, která by mohla snížit tvorbu nektróz, je naředění suspenze *A. tumefaciens* použité pro inokulaci. Testovali jsme dvojnásobné ředící řady počínaje $OD_{600} = 0,25$ až $OD_{600} = 0,015$. Listy infiltrované nereplikujícím se vektorem nevykazovaly žádné známky nektrózy ani při nejvyšší koncentraci agrobakterií ($OD_{600} = 0,25$). Mohli jsme ale

pozorovat postupné snižování intenzity fluorescence odpovídající snižující se hustotě agrobakterií. Na druhé straně všechny použité koncentrace replikujících se konstruktů, s výjimkou těch nejvíce zředěných, vykazovaly nekrózy již 4. DPI (Obrázek 17).



Obrázek 17: Něktrózy na listech *N. benthamiana* – replikující se a nereplikující se vektory: **A** - Viditelné světlo, pGB-E-DsRed-GFP; **B** - kanál DsRed, pGB-E-DsRed-GFP; **C** - Viditelné světlo, pGB-R-DsRed-GFP; **D** – kanál DsRed, pGB-R-DsRed-GFP

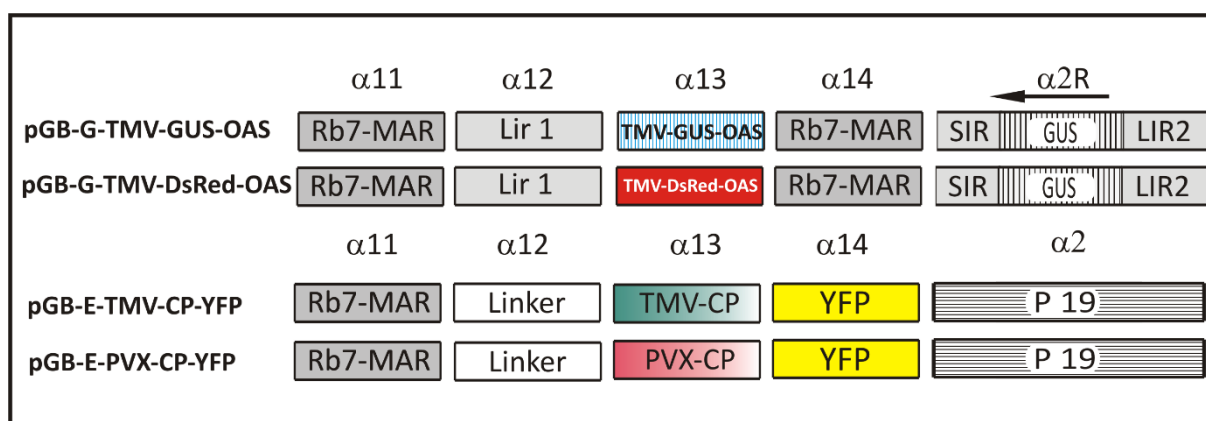
Listy byly infiltrovány pomocí *A. tumefaciens* EHA 105 nesoucí příslušný plazmid. Hustoty suspenze byly následující: 1 - 0,015; 2 - 0,0312; 3 - 0,0625; 4 - 0,125; 5 - 0,25. Fotografie byly pořízeny 12 DPI. Převzato a upraveno z Dusek et al. 2020.

5.4 Systém tvorby TMV VLP

V tomto experimentu jsme se pokusili docílit tvorby TMV VLP pomocí současné infekce rostlinných buněk dvěma virovými vektory odvozenými od BeYDV, z nichž jeden vyvolává expresi TMV-GUS-OAS a TMV-DsRed-OAS. Další vektor vyvolá expresi TMV CP a reportérového genu YFP.

Ve všech inokulacích byl použit vektor pGB-TMV-GUS-OAS (respektive pGB-TMV-DsRed-OAS). Ten obsahuje 5' UTR (také zvaný TMV omega enhancer) a 3' UTR pocházející z viru TMV. V 3' části je navíc nukleotidová sekvence OAS, společně s markerovým genem GUS/DsRed.

Geminivirová složka (části pocházející z viru BeYDV) obsahuje Lir1, Sir a Lir2. Konstrukty složené z těchto dvou složek byly pojmenovány pGB-G-TMV-GUS-OAS a pGB-G-TMV-DsRed-OAS podle toho, jaký byl použit reportérový gen. Aby se mohly vytvořit TMV VLP, je nutné dodat i TMV CP. Ten byl dodán konstruktem pGB-E-TMV-CP-YFP, obsahující navíc žlutý fluorescenční protein jako reportérový gen. Jako kontrola byl navržen konstrukt pGB-E-PVX-CP-YFP, který je totožný s konstruktem pGB-E-TMV-CP-YFP, pouze místo obalového proteinu TMV obsahuje obalový protein PVX (všechny tyto konstrukty viz Obrázek 18).



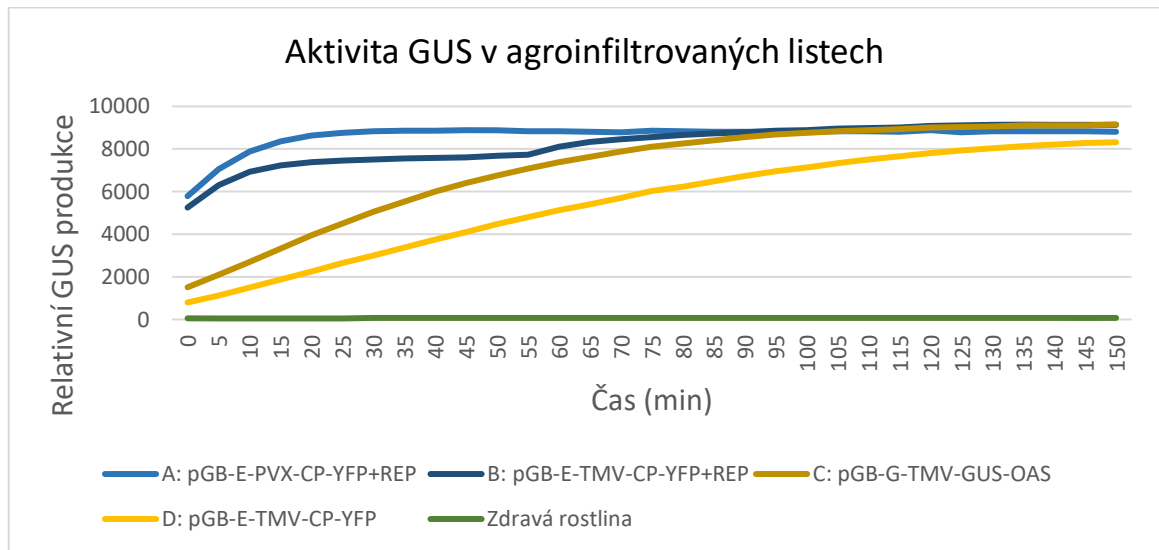
Obrázek 18: Schématické znázornění použitých konstruktů pro tvorbu VLP. **pGB** - plazmidy GoldenBraid; **G** - obsahuje GUS místo; **E** - nereplikující se vektory odvozené od pEAQ; **DsRed/YFP** - fluorescenční reportérové geny pod promotorem 35S a Nos terminátorem s 5'/3' UTRs odvozenými od CPMV; **MAR Rb7** - matrix attachment region; **Linker** - výplňový fragment, který je dlouhý 35bp; **P 19** – supresor silencingu odvozený od viru keříčkovitosti rajčete; **TMV/PVX – CP** – geny pro tvorbu obalového proteinu pod promotorem 35S a Nos terminátorem s 5'/3' UTRs odvozenými od CPMV.

5.4.1 Tvorba TMV VLP

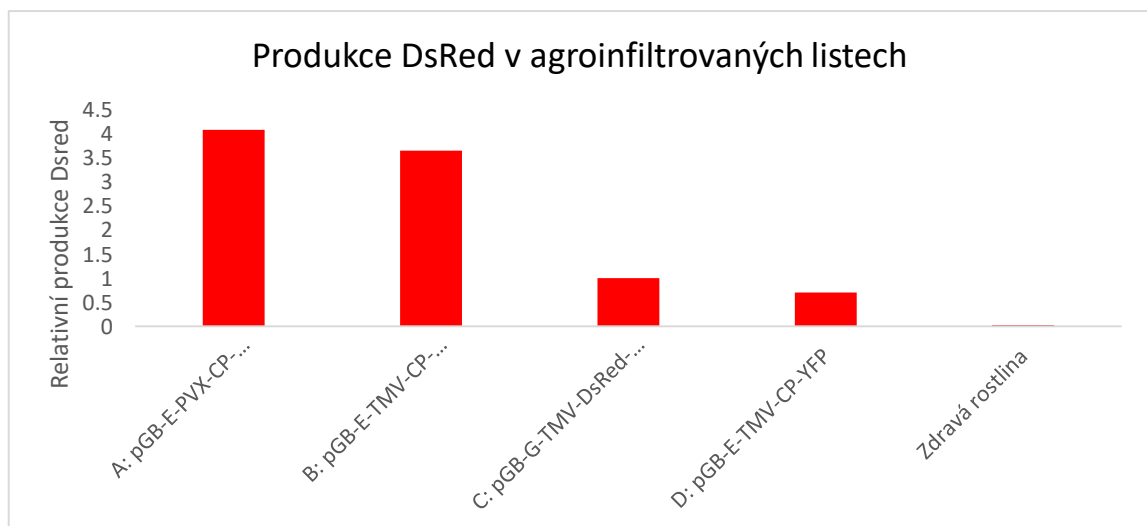
Byly zvoleny 4 různé kombinace agrobakterií, kterými byly infikovány rostliny *N. benthamiana*. Ve všech možnostech byl přítomný konstrukt pGB-G-TMV-GUS-OAS. V první kombinaci byl k pGB-G-TMV-GUS-OAS přidán supresor silencingu P 19, jednalo se tedy o směs 2 agrobakterií. V druhé možnosti byly rostliny inokulovány pGB-G-TMV-GUS-OAS a pGB-E-TMV-CP-YFP. Ve zbylých možnostech byly přidány replikační a replikační asociační proteiny (Rep/RepA odvozená od BeYDV), které měly zvýšit produkci markerového proteinu. Navíc byly přidány obalové proteiny na samostatných plazmidech: pGB-E-TMV-CP-YFP, nebo pGB-E-PVX-

CP-YFP (Graf 1). Pokud dojde ke koinfiltraci pGB-G-TMV-GUS-OAS a pGB-E-TMV-CP-YFP, dojde k tvorbě TMV VLP.

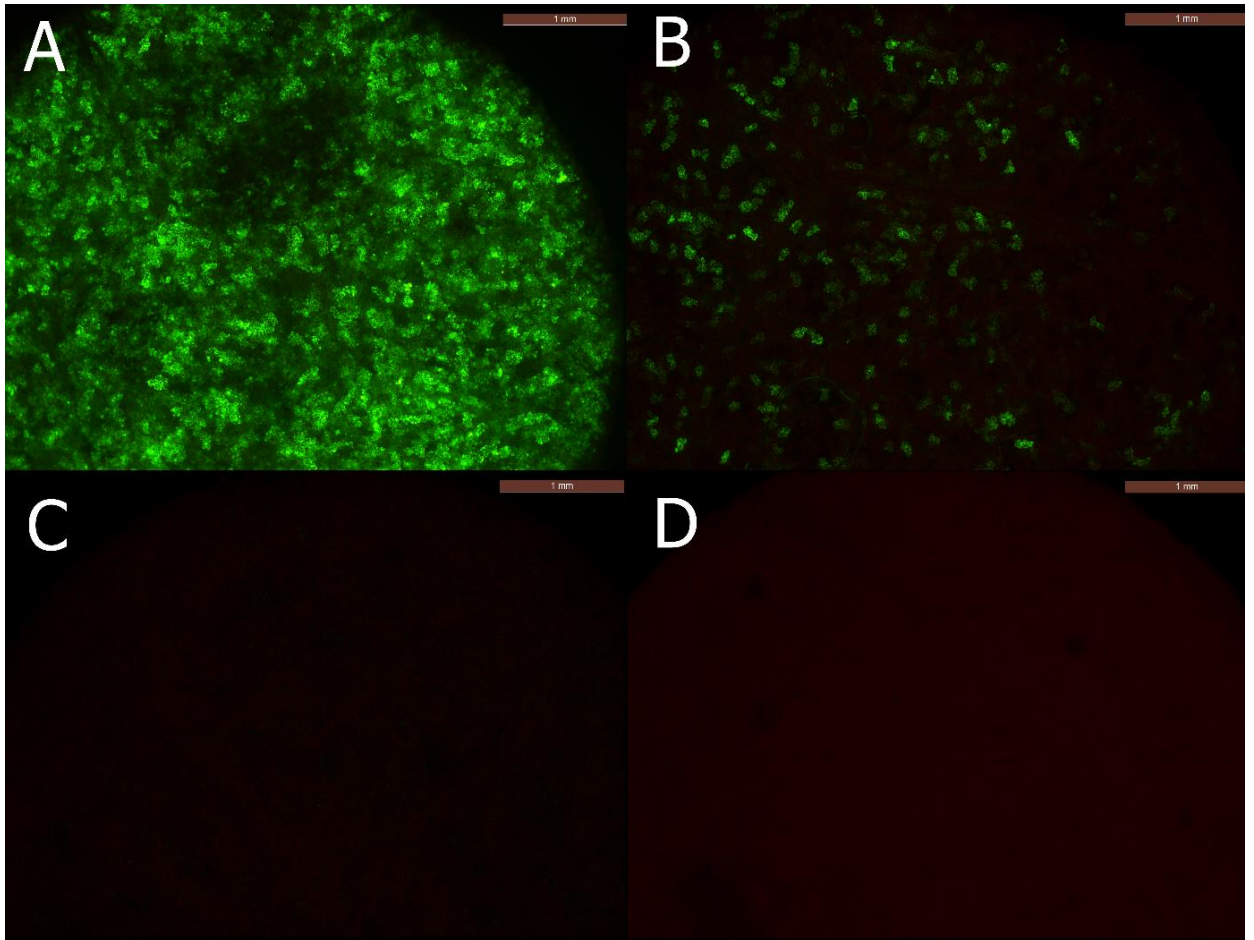
Stejný postup i kombinace je v Grafu 2, pouze zde byl zvolen jiný markerový gen – DsRed místo GUS. Hodnoty byly měřeny 5 DPI.



