

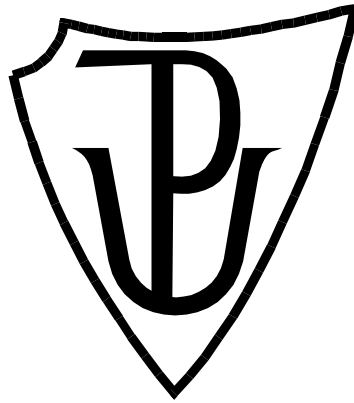
Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2021

Klára Ajglová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



VIGS nástroj pro charakterizaci a validaci funkce genů u rostlin

Bakalářská práce

Klára Ajglová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2021

Vedoucí práce: Mgr. Miroslav Valárik, Ph.D.

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Klára AJGLOVÁ**
Osobní číslo: **R18634**
Studijní program: **B1501 Biologie**
Studijní obor: **Molekulární a buněčná biologie**
Téma práce: **VIGS nástroj pro charakterizaci a validaci funkce genů u rostlin**
Téma práce anglicky: **VIGS a tool for characterization and validation of gene function in plants**
Zadávající katedra: **Katedra buněčné biologie a genetiky**

Zásady pro vypracování

1. Literární rešerše a porovnání genomů a životních cyklů fágů a rostlinných virů.
2. Výběr vhodných kandidátních genů.
3. Výběr a validace linií obilovin vhodných pro úspěšnou infekci rostlinnými viry.
4. Příprava konstruktů pro umlčování genů.
5. Validace infekce a funkce konstruktů.
6. Zpracování literární rešerše pro Bc, vyhodnocení výsledků a jejich interpretace.

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Cheng et al.: Genetic Transformation of Wheat Mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol.* (1997) 115: 971-980

Hensel et al.: Transgene expression systems in the Triticeae cereals. *Journal of Plant Physiology* 168 (2011) 30-44

Johne et al.: Rolling-circle amplification of viral DNA genomes using phi29 polymerase. (2009) *Trends in Microbiology* Vol.17 No.5, 206-2011

Matzeit et al.: Wheat Dwarf Virus Vectors Replicate and Express Foreign Genes in Cells of Monocotyledonous Plants. (1991) *The Plant Cell*, Vol. 3, 247-258

Vedoucí bakalářské práce:

Mgr. Miroslav Valárik, Ph.D.

Ústav Experimentální botaniky, Sokolovská 6, Olomouc

Datum zadání bakalářské práce: 20. dubna 2020
Termín odevzdání bakalářské práce: 31. července 2021

L.S.

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

Bibliografické údaje

Jméno a příjmení autora	Klára Ajglová
Název práce	VIGS nástroj pro charakterizaci a validaci funkce genů u rostlin
Typ práce	bakalářská
Pracoviště	Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UP v Olomouci
Vedoucí práce	Mgr. Miroslav Valárik, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2021
Abstrakt	Houbové patogeny, zejména <i>Blumeria graminis</i> způsobující padlí travní, jsou celosvětovými škůdci hospodářsky významných obilovin jako je ječmen a pšenice. Studium interakce mezi těmito patogeny a jejich hostiteli přináší stále nové poznatky o řadě efektorových proteinů, jež exprimují geny virulence patogenů, a také o specifických genech rezistence, kterými dokáže rostlina tyto proteiny rozpoznat a zabránit infekci. Validace genů virulence a k nim odpovídajících genů rezistence je klíčovým krokem k produkci rezistentních odrůd ječmene. Jedním z nástrojů pro validaci je i použití virových vektorů jako je např. BSMV.
Klíčová slova	ječmen, <i>Barley stripe mosaic virus</i> , geny rezistence, geny avirulence, <i>Blumeria graminis</i> , VIGS
Počet stran	68
Počet příloh	0
Jazyk	český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Klára Ajglová
Title	VIGS a tool for characterization and validation of genes in plants
Type of thesis	bachelor
Department	Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science, Palacký University Olomouc
Supervisor	Mgr. Miroslav Valárik, Ph.D.
The year of presentation	2021
Abstract	Fungal pathogens, most importantly <i>Blumeria graminis</i> , which is responsible for powdery mildew disease, cause worldwide yield losses of economically important cereals, such as barley and wheat. A study of interactions between those pathogens and their hosts still brings up new information about wide range of effector proteins, expressed from pathogens virulence genes as well as about specific resistance genes in hosts, which can recognise these proteins and prevent infection. Validation of virulence genes and corresponding resistance genes represents a key role in production of resistance barely cultivars. One of validation tools is use of viral vectors such as BSMV.
Keywords	barley, <i>Barley stripe mosaic virus</i> , resistance genes, avirulence genes, <i>Blumeria graminis</i> , VIGS
Number of pages	68
Number of appendices	0
Language	czech

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Miroslava Valárika, Ph.D. a za použití citované literatury.