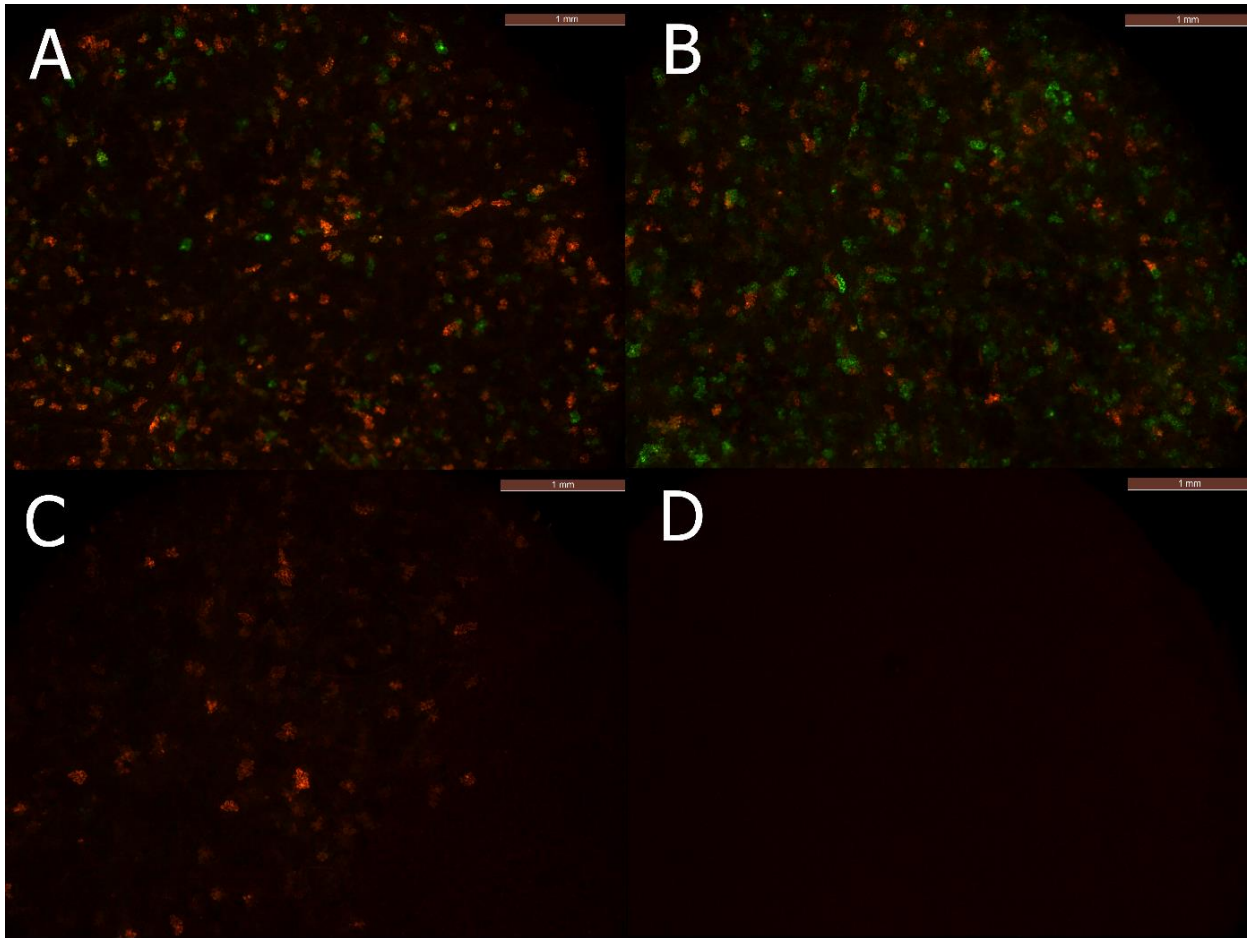
Graf 1: **Stanovení GUS aktivity v infiltrovaných listech:** Až na kontrolu (Zdravá rostlina) byl ve všech kombinacích přítomný pGB-G-TMV-GUS-OAS v kombinaci s: **A** – PVX obalovým proteinem a Rep/RepA; **B** - TMV obalovým proteinem a Rep/RepA; **C** – samostatný pGB-G-TMV-GUS-OAS; **D** – TMV obalovým proteinem. Jednalo se tedy o koinfiltraci více agrobakterií. Měřeno 5 DPI v rostlinách *N. benthamiana*.



Graf 2: **Stanovení DsRed v infiltrovaných listech:** Až na kontrolu (Zdravá rostlina) byl ve všech kombinacích přítomný pGB-G-TMV-DsRed-OAS a: **A** - PVX obalový protein a Rep/RepA; **B** - TMV obalový protein a Rep/RepA; **C** - samostatný pGB-G-TMV-DsRed-OAS (bez Rep/RepA); **D** - přidán pouze TMV obalový protein (bez Rep/RepA). Fluorescence naměřená v listech infikovaných vektorem pGB-G-TMV-DsRed-OAS byla počítána jako 1,0. Jednalo se tedy o koinfiltraci více agrobakterií. Měřeno 5 DPI v rostlinách *N. benthamiana*.



Obrázek 19: **Vliv přítomnosti Rep/RepA na tvorbu markerového proteinu u vektoru pGB-G-TMV-GUS-OAS v rostlinách *N. benthamiana*.** Až na kontrolu (D) byl ve všech kombinacích přítomný pGB-G-TMV-GUS-OAS a Rep/RepA. **A** – TMV obalový protein se žlutým fluorescenčním proteinem; **B** - PVX obalový protein se žlutým fluorescenčním proteinem; **C** – samostatný pGB-G-TMV-DsRed-OAS; **D** – zdravá rostlina. Fotografie byla pořízena 5 DPI, zobrazené měřítko 1 mm.



Obrázek 20: **Vliv přítomnosti Rep/RepA na tvorbu markerového proteinu u vektoru pGB-G-TMV-DsRed-OAS v rostlinách *N. benthamiana*.** Až na kontrolu (D) byl ve všech kombinacích přítomný pGB-G-TMV-DsRed-OAS a Rep/RepA. **A** – TMV obalový protein se žlutým fluorescenčním proteinem; **B** - PVX obalový protein se žlutým fluorescenčním proteinem; **C** – samostatný pGB-G-TMV-DsRed-OAS; **D** – zdravá rostlina. Fotografie byla pořízena 5 DPI, zobrazené měřítko 1 mm.

Z grafů (Graf 1 a 2) je vidět, že na hladinu exprese markerového proteinu GUS/DsRed měla největší vliv přítomnost Rep/RepA. Pokud byl přítomen i odpovídající obalový protein (TMV), produkce v inokulovaných listech byla lehce snížena. Domníváme se, že důvodem může být snížení koncentrace RNA dostupné pro translaci, protože část RNA je zabalena do obalového proteinu a již nemůže sloužit jako templát pro tvorbu dalšího proteinu.

Na obrázcích 19 a 20 můžeme vidět vzorky 5 DPI pod fluorescenčním mikroskopem. Fotografie byly pořízeny s filtrem I3, který zobrazuje protein DsRed červeně a YFP zeleně. Fotografie jsou shodné s daty naměřenými na Tecanu-F200.

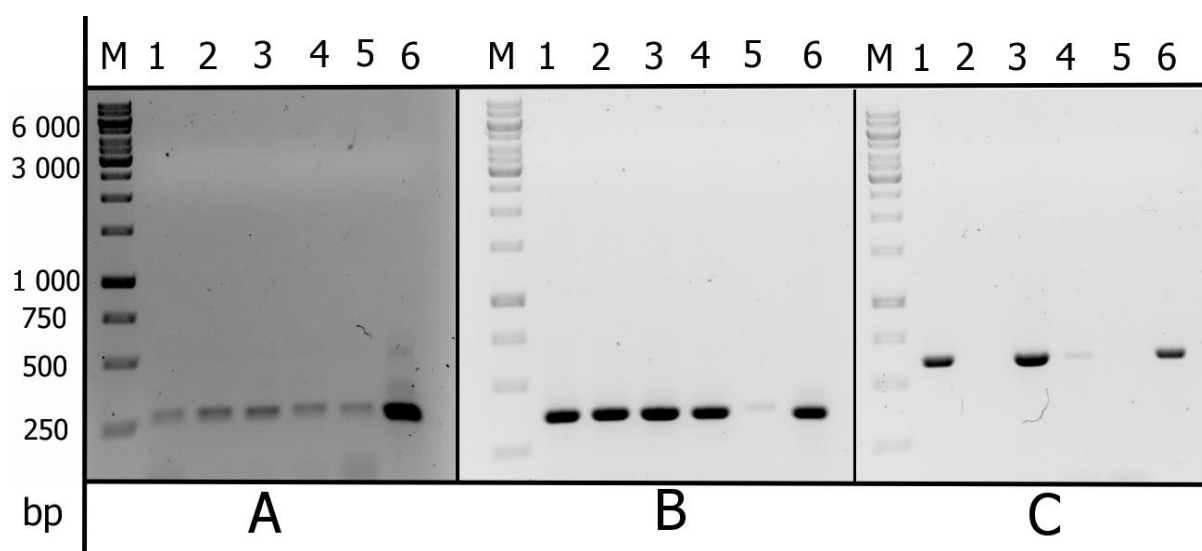
5.4.2 Detekce VLP pomocí PCR

Jedním ze způsobů, jak zjistit, zda je RNA chráněna proteinovým obalem ve VLP částicích, je PCR amplifikace.

Vzorky do reakce byly odebrány pomocí metody filtračního papíru popsané v kapitole 4. 12. Primery použité v reakci jsou zobrazeny (cílené na markerové geny) v Tabulce 11 a pro housekeepingový gen Actin v Tabulce 12. Obecný předpis pro PCR reakci, používanou pro amplifikaci DNA fragmentů, je uveden v Tabulce 8 a podmínky v Tabulce 9.

Název primeru	Nukleotidová sekvence
DsRed-3	TGGTGGCGTCCCTCGGTT
DsRed-5	AAGGTTTCGCATGGAAGGAAC
GUS-F	CAGCGTAATGCTCTACACCA
GUS-R	GATATCACACTCTGTCTGGC

Tablka 11: **Primery použité pro Reversní transkripci a následnou PCR.** Obě dvojice primerů cílí na geny pro tvorbu markerů uvnitř VLP – DsRed a GUS. Pro DsRed je velikost ampliconu 623 bp, pro GUS 277 bp.



Obrázek 21: **Elektroforetický gel zobrazující přítomnost markerového genu uvnitř VLP.** **A** – Kontrolní vzorky s Actinovými primery. **B** – Vzorky s GUSovými primery. **C** – Vzorky s DsRedovými primery. 1% agarózový gel.

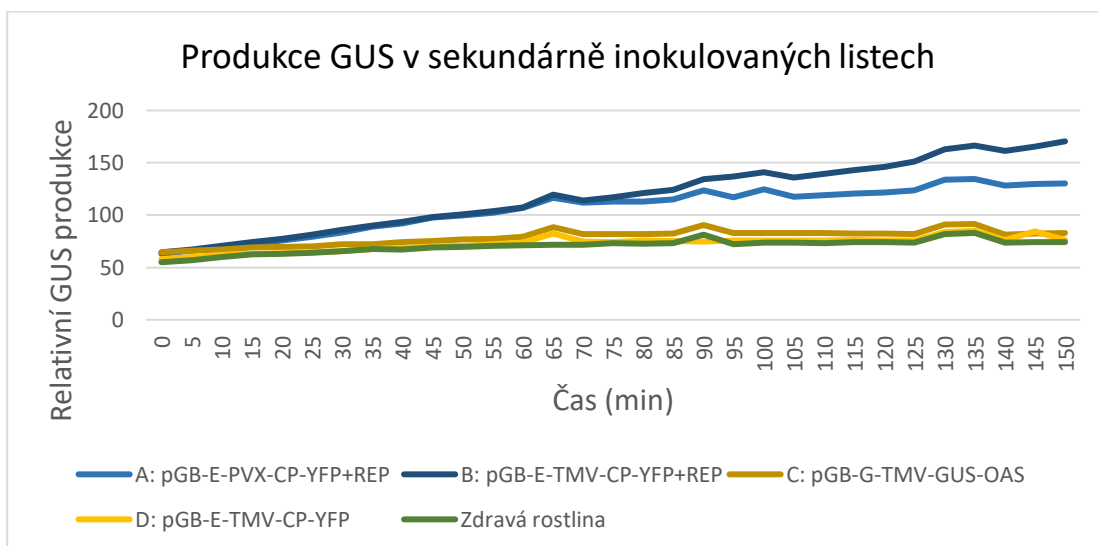
M – Marker; **1** – pGB-G-TMV-DsRed-OAS + pGB-E-TMV-CP-YFP; **2** - pGB-G-TMV-GUS-OAS + pGB-E-TMV-CP-YFP; **3** - pGB-G-TMV-DsRed-OAS + pGB-E-PVX-CP-YFP; **4** - pGB-G-TMV-GUS-OAS + pGB-E-PVX-CP-YFP; **5** – Zdravá rostlina; **6** – Pozitivní kontrola (jako pozitivní kontrola byla použita příslušná plazmidová DNA o koncentraci 1 ng/μl). Pro DsRed je velikost ampliconu 623 bp, pro GUS 277 bp, pro Actin 269 bp.

Velikost amplikonu DsRed je 623 bp a amplikonu GUS je 277 bp. Jako kontrola extrakce a integrity RNA sloužil gen NbActin, kde je velikost amplikonu 269 bp. Jako pozitivní kontrola sloužil příslušný 100krát naředěný plazmid (finální koncentrace cca 1 ng/μl). Pro NbActin byla použita DNA o stejné koncentraci.

5.4.3 Sekundární inokulace TMV VLP

Jako zdroj VLP sloužily agroinfiltrované listy popsané dříve. VLP jsou tvořeny obalovým proteinem TMV, který obaluje RNA kódující enzym GUS. Vzorky byly odebrány 5 DPI.

Z grafu 3 vyplývá, že listy infikované kombinací GUS RNA a TMV CP (pGB-G-TMV-GUS-OAS + pGB-E-TMV-CP-YFP + Rep/RepA), ale i kombinací GUS RNA a PVX CP (pGB-G-TMV-GUS-OAS + pGB-E-PVX-CP-YFP + Rep/RepA) vykazují prokazatelnou expresi GUS. Listy infikované kombinacemi bez virových obalových proteinů expresi GUS nevykazují. Tato data naznačují, že kromě očekávaných VLP částic založených na specifické interakci OAS motiv a TMV CP v rostlinách zřejmě dochází i k nespecifické tvorbě částic obalených PVX CP.

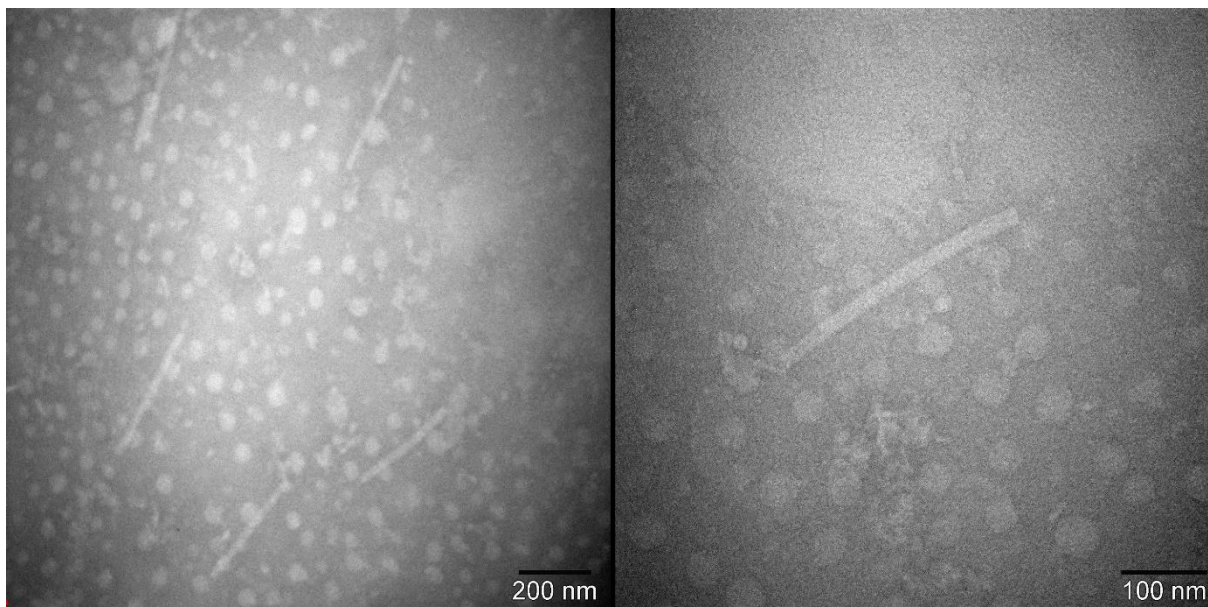


Graf 3: **Stanovení GUS aktivity v rostlinách inokulovaných mechanicky:** Listy byly mechanicky inokulovány extraktem z listů, ve kterých byl reportérový konstrukt pGB-G-TMV-GUS-OAS a **A** – PVX obalový protein a Rep/RepA; **B** - TMV obalový protein a Rep/RepA; **C** – samostatný pGB-G-TMV-GUS-OAS; **D** - TMV obalový protein; Kontrolní vzorek – (Zdravá rostlina) neobsahoval ani reportérový ani pomocný konstrukt.

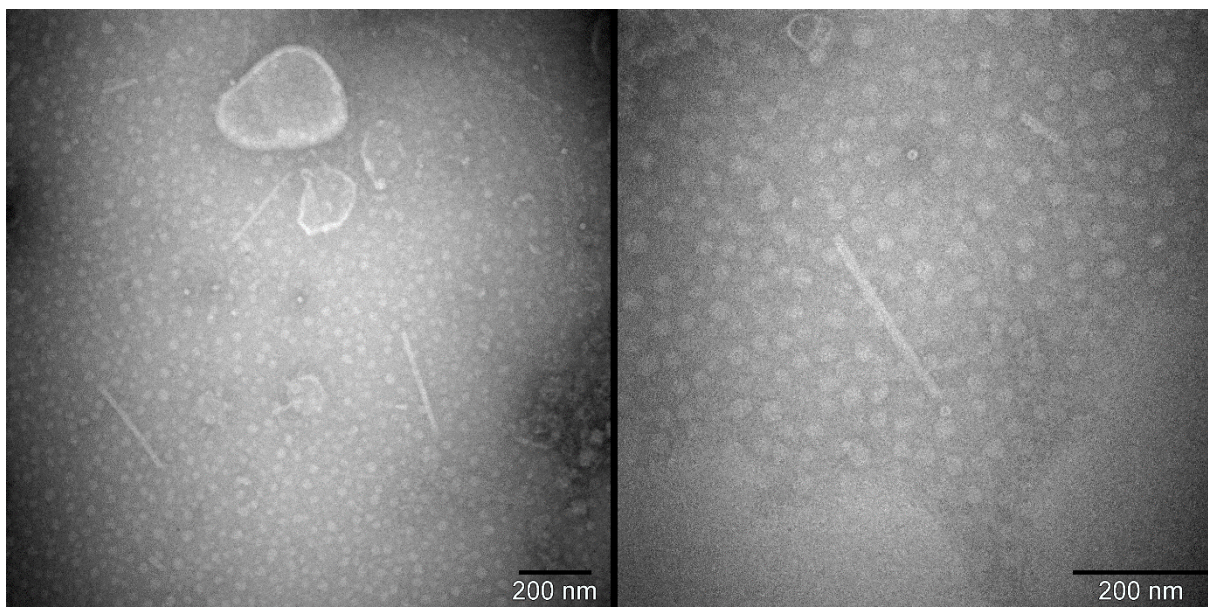
5.5 Detekce VLP pomocí transmisní elektronové mikroskopie

Snímky byly pořízeny na transmisním elektronovém mikroskopu Morgagni 268D (FEI, Česká republika) se zabudovanou digitální kamerou.

Pro elektronovou mikroskopii byly zvoleny dříve popsané kombinace konstruktů pro tvorbu TMV VLP – tedy částice, které obsahují reportérový gen pro tvorbu GUS a DsRed (viz Obrázek 18).



Obrázek 22: **Tvorba VLP obsahující reportérový gen GUS.** Rostliny *N. benthamiana* byly inokulovány konstrukty pGB-G-TMV-GUS-OAS, pGB-E-TMV-CP-YFP a Rep/RepA. Vzorke pro purifikaci byly odebrány 11 DPI. Snímky byly pořízeny na transmisním elektronovém mikroskopu Morgagni 268D (FEI, Česká republika).

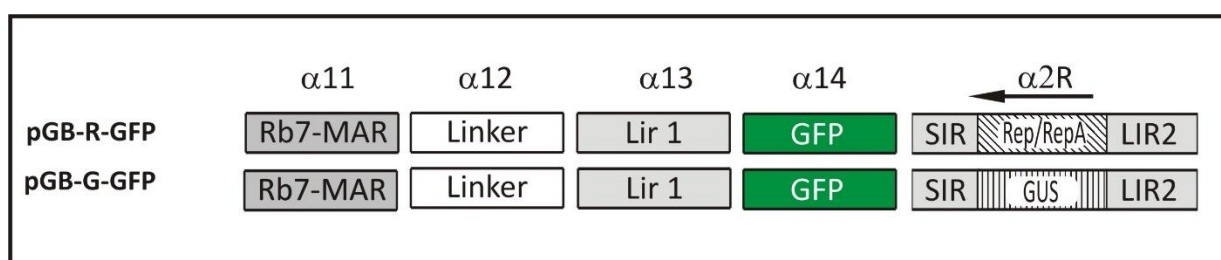


Obrázek 23: **Tvorba VLP obsahující reportérový gen DsRed.** Rostliny *N. benthamiana* byly inokulovány konstrukty pGB-G-TMV-DsRed-OAS, pGB-E-TMV-CP-YFP a Rep/RepA. Vzorke pro purifikaci byly odebrány 11 DPI. Snímky byly pořízeny na transmisním elektronovém mikroskopu Morgagni 268D (FEI, Česká republika).

Částice viru tabákové mozaiky mají délku přibližně 300 nm, což odpovídá délce pozorovaných částic.

5.6 Vliv přítomnosti Rep/RepA na tvorbu proteinu pomocí geminivirových vektorů

V tomto experimentu byl ukázán vliv přítomnosti Rep/RepA na výši produkce proteinu. Jako reportér byl zvolen protein GFP. Byly zvoleny tři různé kombinace inokulace – samotným konstruktem pGB-R-GFP, který obsahuje Rep/RepA; samotným konstruktem pGB-G-GFP, který je bez Rep/RepA; kombinací dvou agrobacterií – pGB-G-GFP a konstruktu, který nesl Rep/RepA. Konstrukty jsou zobrazeny na Obrázku 24.



Obrázek 24: Schématické znázornění použitých konstruktů exprimujících GFP. pGB - plazmidy GoldenBraid; R- replikující se konstrukt G - obsahuje GUS místo Rep/RepA; GFP - fluorescenční reportérové geny pod promotorem 35S a Nos terminátorem s 5'/3' UTRs odvozenými od CPMV; MAR Rb7 - matrix attachment regions; Linker - výplňový fragment, který je dlouhý 35 bp.

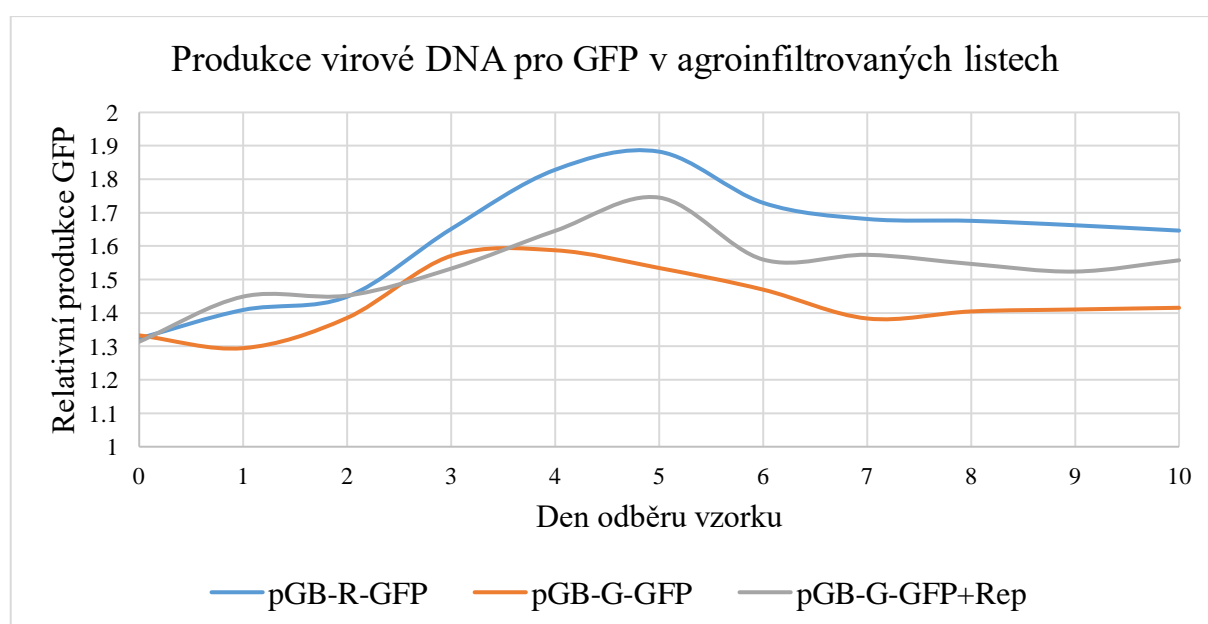
Pro každou kombinaci konstruktů byly agroinfiltrovány 3 rostliny *N. benthamiana*. Hustoty bakteriálních suspenzí byly OD = 0,5. Vzorky pro čas 0 byly odebrány ihned po infiltraci. Poté byly vzorky odebírány po dobu 10 dnů. Pro každý vorek byly odebrány 3 náhodné listové disky (rostliny inokulované konstrukty obsahujícími Rep/RepA začaly v průběhu odběru podléhat částečné nekróze. Pro to byly vzorky odebírány z částí listů, které byly postiženy nekrózou jen částečně). Ze vzorků byla vyizolována DNA pomocí postupu Dellaporta et al. 1983 (viz kapitola 4.11). DNA byla použita jako templát pro následnou kvantitativní PCR (qPCR). Byla použita souprava LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche, Švýcarsko) a přístroj LightCycler® 480 (Roche, Švýcarsko). V reakcích byly použity dvě sady primerů – primery zaměřené na GFP převzaté z Wang et al. 2004 (GFP-qFor, GFP-qRev) a primery cílené na Actin (Nb-ActinS, Nb-ActinAS) viz Tabulka 12.

Actin je housekeepingový gen, tedy gen, který je exprimován ve všech typech tkání a buněk, a je potřebný pro údržbu základních buněčných funkcí (geny, které jsou exprimované

vždy a v každém buněčném typu) (Watson 1965; Warrington et al. 2000). Pomocí Actinu byla koncentrace jednotlivých vzorků sjednocena.

Název primeru	Nukleotidová sekvence
GFP-qFor	CTGCTGCCCCGACAACCAC
GFP-qRev	TCACGAACTCCAGCAGGAC
Nb-ActinS	CCGTGGAGAAGAGCTACGAG
Nb-ActinAS	GATACGGGGAGCTAATGCAG

Tabulka 12: **Primery použité pro qPCR.** První dvojice primerů je zaměřena na markerový gen GFP. Druhá dvojice primerů cílí na housekeepingový gen Actin infiltrované rostliny *N. benthamiana*.



Graf 4: **Produkce virové DNA pro GFP v agroinfiltrovaných listech po dobu 10 dní.** Produkce byla měřena pomocí metody qPCR a všechny vzorky byly normalizovány na Actin. Osa Y je zobrazena v logaritimické škále. **pGB-R-GFP** - replikující se konstrukt; **pGB-G-GFP** – nereplikující se konstrukt (obsahuje GUS místo Rep/RepA); **pGB-G-GFP+Rep** – nereplikující se konstrukt smíšený s konstruktem, který obsahuje Rep/RepA.

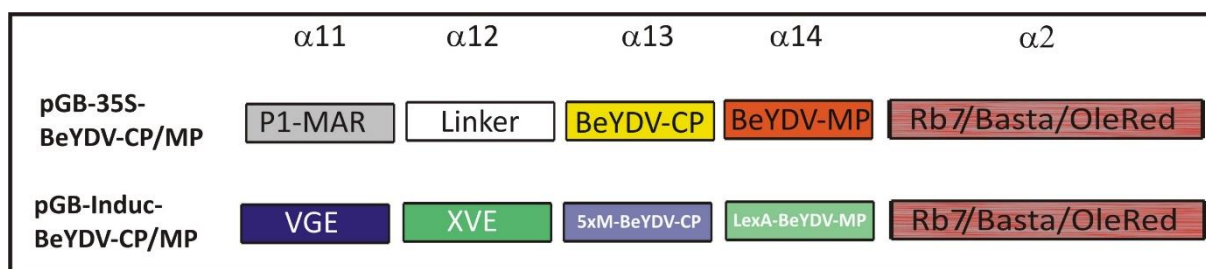
U vzorků, které obsahovaly Rep/RepA, docházelo k nekrotickým. Proto nebyly listové disky odebírány náhodně, ale pouze z částí, které nebyly zcela nekrotické. Jak je vidět z Grafu 4, největší vliv na produkci virové DNA (markerového proteinu GFP) má přítomnost Rep/RepA.

5.7 Permanentní rostlinná transformace

Do rostlin *N. benthamiana* měly být vloženy geny pro tvorbu CP a MP viru BeYDV. Vektor pGB-35S-BeYDV-CP/MP má geny pro tvorbu CP a MP pod konstitutivním promotorem 35S. Ve vektoru pGB-Induc-BeYDV-CP/MP jsou geny CP a MP pod kontrolou chemicky inducibilních promotorů 5xM respektive LexA (Zuo et al. 2000; Semenyuk et al. 2010; Chen et al. 2017).

Postup transgenózy byl dodržen s oběma konstrukty. Došlo k tvorbě kalusů na médiu obsahujícím selekční herbicid BASTA. Kalusy začaly mít výhony po 6 – 8 týdnech. Z výhonů byly úspěšně napěstovány dospělé rostliny. Rostliny byly následně testovány na přítomnost transgenů (potíráním listů zředěným herbicidem BASTA 1:400, PCR cílenou na gen BASTA, CP a MP). Všechny výsledky byly negativní. Proto byl pokus několikrát opakován, vždy s negativním výsledkem.

Jako alternativa byla proto zvolena transgenóza na rostlinách *A. thaliana*. Pro transformaci rostlin byly použité stejné konstrukty jako na rostliny *N. benthamiana*. I přes dodržení všech postupů nebyla získána transgenní rostlina. Tento postup byl aplikován na jiné konstrukty, u kterých proběhla transgenóza úspěšně. U konstruktů pGB-35S-BeYDV-CP/MP a pGB-Induc-BeYDV-CP/MP byla zatím bohužel neúspěšná.



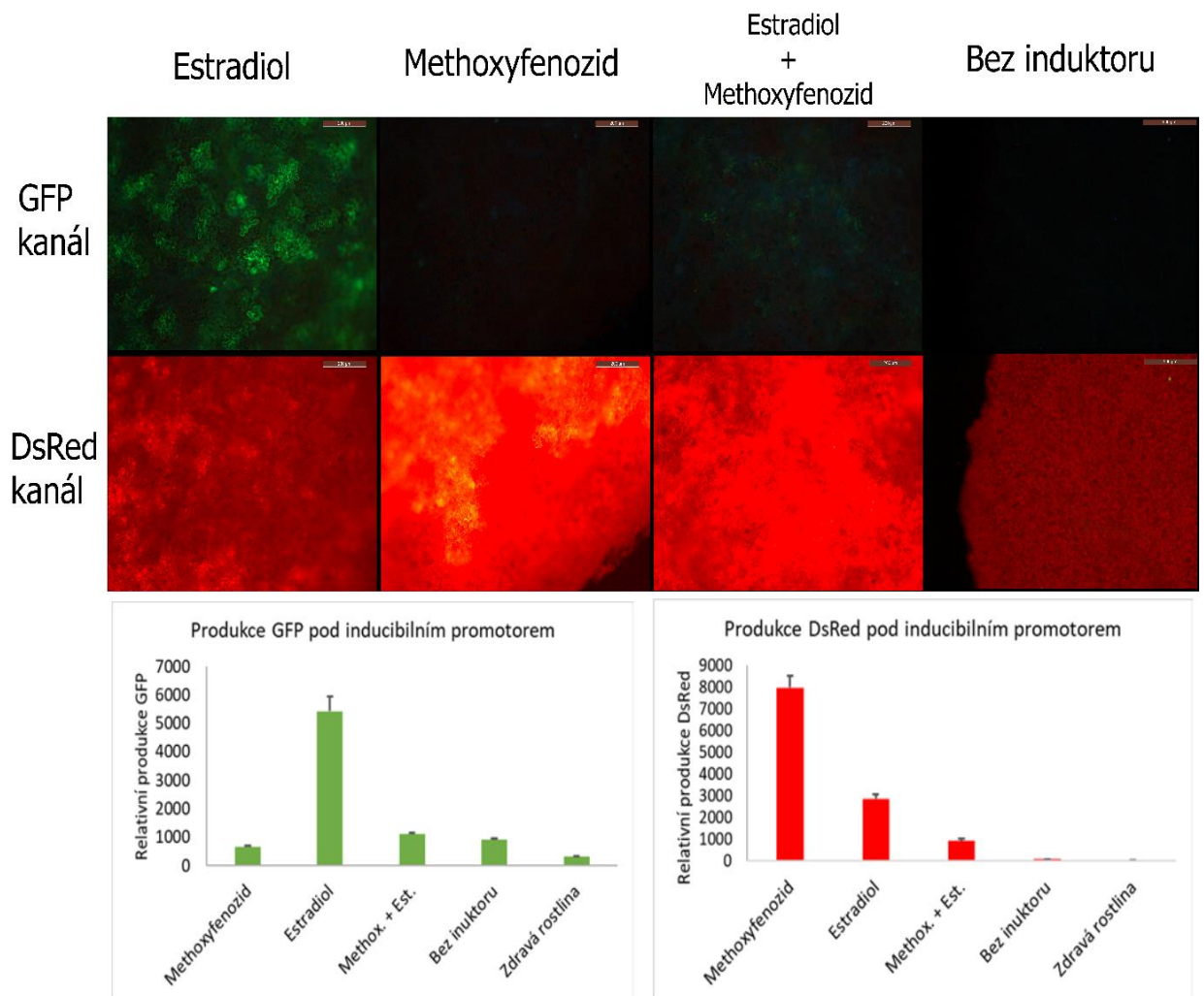
Obrázek 25: Mapa konstruktů pro stabilní rostlinnou transformaci. pGB - plazmidy GoldenBraid; MAR Rb7/P1 - matrix attachment regions; Linker - výplňový fragment o délce 35bp; BeYDV-CP – gen pro tvorbu obalového proteinu viru BeYDV, pod promotorem 35S a s Nos terminátorem; BeYDV-MP – gen pro tvorbu pohybového proteinu viru BeYDV, pod promotorem 35S a Nos terminátorem; Basta/OleRed – gen pro rezistenci k herbicidu Basta a červený fluorescenční protein, který se exprimuje pouze v semenech; VGE/XVE – transkripční aktivátory; 5xM/LexA – inducibilní promotory.

5.8 Transientní inducibilní exprese

Konstrukt pGB-Induc-GFP-DsRed (viz Obrázek 26) byl navržen tak, aby byl co nejvíce podobný konstruktu pGB-Induc-BeYDV-CP/MP (viz Obrázek 25). Po přidání příslušné chemikálie došlo ke spuštění exprese reportérových genů. Byly zvoleny 4 různé kombinace – pouze estradiol, pouze methoxifenoamid, oba dva induktory dohromady a kontrola bez přidání induktoru. Po přidání pouze jednoho induktoru došlo k nejvyšší expresi. Pokud byly přítomny oba, exprese probíhala, ale poměrně slabě. Kontrola vyšla negativně a je srovnatelná se zdravou (neinokulovanou) rostlinou *N. benthamiana* – viz Obrázek 27.



Obrázek 26: Mapa konstruktů pro transientní inducibilní expresi reportérových genů GFP a DsRed. **pGB** - plazmidy GoldenBraid; **Rb7** - matrix attachment region; **Basta/OleRed** – gen pro rezistenci k herbicidu Basta a červený fluorescenční protein, který se exprimuje pouze v semenech; **VGE/XVE** – transkripční aktivátory; **5xM-DsRed** – fluorescenční reportérový gen DsRed pod promotorem 5xM; **LexA-GFP** – fluorescenční reportérový gen GFP pod promotorem LexA.



Obrázek 27: **Grafické znázornění transientní exprese s inducibilními promotory 4 DPI u rostlin *N. benthamiana*.** Pro infiltraci byl použit konstrukt pGB-Induc-GFP-DsRed, který obsahuje fluorescenční reportérové geny GFP a DsRed pod inducibilními promotory. V horní polovině obrázku jsou fotografie z fluorescenčního mikroskopu. Ve spodní polovině jsou data naměřená na přístroji Tecan-F200, zobrazené měřítko 200 μ m.

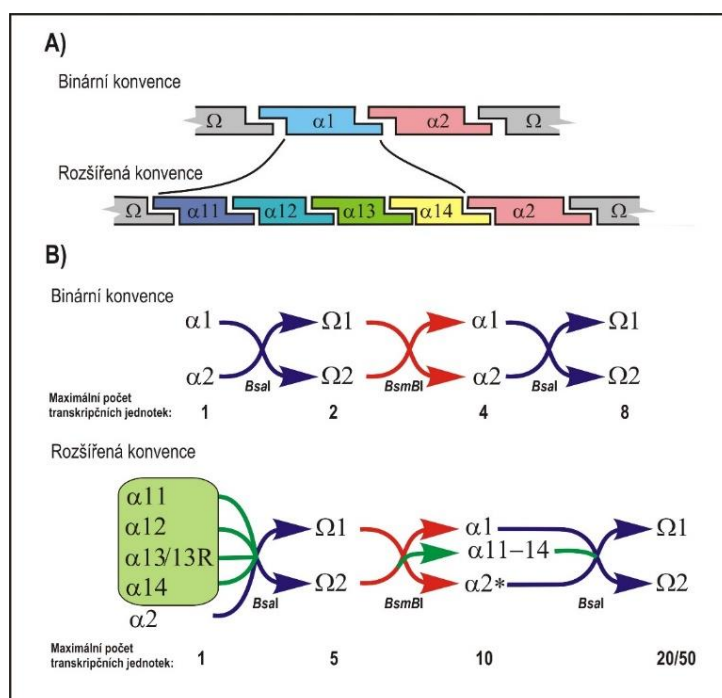
6 Diskuze

6.1 Rozšíření konvence GoldenBraid o nové plazmidy

V první části práce jsme rozšířili stávající konvenci GoldenBraid o 5 nových α plazmidů. Těmi jsou α_{11} , α_{12} , α_{13} , α_{14} a α_{13R} . Tyto nové plazmidy jsou kompatibilní s původní verzí GB a kombinují její výhody (nekonečná smyčka bez potřeby speciálních linkerů) s výhodami systému MoClo (schopnost sestavit složitější vícegenové konstrukty v jediné reakci).

Poté, co je GB kazeta domestikována (ověřena restričním štěpením a sekvenací), nevyžaduje již pro další využití sekvenaci, nebo syntézu nových oligonukleotidů. Takto zhotovené a ověřené kazety je možné požívat i v dalších reakcích pro jiné konstrukty.

Pro konstrukci rozsáhlejších plazmidů v původní binární konvenci (Sarrion-Perdigones et al. 2011) bylo zapotřebí nejprve vytvořit velké množství meziproductových plazmidů, které vyžadovaly klonování, transformaci, izolaci a ověření restričním štěpením popřípadě sekvenací. Díky rozšíření o 5 nových α plazmidů je práce mnohem rychlejší a levnější (viz Obrázek 28).



Obrázek 28: Schématické znázornění původní binární konvence a její rozšíření. **A** – V rozšířené sestavě je původní plazmid α_1 nahrazen 4 novými α plazmidy. Konec 5' plazmidu α_{11} a konec 3' plazmidu α_{14} jsou identické s konci původních plazmidů α_1 a α_2 . **B** – Ukázka nekonečné smyčky v klasické binární sestavě oproti rozšířené konvenci. Je zde i vidět maximální počet sestavených transkripčních jednotek. Převzato a upraveno z Dusek et al. 2020.

Rozdíly ve spolehlivosti sestavovaných plazmidů jsou zobrazeny v Tabulce 13. Jak je vidět, obě metody mají obdobnou úspěšnost sestavení.

Způsob klonování	Celkově sestavených plazmidů	Správně sestavené plazmidy
Původní metoda	52	38 (73,1 %)
Rozšířená metoda	162	131 (80,8 %)

Tabulka 13: Srovnání původní binární metody s nově navrženou pětičlennou metodou.

Možností, díky které by se dala zvýšit efektivnost sestavování plazmidů, je optimalizace 4 nukleotidových přesahů. Potapov et al. (2018) popisují vhodnost všech možných kombinací 4 bázových přesahů použitelných v konvenci GoldenGate. Ukazují zde dokonce možnost spojení až 24 různých plazmidů do jednoho vektoru s úspěšností 84 %. Tento článek vyšel v roce 2018, návrhy 4 bázových přesahů pro rozšíření konvence GoldenBraid byly ale navrženy již v roce 2015 a vytvořeny v roce 2016, takže tato empirická data nemohla být zohledněna. I tak se efektivita pohybuje okolo 80 % (viz Tabulka 13), což je dostačující poměr pro tvorbu nových plazmidů.

6.2 Replikující a nereplikující se virové vektory

V práci byly použity replikující se vektory odvozené od viru BeYDV a nereplikující se vektory odvozené od systému pEAQ. Oba dva tyto typy exprimují dva fluorescenční markery. Naše data ukazují, že síla exprese (replikujících se i nereplikujících se vektorů) závisí na topologii multigenových vektorů. Podobné výsledky byly dosaženy i v dřívější studii exprese protilátek v systému pEAQ. Autoři dosáhli vyšší produkce protilátek, pokud byl gen pro těžký řetězec umístěn před gen pro lehký řetězec (Sainsbury et al. 2009). Obdobných výsledků bylo dosaženo v této práci (viz Obrázek 15) – čím blíže je transkripční jednotka umístěna k levému okraji LB, tím silnější je exprese proteinu.

Přítomnost (respektive nepřítomnost) Rep/RepA má vliv na produkci markerového proteinu. Rostliny byly inokulovány třemi podobnými konstrukty - samotným konstruktem pGB-R-GFP, který obsahuje Rep/RepA; samotným konstruktem pGB-G-GFP, který je bez Rep/RepA; kombinací dvou agrobakterií – pGB-G-GFP a konstruktu, který samostatně exprimuje Rep/RepA.

Obdobné výsledky jsme publikovali (Dusek et al. 2020) v článku, kde byla kvantifikována vektorová DNA pomocí qPCR. Rostlinné pletivo bylo infiltrováno dvěma

podobnými konstrukty: pGB-R-GFP-DsRed (obsahuje Rep/RepA) a pGB-G-GFP-DsRed (obsahuje GUS místo Rep/RepA). Dle výsledků vyplývá, že replikující konstrukty mají přibližně 150krát více kopií než nereplikující se. Velice podobných výsledků dosáhli ve svých disertačních pracích i Raygaana Jacobs (Jacobs 2018) u viru BeYDV a Pavel Cejnar (Cejnar et al. 2019) u viru zakrslosti pšenice (wheat dwarf virus, WDV), který také patří do čeledi *Geminiviridae*. R. Jacobs vytvořila konstrukty také pomocí GB metody. Jako markerový gen zvolila eGFP (optimalizovaný mutant GFP (Cormack et al. 1996)) a zaklonovala jej do třech geminivirových vektorů – 1: GB-pRIC 3.0-GFP obsahující Rep/RepA, 2: GB-pRIC 3.0-GFP, který má místo Rep/RepA výplňový fragment DNA, 3: GB-pRIC 3.0-GFP obsahují Rep/RepA mimo cirkulační úsek. Vzorčky listů byly odebrány 1., 3. a 5. den po inokulaci.

6.2.1 Tvorba TMV VLP

Nejprve byl navržen DNA konstrukty, a to tak, aby obsahoval reportérové geny GUS a DsRed. Transkribovaná mRNA obou těchto reportérových genů zároveň obsahovala TMV enkapsidační sekvenci OAS. Tato kazeta byla poté zaklonována do geminivirového vektoru obsahujícího 2x LIR a SIR sekvence, jakož i sekvenci pro Rep/RepA, vše odvozeno od viru BeYDV. V jádru rostlinné buňky nejprve dojde k cirkularizaci geminivirového genomu a k jeho amplifikaci. Z reportérové kazety je transkribována mRNA a transportována z jádra. Pokud byla použita kombinace vektorů, která kromě reportérové mRNA s OAS signálem ještě produkuje obalový protein TMV (respektive PVX CP jako negativní kontrolu), došlo k tvorbě VLP částic. Částice byly detekovány pomocí metody PCR (viz Obrázek 21) a transmisní elektronové mikroskopie (viz Obrázek 22 a 23).

Systémem tvorby VLP se zabývá dr. Lomonossoff, který popisuje tvorbu částic pomocí nereplikujících se pEAQ vektorů (Saunders & Lomonossoff 2017). V roce 2021 vyšel článek (Thuenemann et al. 2021) porovnávající replikující se (pEff) a nereplikující se (pEAQ) vektory sloužící k tvorbě VLP. V této práci vycházejí jako účinnější vektory, které se replikují.

6.2.2 Nekrotizující listy *N. benthamiana*

Již dříve byly prokázány nekrózy vyvolané replikací BeYDV v listech *N. benthamiana*. V literatuře jsou popsány i způsoby, jak tuto nekrotickou reakci omezit nebo zpomalit, například použitím různých kmenů agrobakterií nebo vložením MAR sekvence do replikující se části geminovirového genomu za expresní kazetu (Diamos et al. 2016).

Podobnou strategii jsem testoval i v této práci. Použil jsem *A. tumefaciens* GV3103 a EHA105, avšak nezaznamenal jsem měřitelný vliv na tvorbu nekrotizace. Lehký zmírňující účinek mělo vložení sekvence RB-7 MAR. Jiné MAR sekvence (TM2 a TM6 odvozené od tabáku a P1 odvozený od sóji) nevykazovaly žádný účinek.

Naše další úvaha spočívala v tom, že nekrózy by mohly být omezeny nebo zpomaleny nižším množstvím suspenze *A. tumefaciens* použité pro inokulaci. A zatímco nereplikující se konstrukty s ředěním rychle ztrácejí účinnost, u replikujících konstruktů by mohla být malá počáteční nálož v zápětí kompenzována autonomní replikací DNA. Testovali jsme dvojnásobné ředící řady počínaje $OD_{600} = 0,25$ až $OD_{600} = 0,015$. Listy, které byly infiltrovány nereplikujícím se vektorem, nevykazovaly žádné známky nekrotizace ani při nejvyšší koncentraci agrobakterií ($OD_{600} = 0,25$). Lze však pozorovat postupné snižování intenzity fluorescence odpovídající snižující se hustotě agrobakterií. Na druhé straně všechny použité koncentrace replikujících se konstruktů, s výjimkou těch nejvíce zředěných, vykazovaly nekrózy již 4. DPI (viz Obrázek 17, na kterém jsou zobrazeny fotografie 12 DPI).

Další studovanou možností pro omezení tvorby nekrotizace byla inokulace různých druhů tabáků. Těmi byly *Nicotiana rustica*, *Nicotiana glutinosa* a *Nicotiana tabacum* (spolu s *Nicotiana benthamiana*). Všechny tabáky byly inokulovány replikujícím se konstruktem o koncentraci $OD_{600} = 0,25$. *N. tabacum* a *N. benthamiana* vykazovaly silné nekrózy již 4 DPI. K mírnému útlumu tvorby nekrotizace došlo u druhů *N. rustica* a *N. glutinosa*.

6.3 Transientní inducibilní exprese

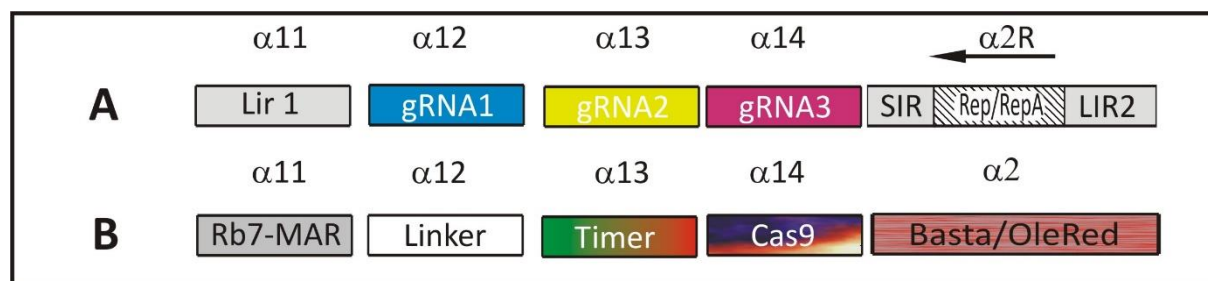
V dalším experimentu jsme testovali možnost chemicky indukovatelné exprese nejprve reportérových genů a poté i částí BeYDV genomu. Použili jsme konstrukty, ve kterých byly kazety s inducibilními promotory i kazety s příslušnými transkripčními aktivátory na jednom plazmidu (viz Obrázek 26).

Konstrukt pGB-Induc-GFP-DsRed byl navržen tak, aby byl co nejvíce podobný konstruktu pGB-Induc-BeYDV-CP/MP. Má to být jakási kontrola pro funkčnost inducibilní exprese, jak transientně, tak později v permanentní rostlinné expresi. Transientní exprese byla úspěšná, i když přidáním jen jedné aktivační chemikálie, došlo i k slabé expresi druhého markerového genu. To mohlo být způsobeno způsobem inokulace – na jedné polovině listu byla aplikován estradiol, na druhé polovině methoxifenozyd (z důvodu lepšího vyhodnocení exprese). Chemikálie se ale vodivými pletivými mohly v rostlině dostat i na druhou polovinu listu, a tím se mohla spustit slabá exprese. Kontrola bez aktivačních chemikálií měla aktivitu srovnatelnou s negativní kontrolou. Takto navržený konstrukt, který má dva inducibilní promotory i s oběma transkripčními aktivátory na jednom plazmidu, byl v laboratoři navržen poprvé.

6.4 Aplikace GoldenBraid ve strategii CRISPR/Cas9

Nová pětičlenná metoda umožňuje rychlejší a robustnější sestavení plazmidů oproti původní konvenci (Vazquez-Vilar et al. 2017). V kombinaci s geminivirovými vektory se jeví jako vhodná metoda pro současnou strategii CRISPR/Cas9 (Jinek et al. 2012) – z 5 možných kazet 3 kazety mohou obsadit sekvence gRNA (sestavené pouze pomocí oligonukleotidů) a zbylé 2 kazety LIR1 a LIR2-Rep/RepA-SIR (viz Obrázek 29). Díky tomu dojde k replikaci geminivirového vektoru a k tvorbě vysokých počtů kopií vložených gRNA. Cas9 nukleáza může být na jiném plazmidu, nebo se může v dalším kroku spojit do jednoho celku.

Geminivirové vektory používané pro metodu CRISPR/Cas9 (gRNA) jsou již popsány (Yin et al. 2015; Dahan-Meir et al. 2018). S těmito konstrukty již v laboratoři probíhají pokusy.



Obrázek 29: **Možné použití rozšířené metody GB k tvorbě konstruktů pro CRISPR/Cas9.** A – Replikující se vektor obsahující až 3 kazety s gRNA. B – Kazeta obsahující nukleázu Cas9; markerový gen Timer (marker, který v průběhu času mění svoji fluorescenci ze zelené na červenou, (Tersikh et al. 2000); rezistenci k herbicidu Basta a červený fluorescenční protein, který se exprimuje pouze v semenech, usnadňuje následnou selekci.

6.5 Transgenní rostliny

Jako alternativa k transientní expresi existuje možnost vytvořit transgenní rostliny, které exprimují transgen stabilně. Už před časem byla popsána úspěšná možnost transgenóze na více jak 120 druzích rostlin (Birch 1997). Ovšem je důležité, aby trvalé vnesení transgenu do genomu rostliny převyšovalo finanční náklady a nevyvažovalo časovou náročnost. Pomocí transientní exprese je možno produkovat vysoké výtěžky proteinů v relativně krátké době (dny – týdny). Je však nutné, aby každá rostlina byla infiltrována příslušným *A. tumefaciens*, což při velkém počtu rostlin může být náročné (lze usnadnit vakuovou infiltrací). Stabilní exprese v transgenní rostlině je časově náročnější (měsíce) a výtěžky požadovaného proteinu jsou nižší. Ovšem po dosažení homozygotní linie je další manipulace s rostlinami poměrně nenáročná (Garabagi et al. 2012).

V této práci měly být vytvořeny transgenní rostliny *N. benthamina*, nesoucí plášťový a pohybový protein viru BeYDV, a to pod konstitutivním promotorem 35S (pGB-35S-BeYDV-CP/MP), nebo pod inducibilními promotory 5xM a LexA (pGB-Induc-BeYDV-CP/MP). Pak by se mohly infiltrovat transgenní rostliny vektory, kterým by chyběl plášťový a obalový protein (např. pGB-R-GFP a pGB-R-DsRed) a bylo by možné pozorovat pohyb virových částic z buňky do buňky. Plazmidy nesoucí transgeny byly úspěšně vytvořeny (viz Obrázek 25). Přes několikanásobné opakování (pro každý konstrukt bylo připraveno asi 800 listových disků), nebylo dosaženo vytvoření transgenní rostliny. Po celou dobu byl do médií přidáván selekční herbicid Basta a i tak došlo k vytvoření kalusu, zakořenění rostlin a přenesení do květináče. Z takto odrostlých rostlin byl odebrán materiál pro screening, který však vyšel negativně.

Proto byla souběžně zahájena i transgenóze na rostlinách *A. thaliana*. I přes úspěšnou transgenózu jiných konstruktů (vliv různých promotorů na sílu exprese), u pGB-35S-BeYDV-CP/MP a pGB-Induc-BeYDV-CP/MP transgenóze doposud nebyla zdařilá.

7 Závěr

- Cílem práce bylo vytvoření virových vektorů, pomocí kterých mohou být v rostlinách efektivně exprimovány cizorodé proteiny a průběh exprese lze sledovat pomocí markerových genů. Jako markerové geny byly zvoleny reportéry GFP, DsRed a GUS. Tvorbou vektorů byl rozšířen stávající systém GoldenBraid o 4 nové plazmidy.
- Podařilo se vytvořit virové vektory na základě viru TMV, kterými byly úspěšně sekundárně inokulovány rostliny *N. benthamiana* a došlo k expresi markerového proteinu. Takto vytvořené viru podobné částice byly úspěšně detekovány pomocí metody PCR a elektronové mikroskopie.
- Podařilo se určit vliv Rep/RepA u geminivirových vektorů. Největší vliv má její samotná přítomnost (nepřítomnost). Rep/RepA může být dodána i na jiném vektoru, ale exprese je pak o něco slabší. U konstruktů, obsahujících Rep/RepA, je však nevýhodou tvorba nekróz na rostlinách *N. benthamiana*, a to již 4 DPI.
- Jako alternativa k transientní rostlinné expresi je permanentní exprese. Všechny experimenty s transientní expresí byly úspěšné, s permanentní bohužel nikoliv. To poukazuje na náročnost transgenóze rostlin oproti dočasné expresi.
- Úspěšně byl vytvořen plazmid nesoucí dva inducibilní promotory (5xM a LexA). V rostlinách *N. benthamiana*, po přidání aktivačních chemikálií, spustily expresi markerových proteinů. Pokud aktivační chemikálie nebyla přítomna, exprese neprobíhala.

8 Literatura

- Agrios GN. 2005. *Plant Pathology*. Elsevier.
- Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Walter P, Raff M, Roberts K. 1998. *Essential Cell Biology*. Garland.
- Al-Kaff NS, Covey SN, Kreike MM, Page AM, Pinder R, Dale PJ. 1998. Transcriptional and Posttranscriptional Plant Gene Silencing in Response to a Pathogen. *Science* 279: 2113–2115.
- Allen GC, Hall G, Michalowski S, Newman W, Spiker S, Weissinger AK, Thompson WF. 1996. High-level transgene expression in plant cells: effects of a strong scaffold attachment region from tobacco. *The Plant Cell* 8: 899–913.
- An G. 1987. Binary ti vectors for plant transformation and promoter analysis. Pages 292–305 *Methods in Enzymology*. Academic Press.
- Andret-Link P, Fuchs M. 2005. Transmission specificity of plant viruses by vectors. *Journal of Plant Pathology*.
- Baeshen NA, Baeshen MN, Sheikh A, Bora RS, Ahmed MMM, Ramadan HAI, Saini KS, Redwan EM. 2014. Cell factories for insulin production. *Microbial Cell Factories* 13: 141.
- Baulcombe DC, Chapman S, Cruz SS. 1995. Jellyfish green fluorescent protein as a reporter for virus infections. *The Plant Journal* 7: 1045–1053.
- Bednář J. 2000. *Základy genového inženýrství rostlin*. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně.
- Birch RG. 1997. PLANT TRANSFORMATION: Problems and strategies for practical application. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48: 297–326.
- Breyne P, Montagu M van, Depicker N, Gheysen G. 1992. Characterization of a plant scaffold attachment region in a DNA fragment that normalizes transgene expression in tobacco. *The Plant Cell* 4: 463–471.
- Broekaert WF, Terras FR, Cammue BP, Osborn RW. 1995. Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. *Plant Physiology* 108: 1353–1358.
- Butler PJ. 1984. The current picture of the structure and assembly of tobacco mosaic virus. *The Journal of General Virology* 65 (Pt 2): 253–279.
- Cann AJ. 2011. *Principles of molecular virology*. Academic Press.
- Caranta C, Aranda MA. 2011. *Recent advances in plant virology*. Horizon Scientific Press.
- Cejnar P, Ohnoutková L, Ripl J, Kundu JK. 2019. Wheat dwarf virus infectious clones allow to infect wheat and Triticum monococcum plants. *Plant Protection Science* 55: 81–89.
- Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC. 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*. New York 263: 802–805.
- Chapman S, Hills G, Watts J, Baulcombe D. 1992. Mutational analysis of the coat protein gene of potato virus X: effects on virion morphology and viral pathogenicity. *Virology* 191: 223–230.
- Chen Q, He J, Phoolcharoen W, Mason HS. 2011. Geminiviral vectors based on bean yellow dwarf virus for production of vaccine antigens and monoclonal antibodies in plants. *Human Vaccines* 7: 331–338.
- Chen Q, Lai H, Hurtado J, Stahnke J, Leuzinger K, Dent M. 2013. Agroinfiltration as an effective and scalable strategy of gene delivery for production of pharmaceutical proteins. *Advanced techniques in biology & medicine* 1.

- Chen Z, Cheng Q, Hu Ch, Guo X, Chen Z, Lin Y, Hu T, Bellizzi M, Lu G, Wang GL, Wang Z, Chen S, Wang F. 2017. A chemical-induced, seed-soaking activation procedure for regulated gene expression in rice. *Frontiers in Plant Science* 8: 1447.
- Clemente T. 2006. *Nicotiana* (*Nicotiana tobaccum*, *Nicotiana benthamiana*). Pages 143–154 in Wang K, editor. *Agrobacterium Protocols*. Humana Press, Totowa, NJ.
- Cody WB, Scholthof HB. 2019. Plant virus vectors 3.0: transitioning into synthetic genomics. *Annual Review of Phytopathology* 57: 211–230.
- Cormack BP, Valdivia RH, Falkow S. 1996. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* 173: 33–38.
- Cubitt AB, Heim R, Adams SR, Boyd AE, Gross LA, Tsien RY. 1995. Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends in Biochemical Sciences* 20: 448–455.
- Dahan-Meir T, Filler-Hayut S, Melamed-Bessudo C, Bocobza S, Czosnek H, Aharoni A, Levy AA. 2018. Efficient in planta gene targeting in tomato using geminiviral replicons and the CRISPR/Cas9 system. *The Plant Journal* 95: 5–16.
- Dangl J, Dietrich R, Richberg M. 1996. Death don't have no mercy: cell death programs in plant-microbe interactions. *The Plant Cell* 8: 1793–1807.
- Daniell H, Streatfield SJ, Wycoff K. 2001. Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. *Trends in Plant Science* 6: 219–226.
- Dawson WO, Lehto KM. 1990. Regulation of tobamovirus gene expression. Pages 307–342 in Maramorosch K, Murphy FA, Shatkin AJ, editors. *Advances in Virus Research*. Academic Press.
- De Bolle MFC, Butaye KMJ, Goderis IJWM, Wouters PFJ, Jacobs A, Delauré SL, Depicker A, Cammue BPA. 2007. The influence of matrix attachment regions on transgene expression in *Arabidopsis thaliana* wild type and gene silencing mutants. *Plant Molecular Biology* 63: 533–543.
- de Ronde D, Butterbach P, Kormelink R. 2014. Dominant resistance against plant viruses. *Frontiers in Plant Science* 5.
- Dědič P. 2014. *Hlavní virové choroby bramboru v ČR*. Havlíčkův Brod: Výzkumný ústav bramborářský.
- Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB. 1983. A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter* 1: 19–21.
- Diamos AG, Rosenthal SH, Mason HS. 2016. 5' and 3' untranslated regions strongly enhance performance of geminiviral replicons in *Nicotiana benthamiana* leaves. *Frontiers in Plant Science* 7.
- Dusek J, Plchova H, Cerovska N, Poborilova Z, Navratil O, Kratochvilova K, Gunter C, Jacobs R, Hitzeroth II, Rybicki EP, Moravec T. 2020. Extended set of GoldenBraid compatible vectors for fast assembly of multigenic constructs and their use to create geminiviral expression vectors. *Frontiers in Plant Science* 11.
- Ellis T, Adie T, Baldwin GS. 2011. DNA assembly for synthetic biology: from parts to pathways and beyond. *Integrative Biology: Quantitative Biosciences from Nano to Macro* 3: 109–118.
- Engler C, Gruetzner R, Kandzia R, Marillonnet S. 2009. Golden gate shuffling: a one-pot DNA shuffling method based on type IIIs restriction enzymes. *PLOS ONE* 4: e5553.
- Engler C, Kandzia R, Marillonnet S. 2008. A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability. *PLOS ONE* 3: e3647.
- Francki RIB, Fauquet CM, Knudson DL, Brown F. 2012. Classification and nomenclature of viruses: Fifth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Virology*

- Division of the International Union of Microbiological Societies. Springer Science & Business Media.
- Frommer WB, Ninnemann O. 1995. Heterologous expression of genes in bacterial, fungal, animal, and plant cells. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 46: 419–444.
- Fujita Y, Tohda H, Giga-Hama Y, Takegawa K. 2006. Heat shock-inducible expression vectors for use in *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS Yeast Research* 6: 883–887.
- Garabagi F, McLean MD, Hall JC. 2012. Transient and stable expression of antibodies in *Nicotiana* species. Pages 389–408 in Chames P, editor. *Antibody Engineering: Methods and Protocols*, Second Edition. Humana Press, Totowa, NJ.
- García JA, Glasa M, Cambra M, Candresse T. 2014. Plum pox virus and sharka: a model potyvirus and a major disease. *Molecular Plant Pathology* 15: 226–241.
- Gautier A, Gauron C, Volovitch M, Bensimon D, Jullien L, Vríz S. 2014. How to control proteins with light in living systems. *Nature Chemical Biology* 10: 533–541.
- Gibson DG, Benders G, Andrews-Pfannkoch C, Denisova E, Baden-Tillson H, Zaveri J, Stockwell T, Brownley A, Thomas D, Algire MA, Merryman Ch, Young L, Noskov V, Glass JI, Venter JC, Hutchison C, Smith H. 2008. Complete chemical synthesis, assembly, and cloning of a *Mycoplasma genitalium* genome. *Science (New York, N.Y.)* 319: 1215–1220.
- Gleba Y, Klimyuk V, Marillonnet S. 2007. Viral vectors for the expression of proteins in plants. *Current Opinion in Biotechnology* 18: 134–141.
- Gleba YY, Tusé D, Giritch A. 2014. Plant viral vectors for delivery by *Agrobacterium*. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 375: 155–192.
- Godiard L, Grant MR, Dietrich RA, Kiedrowski S, Dangl JL. 1994. Perception and response in plant disease resistance. *Current Opinion in Genetics & Development* 4: 662–671.
- Goelet P, Lomonossoff GP, Butler PJ, Akam ME, Gait MJ, Karn J. 1982. Nucleotide sequence of tobacco mosaic virus RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 79: 5818–5822. National Academy of Sciences.
- Gray SM, Banerjee N. 1999. Mechanisms of arthropod transmission of plant and animal viruses. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63: 128–148. American Society for Microbiology.
- Halweg C, Thompson WF, Spiker S. 2005. The Rb7 matrix attachment region increases the likelihood and magnitude of transgene expression in tobacco cells: A flow cytometric study. *The Plant Cell* 17: 418–429.
- Harrison BD, Wilson TMA, Klug A. 1999. The tobacco mosaic virus particle: structure and assembly. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 354: 531–535. Royal Society.
- Haseloff J, Ajioka J. 2009. Synthetic biology: history, challenges and prospects. *Journal of The Royal Society Interface* 6: 389–391.
- Haseloff J, Amos B. 1995. GFP in plants. *Trends in Genetics* 11: 328–329.
- Hefferon KL. 2014. DNA virus vectors for vaccine production in plants: spotlight on geminiviruses. *Vaccines* 2: 642–653.
- Hefferon KL, Fan Y. 2004. Expression of a vaccine protein in a plant cell line using a geminivirus-based replicon system. *Vaccine* 23: 404–410.
- Hefferon KL, Kipp P, Moon YS. 2004. Expression and purification of heterologous proteins in plant tissue using a geminivirus vector system. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 7: 109–114.

- Heim R, Tsien RY. 1996. Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. *Current Biology* 6: 178–182.
- Huang S, Weigel D, Beachy RN, Li J. 2016. A proposed regulatory framework for genome-edited crops. *Nature Genetics* 48: 109–111.
- Huang Z, Chen Q, Hjelm B, Arntzen C, Mason H. 2009. A DNA replicon system for rapid high-level production of virus-like particles in plants. *Biotechnology and Bioengineering* 103: 706–714.
- Huang Z, Mason HS. 2004. Conformational analysis of hepatitis B surface antigen fusions in an *Agrobacterium*-mediated transient expression system. *Plant Biotechnology Journal* 2: 241–249.
- Hull R. 2009. *Comparative plant virology*. Academic Press.
- Hull R. 2013. *Plant virology*. Academic Press.
- Hwang DJ, Roberts IM, Wilson TM. 1994. Assembly of tobacco mosaic virus and TMV-like pseudovirus particles in *Escherichia coli*. *Archives of Virology. Supplementum* 9: 543–558.
- Iakimova ET, Michalczyk L, Woltering EJ. 2005. Hypersensitive cell death in plants: its mechanisms and role in plant defense against pathogens. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research* 13: 135–158.
- Jacobs R. 2018. Enhancement of plant expression vectors using replication and silencing suppressor elements. University of Cape Town.
- Janda M, Navrátil O, Haisel D, Jindřichová B, Fousek J, Burketová L, Čeřovská N, Moravec T. 2015. Growth and stress response in *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana benthamiana*, *Glycine max*, *Solanum tuberosum* and *Brassica napus* cultivated under polychromatic LEDs. *Plant Methods* 11: 31.
- Jefferson RA, Burgess SM, Hirsh D. 1986. beta-Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 83: 8447–8451.
- Ji L, Xu R, Lu L, Zhang J, Yang G, Huang J, Wu C, Zheng C. 2013. TM6, a novel nuclear matrix attachment region, enhances its flanking gene expression through influencing their chromatin structure. *Molecules and Cells* 36: 127–137.
- Jiang H, Doerge RW, Gelvin SB. 2003. Transfer of T-DNA and Vir proteins to plant cells by *Agrobacterium tumefaciens* induces expression of host genes involved in mediating transformation and suppresses host defense gene expression. *The Plant Journal* 35: 219–236.
- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. 2012. A programmable dual RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science (New York, N.Y.)* 337: 816–821.
- Juers DH, Matthews BW, Huber RE. 2012. LacZ β -galactosidase: Structure and function of an enzyme of historical and molecular biological importance. *Protein Science: A Publication of the Protein Society* 21: 1792–1807.
- Kapila J, De Rycke R, Van Montagu M, Angenon G. 1997. An *Agrobacterium*-mediated transient gene expression system for intact leaves. *Plant Science* 122: 101–108.
- Kikkert JR, Vidal JR, Reisch BI. 2005. Stable transformation of plant cells by particle bombardment/biistics. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 286: 61–78.
- Koo JC, Asurmendi S, Bick J, Woodford-Thomas T, Beachy RN. 2004. Ecdysone agonist-inducible expression of a coat protein gene from tobacco mosaic virus confers viral resistance in transgenic *Arabidopsis*. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 37: 439–448.

- Koprowski H, Yusibov V. 2001. The green revolution: plants as heterologous expression vectors. *Vaccine* 19: 2735–2741.
- Lazarowitz SG, Shepherd DRJ. 1992. Geminiviruses: Genome structure and gene function. *Critical Reviews in Plant Sciences* 11: 327–349.
- Lewin B. 2007. *Genes IX*.
- Lindbo JA. 2007. TRBO: a high-efficiency tobacco mosaic virus RNA-based overexpression vector. *Plant Physiology* 145: 1232–1240.
- Liu L, van Tonder T, Pietersen G, Davies JW, Stanley J. 1997. Molecular characterization of a subgroup I geminivirus from a legume in South Africa. *Journal of General Virology* 78: 2113–2117.
- Logemann E, Birkenbihl RP, Ülker B, Somssich IE. 2006. An improved method for preparing Agrobacterium cells that simplifies the Arabidopsis transformation protocol. *Plant Methods* 2: 16.
- Lucas WJ. 2006. Plant viral movement proteins: agents for cell-to-cell trafficking of viral genomes. *Virology* 344: 169–184.
- Maizel A, Weigel D. 2004. Temporally and spatially controlled induction of gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 38: 164–171.
- Mason HS, Warzecha H, Mor T, Arntzen CJ. 2002. Edible plant vaccines: applications for prophylactic and therapeutic molecular medicine. *Trends in Molecular Medicine* 8: 324–329.
- Matthews RC. 2012. *Plant Virology*. Elsevier.
- Matz MV, Fradkov AF, Labas YA, Savitsky AP, Zaraisky AG, Markelov ML, Lukyanov SA. 1999. Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nature Biotechnology* 17 :969–973.
- Morozov SY, Solovyev AG. 2003. Triple gene block: modular design of a multifunctional machine for plant virus movement. *The Journal of General Virology* 84: 1351–1366.
- Murphy FA, Fauquet CM, Bishop DHL, Ghabrial SA, Jarvis AW, Martelli GP, Mayo MA, Summers MD. 2012. *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses*.
- Mysore KS, Ryu C-M. 2004. Nonhost resistance: how much do we know? *Trends in Plant Science* 9: 97–104.
- Namba K, Pattanayek R, Stubbs G. 1989. Visualization of protein-nucleic acid interactions in a virus: Refined structure of intact tobacco mosaic virus at 2.9 Å resolution by X-ray fiber diffraction. *Journal of Molecular Biology* 208: 307–325.
- Navarro JA, Genovés A, Climent J, Saurí A, Martínez-Gil L, Mingarro I, Pallás V. 2006. RNA-binding properties and membrane insertion of Melon necrotic spot virus (MNSV) double gene block movement proteins. *Virology* 356: 57–67.
- Odolnost rostlin k patogenům | Genetika rostlin | Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity. (n.d.). Available from <https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/js13/genetika/web/pages/07-rezistence-k-patogenum.html>
- Ondřej M, Drobník J. 2002. *Transgenozé rostlin*. Academia.
- Outchkourov NS, Peters J, de Jong J, Rademakers W, Jongsma MA. 2003. The promoter-terminator of chrysanthemum rbcS1 directs very high expression levels in plants. *Planta* 216: 1003–1012.
- Padidam M. 2003. Chemically regulated gene expression in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 169–177.

- Padmanabhan S, Banerjee S, Mandi N. 2011. Screening of bacterial recombinants: Strategies and preventing false positives. Page Molecular Cloning - Selected Applications in Medicine and Biology.
- Palmer KE, Rybicki EP. 1998. The molecular biology of mastreviruses. *Advances in Virus Research* 50: 183–234.
- Petersen K, Leah R, Knudsen S, Cameron-Mills V. 2002. Matrix attachment regions (MARs) enhance transformation frequencies and reduce variance of transgene expression in barley. *Plant Molecular Biology* 49: 45–58.
- Potapov V, Ong JL, Kucera RB, Langhorst B, Billoti K, Pryor JM, Cantor EJ, Canton B, Knight TF, Evans TC, Lohman GJ. 2018. Comprehensive profiling of four base overhang ligation fidelity by T4 DNA ligase and application to DNA assembly. *ACS Synthetic Biology* 7: 2665–2674.
- Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG, Cormier MJ. 1992. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 111: 229–233.
- Ratcliff F, Martin-Hernandez AM, Baulcombe DC. 2001. Technical advance: Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. *The Plant Journal* 25: 237–245.
- Regenmortel MHV van, Mahy BWJ. 2009. Desk encyclopedia of plant and fungal virology. Academic Press.
- Regnard GL, Halley-Stott RP, Tanzer FL, Hitzeroth II, Rybicki EP. 2010. High level protein expression in plants through the use of a novel autonomously replicating geminivirus shuttle vector. *Plant Biotechnology Journal* 8: 38–46.
- Řepková J. 2013. *Genetika rostlin*.
- Sainsbury F, Lomonossoff GP. 2008. Extremely high-level and rapid transient protein production in plants without the use of viral replication. *Plant Physiology* 148: 1212–1218.
- Sainsbury F, Thuenemann EC, Lomonossoff GP. 2009. pEAQ: versatile expression vectors for easy and quick transient expression of heterologous proteins in plants. *Plant Biotechnology Journal* 7: 682–693.
- Sambrook J, Russell DW. 2006. Preparation of plasmid DNA by alkaline lysis with SDS: minipreparation. *Cold Spring Harbor Protocols* 2006: pdb.prot4084.
- Santi L, Huang Z, Mason H. 2006. Virus-like particles production in green plants. *Methods (San Diego, Calif.)* 40: 66–76.
- Sarrion-Perdigones A, Falconi EE, Zandalinas SI, Juárez P, Fernández-del-Carmen A, Granell A, Orzaez D. 2011. GoldenBraid: An iterative cloning system for standardized assembly of reusable genetic modules. *PLOS ONE* 6: e21622.
- Sarrion-Perdigones A, Vazquez-Vilar M, Palací J, Castelijns B, Forment J, Ziarsolo P, Blanca J, Granell A, Orzaez D. 2013. GoldenBraid 2.0: A comprehensive DNA assembly framework for plant synthetic biology. *Plant Physiology* 162: 1618–1631.
- Saunders K, Lomonossoff GP. 2017. In planta synthesis of designer-length tobacco mosaic virus-based nano-rods that can be used to fabricate nano-wires. *Frontiers in Plant Science* 8.
- Scholthof HB, Scholthof K-BG, Jackson AO. 1996. Plant virus gene vectors for transient expression of foreign proteins in plants. *Annual Review of Phytopathology* 34: 299–323.
- Scotti N, Rigano MM, Cardi T. 2012. Production of foreign proteins using plastid transformation. *Biotechnology Advances* 30: 387–397.

- Semenyuk EG, Schmidt MA, Beachy RN, Moravec T, Woodford-Thomas T. 2010. Adaptation of an ecdysone-based genetic switch for transgene expression in soybean seeds. *Transgenic Research* 19: 987–999.
- Shew HD, Lucas GB. 1991. Compendium of tobacco diseases. Compendium of tobacco diseases. American Phytopathological Society.
- Shimomura O. 1979. Structure of the chromophore of Aequorea green fluorescent protein. *FEBS Letters* 104: 220–222.
- Siegel A. 1985. Plant-virus-based vectors for gene transfer may be of considerable use despite a presumed high error frequency during RNA synthesis. *Plant Molecular Biology* 4: 327.
- Skryabin KG, Kraev AS, Morozov SYu, Rozanov MN, Chernov BK, Lukasheva LI, Atabekov JG. 1988. The nucleotide sequence of potato virus X RNA. *Nucleic Acids Research* 16: 10929–10930.
- Soosaar JLM, Burch-Smith TM, Dinesh-Kumar SP. 2005. Mechanisms of plant resistance to viruses. *Nature Reviews. Microbiology* 3: 789–798.
- Stakman EC. 1915. Relation between *Puccinia graminis* and plants highly resistant to its attack.
- Streatfield SJ, Jilka JM, Hood EE, Turner DD, Bailey MR, Mayor JM, Woodard SL, Beifuss KK, Horn ME, Delaney DE, Tizard IR, Howard JA. 2001. Plant-based vaccines: unique advantages. *Vaccine* 19: 2742–2748.
- Terskikh A, Fradkov A, Ermakova G, Zairaisky A, Tan P, Kajava AV, Zhao X, Lukyanov S, Matz M, Kim S, Weissmen I, Siebert P. 2000. “Fluorescent timer”: protein that changes color with time. *Science (New York, N.Y.)* 290: 1585–1588.
- Thomasset B, Ménard M, Boetti H, Denmat LA, Inzé D, Thomas D. 1996. β -Glucuronidase activity in transgenic and non-transgenic tobacco cells: specific elimination of plant inhibitors and minimization of endogenous GUS background. *Plant Science* 113: 209–219.
- Thomson D, Dietzgen RG. 1995. Detection of DNA and RNA plant viruses by PCR and RT-PCR using a rapid virus release protocol without tissue homogenization. *Journal of Virological Methods* 54: 85–95.
- Thuenemann EC, Byrne MJ, Peyret H, Saunders K, Castells-Graells R, Ferriol I, Santoni M, Steele JFC, Ranson NA, Avesani L, Lopez-Moya JJ, Lomonossoff GP. 2021. A replicating viral vector greatly enhances accumulation of helical virus-like particles in plants. *Viruses* 13: 885. Multidisciplinary Digital Publishing Institute.
- Tsien RY. 1998. The green fluorescent protein. *Annual Review of Biochemistry* 67: 509–544.
- Turner DR, Joyce LE, Butler PJG. 1988. The tobacco mosaic virus assembly origin RNA: Functional characteristics defined by directed mutagenesis. *Journal of Molecular Biology* 203: 531–547.
- Van Die IM, Bergmans HEN, Hoekstra WPM. 1983. Transformation in *Escherichia coli*: Studies On The Role Of The Heat Shock In Induction Of Competence. *Microbiology*, 129: 663–670.
- Vazquez-Vilar M, Quijano-Rubio A, Fernandez-del-Carmen A, Sarrion-Perdigones A, Ochoa-Fernandez R, Ziarsolo P, Blanca J, Granell A, Orzaez D. 2017. GB3.0: a platform for plant bio-design that connects functional DNA elements with associated biological data. *Nucleic Acids Research* 45: 2196–2209.
- Verch T, Yusibov V, Koprowski H. 1998. Expression and assembly of a full-length monoclonal antibody in plants using a plant virus vector. *Journal of Immunological Methods* 220: 69–75.

- Verchot-Lubicz J, Ye C-M, Bamunusinghe D. 2007. Molecular biology of potexviruses: recent advances. *Journal of General Virology*, 88: 1643–1655.
- Wachter RM, Elsliger M-A, Kallio K, Hanson GT, Remington SJ. 1998. Structural basis of spectral shifts in the yellow-emission variants of green fluorescent protein. *Structure* 6: 1267–1277.
- Wang A, Ma S. 2011. *Molecular farming in plants: recent advances and future prospects*. Springer Science & Business Media.
- Wang G, Gentry TJ, Grass G, Josephson K, Rensing C, Pepper IL. 2004. Real-time PCR quantification of a green fluorescent protein-labeled, genetically engineered *Pseudomonas putida* strain during 2-chlorobenzoate degradation in soil. *FEMS Microbiology Letters* 233: 307–314.
- Warrington JA, Nair A, Mahadevappa M, Tsyganskaya M. 2000. Comparison of human adult and fetal expression and identification of 535 housekeeping/maintenance genes. *Physiological Genomics* 2: 143–147.
- Watson JD. 1965. *Molecular Biology of the Gene*.
- Weber E, Engler C, Gruetzner R, Werner S, Marillonnet S. 2011. A modular cloning system for standardized assembly of multigene constructs. *PLOS ONE* 6: e16765.
- Wink M. 1988. Plant breeding: importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. *Theoretical and Applied Genetics* 75: 225–233.
- Xue H, Yang Y-T, Wu C-A, Yang G-D, Zhang M-M, Zheng C-C. 2005. TM2, a novel strong matrix attachment region isolated from tobacco, increases transgene expression in transgenic rice calli and plants. *Theoretical and Applied Genetics* 110: 620–627.
- Yang F, Moss LG, Phillips GN. 1996. The molecular structure of green fluorescent protein. *Nature Biotechnology* 14: 1246.
- Yardımcı N, Kılıç HÇ, Demir Y. 2018. Detection of PVY, PVX, PVS, PVA, and PLRV on Different Potato Varieties in Turkey Using DAS-ELISA. Working Paper.
- Yin K, Han T, Liu G, Chen T, Wang Y, Yu AYL, Liu Y. 2015. A geminivirus-based guide RNA delivery system for CRISPR/Cas9 mediated plant genome editing. *Scientific Reports* 5: 14926.
- Yusibov V, Rabindran S, Commandeur U, Twyman RM, Fischer R. 2006. The potential of plant virus vectors for vaccine production. *Drugs in R&D* 7: 203–217.
- Yusibov VM, Mamedov TG. 2010. Plants as an alternative system for expression of vaccine antigens: 7.
- Zimmern D. 1977. The nucleotide sequence at the origin for assembly on tobacco mosaic virus RNA. *Cell* 11: 463–482.
- Zou Y, Mason MG, Wang Y, Wee E, Turni C, Blackall PJ, Trau M, Botella JR. 2017. Nucleic acid purification from plants, animals and microbes in under 30 seconds. *PLoS biology* 15: e2003916.
- Zuo J, Niu QW, Chua NH. 2000. Technical advance: An estrogen receptor-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 24: 265–273.

9 Seznam použitých zkratek a symbolů

Zkratka	Anglický název	Český název
5'/3' UTR	5'/3' Non-translated region	5'/3' nepřekládaná oblast
AMV	alfalfa mosaic virus	virus mozaiky vojtěšky
BFP	blue fluorescent protein	modrý fluorescenční protein
BYDV	barley yellow dwarf virus	virus žluté zakrslosti ječmene
CaMV	cauliflower mosaic virus	virus mozaiky kvěťáku
cDNA	complementary DNA	DNA syntetizovaná podle RNA
CIM	callus-inducing medium	kalus indukující médium
CPMV	cowpea mosaic virus	virus mozaiky vigny
ddH ₂ O	ultra pure and sterile water	destilovaná a demineralizovaná voda
DGB	double-gene block	blok dvou proteinů
dH ₂ O	distilled water	destilovaná voda
DNA	deoxyribonucleotic acid	deoxyribonukleotidová kyselina
dNTP	deoxynucleotide triphosphate	deoxynukleosid trifosfát
DPI	day post inoculation	dní po inokulaci
DsRed	red fluorescent protein	červený fluorescenční protein
GB	GoldenBraid	způsob modulárního klonování
GFP	green fluorescent protein	zelený fluorescenční protein
GUS		β-glukuronidáza
HR	hypersensitive response	hypersenzitivní reakce
LB	Luria-Bertani	Luria-Bertani
LIR	long intergenic region	dlouhý intergenový region
MAR	matrix attachment region	MAR sekvence
MP	movement proteins	pohybové proteiny
mRNA	messenger RNA	mediátorová RNA
MS	Murashige and Skoog	Murashige a Skoog
OAS	origin of assembly sequence	sekvence počátku sbalování částic
OD	optical density	optická densita
ORF	open reading frame	otevřený čtecí rámec
PAMP	pathogen-associated molecular patterns	molekulární motivy spojené s patogenitou
PBS	phosphate-buffered saline	fosfátový pufr
PCD	programmed cell death	programovaná buněčná smrt
PCR	polymerase chain reaction	polymerázová řetězová reakce
PLRV	potato leafroll virus	virus svinutky bramboru
PPV	plum pox virus	virus šarky švestky

Primer F	primer forward	primer přímý
Primer R	primer reverse	primer zpětný
PRR	pathogen recognition receptors	receptory rozpoznávající patogeny
PVX	potato virus X	X virus bramboru
PVY	potato virus Y	Y virus bramboru
RIM	root- inducing medium	kořeny indukující médium
RNA	ribonucleic acid	ribonukleová kyselina
RT	reverse transcription	reverzní transkripce
SIM	shoot-inducing medium	výhony indukující médium
SIR	short intergenic region	krátký intergenový region
ssDNA	single-stranded DNA	jednovláknová DNA
ssRNA	single-stranded RNA	jednovláknová RNA
TBE	tris/borate/EDTA buffer	tris/borát/EDTA pufr
T-DNA	transfer DNA	část DNA z Ti-plazmidu
TGB	triple-gene block	blok tří proteinů
Ti-plazmid	tumor inducing plasmid	plazmid z bakterie <i>A. tumefaciens</i> indukující nádory
TMV	tobacco mosaic virus	virus mozaiky tabáku
TRV	tobacco rattle virus	virus kadeřavosti tabáku
TSWV	tomato spotted wilt virus	virus bronzovitosti rajčete
VLP	virus-like particles	viru podobná částice
WDV	wheat dwarf virus	virus zakrslosti pšenice
Wt	wild type	nativní typ
YFP	yellow fluorescent protein	žlutý fluorescenční protein

10 Seznam grafů

Graf 1: Stanovení GUS aktivity v infiltrovaných listech	55
Graf 2: Stanovení DsRed v infiltrovaných listech	55
Graf 3: Stanovení GUS aktivity v rostlinách inokulovaných mechanicky	59
Graf 4: Produkce virové DNA pro GFP v agroinfiltrovaných listech po dobu 10 dní	62

11 Seznam obrázků

Obrázek 1: Schéma genomu viru BeYDV	21
Obrázek 2: Ukázka rozdílu mezi restričními enzymy typu II a IIS	24
Obrázek 3: Ukázka konvence GoldenBraid 2.0	24
Obrázek 4: Ukázka modrobílé selekce	26
Obrázek 5: Ukázka barevného spektra různých fluorescenčních proteinů	28
Obrázek 6: Ukázka plazmidu pUPD1	32
Obrázek 7: Ukázka plazmidu pUPD2	32
Obrázek 8: Ukázka plazmidu pDGB1 α 1	34
Obrázek 9: Ukázka plazmidu pDGB1 α 11 a pDGB1 α 12	34
Obrázek 10: Výsev in vitro rostlin <i>N. benthamiana</i>	39
Obrázek 11: Ukázka špiček s vloženým filtračním papírem pro odběr DNA/RNA	42
Obrázek 12: Ukázka kalusů pěstovaných v in vitro podmínkách	47
Obrázek 13: Výběr transformantů rostlin <i>A. thaliana</i>	48
Obrázek 14: Schématické znázornění použitých konstruktů	50
Obrázek 15: Koexprese dvou fluorescenčních reportérových genů	51
Obrázek 16: Kombinovaný mikroskopický snímek ukazující fluorescenci replikujících se konstruktů 5 DPI	52
Obrázek 17: Nekrózy na listech <i>N. benthamiana</i> – replikující se a nereplikující se vektory	53
Obrázek 18: Schématické znázornění použitých konstruktů pro tvorbu VLP	54
Obrázek 19: Vliv přítomnosti Rep/RepA na tvorbu markerového proteinu u vektoru pGB-G-TMV-GUS-OAS v rostlinách <i>N. benthamiana</i>	56
Obrázek 20: Vliv přítomnosti Rep/RepA na tvorbu markerového proteinu u vektoru pGB-G-TMV-DsRed-OAS v rostlinách <i>N. benthamiana</i>	57
Obrázek 21: Elektroforetický gel zobrazující přítomnost markerového genu uvnitř VLP	58
Obrázek 22: Tvorba VLP obsahující reportérový gen GUS	60
Obrázek 23: Tvorba VLP obsahující reportérový gen DsRed	60
Obrázek 24: Schématické znázornění použitých konstruktů exprimujících GFP	61
Obrázek 25: Mapa konstruktů pro stabilní rostlinnou transformaci	63
Obrázek 26: Mapa konstruktů pro transientní indukibilní expresi reportérových genů GFP a DsRed	64
Obrázek 27: Grafické znázornění transientní exprese s indukibilními promotory 4 DPI u rostlin <i>N. benthamiana</i>	65
Obrázek 28: Schématické znázornění původní binární konvence a její rozšíření	66
Obrázek 29: Možné použití rozšířené metody GB k tvorbě konstruktů pro CRISPR/Cas9	70

12 Seznam tabulek

Tabulka 1: Obecné složení pro restrikčně-ligační reakci	31
Tabulka 2: Obecné podmínky restrikčně-ligační reakce	31
Tabulka 3: Ukázka rozdílů mezi domestikačními plazmidy pUPD1 a pUPD2	31
Tabulka 4: Srovnání destinačních vektorů pDGB1α a pDDGB3Ω	33
Tabulka 5: Ukázka restrikčních enzymů	36
Tabulka 6: Obecný předpis pro kontrolní restrikční reakci	36
Tabulka 7: Přehled vybraných sekvenačních primerů	37
Tabulka 8: Obecné složení směsi pro Polymerázovou řetězovou reakci	44
Tabulka 9: Obecné podmínky pro Polymerázovou řetězovou reakci	44
Tabulka 10: Přehled klonovacích míst po restrikci enzymem BsmBI	49
Tabulka 11: Primery použité pro Reversní transkripci a následnou PCR	58
Tabulka 12: Primery použité pro qPCR	62
Tabulka 13: Srovnání původní binární metody s nově navrženou pětičlennou metodou ...	67

13 Samostatné přílohy

- 1) Hoffmeisterová H, Kratochvilova K, Cerovska N, Slavikova L, Dusek J, Muller K, Fousek J, Plchova H, Navratil O, Kundu JK, Moravec T. 2022. One-enzyme RTX-PCR for the detection of RNA viruses from multiple virus genera and crop plants. *Viruses* 14: 298.
- 2) Dusek J, Plchova H, Cerovska N, Poborilova Z, Navratil O, Kratochvilova K, Gunter C, Jacobs R, Hitzeroth II, Rybicki EP, Moravec T. 2020. Extended set of GoldenBraid compatible vectors for fast assembly of multigenic constructs and their use to create geminiviral expression vectors. *Frontiers in Plant Science* 11.