V Olomouci 23. 4. 2021

Klára Ajglová

Tímto děkuji svému vedoucímu Mgr. Miroslavu Valárikovi, Ph.D. za jeho trpělivý a vstřícný přístup a za jeho ochotu mi vždy vše vysvětlit. Dále děkuji svým kolegům, zejména Mgr. Adamu Lamparovi, který mi byl kdykoliv nápomocen. V neposlední řadě děkuji i prof. Ing. Jaroslavu Doleželovi, DrSc., který mi umožnil vykonávat bakalářskou práci na Ústavu experimentální botaniky AV ČR v.v.i. v Olomouci.

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	CÍLE PRÁCE	2
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED	3
3.1	Padlí travní (<i>Blumeria graminis</i>)	3
3.1.1	Životní cyklus	3
3.2	Interakce patogen-hostitel	5
3.2.1	Race-specific rezistence.....	5
3.2.2	<i>Mlo</i> -zprostředkovaná rezistence	6
3.2.3	Geny avirulence.....	6
3.2.3.1	Struktura genů avirulence u <i>Blumeria graminis</i>	7
3.2.4	Identifikace genů avirulence a rezistence	8
3.3	Metody transformace	8
3.3.1	<i>Agrobacterium</i> -zprostředkovaná transformace	8
3.3.2	Biolistická metoda	9
3.4	Metody využívající virové vektory	10
3.4.1	Virus-induced gene silencing (VIGS).....	10
3.4.2	Host-induced gene silencing (HIGS)	11
3.4.3	Virus-mediated gene overexpression (VOX).....	12
3.4.4	Virové vektory	12
3.4.4.1	Barley Stripe Mosaic Virus (BSMV).....	12
3.4.4.1.1	Využití a limitace BSMV	15
3.4.4.2	Foxtail mosaic virus (FoMV).....	16
3.4.4.2.1	Využití a limitace FoMV	16
3.5	Transmise virových konstruktů	16
3.5.1	Abraze listů.....	17
3.5.2	Imbibice.....	17
4	MATERIÁL A METODY	18
4.1	Biologický materiál	18
4.2	Použité chemikálie, kity a roztoky	18
4.3	Seznam použitých přístrojů a zařízení	21
4.4	Použité experimentální a vyhodnocovací postupy	22
4.4.1	Klonování genu <i>iLOV</i> do gamma podjednotek viru BSMV	22
4.4.1.1	Polyakrylamidová elektroforéza	23
4.4.1.2	Extrakce a purifikace plasmidové DNA – Mini Prep	24
4.4.1.3	Restrikční štěpení a defosforylace vektorů a štěpení PCR produktů s genem <i>iLOV</i>	25
4.4.1.4	Fluorimetrické stanovení koncentrace DNA.....	25
4.4.1.5	Ligace reportérového genu <i>iLOV</i> do virových podjednotek	26
4.4.2	Transformace buněk <i>Escherichia coli</i> DH10α elektroporací.....	27
4.4.2.1	Příprava elektrokompetentních buněk.....	27
4.4.2.2	Elektroporace	27

4.4.2.3	Colony PCR pro ověření úspěšnosti transformace.....	28
4.4.2.4	Agarózová gelová elektroforéza PCR produktů.....	28
4.4.2.5	Sekvenace	28
4.4.3	Preparativní extrakce DNA vektorů $\gamma 1:iLOV$ a $\gamma 2:iLOV$	28
4.4.4	Transformace <i>Agrobacterium tumefaciens</i> EHA105.....	29
4.4.5	Agroinfiltrace	30
4.4.5.1	Fluorescenční mikroskopie <i>N. benthamiana</i>	31
4.4.6	Příprava virové podjednotky nesoucí gen avirulence	31
4.4.7	Příprava virového homogenátu z listů <i>N. benthamiana</i>	32
4.4.7.1	Listová abraze.....	32
4.4.7.2	Imbibice semen	33
5	VÝSLEDKY.....	34
5.1	Příprava $\gamma 1$ a $\gamma 2$ podjednotek nesoucích reportérový gen <i>iLOV</i>.....	34
5.1.1	Ověření funkce připravených konstruktů BSMV: <i>iLOV</i> fluorescenční mikroskopii.....	35
5.2	Příprava virového konstruktů nesoucího <i>AVR</i> gen.....	39
5.2.1	Ověření funkce připravených konstruktů s geny avirulence fluorescenční mikroskopii	39
5.2.2	Transmise virových konstruktů do ječných kultivarů.....	42
6	DISKUZE.....	48
7	ZÁVĚR.....	50
8	LITERATURA	51

SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

AVR	avirulence
An	PolyA sekvence
Bgh	<i>Blueria graminis hordei</i>
BM	základní motiv
BMV	<i>Brome mosaic virus</i>
bp	páry bází
BSMV	<i>Barley stripe mosaic virus</i>
CaMV	<i>Cauliflower mosaic virus</i>
CSEPs	kandidátní efektorové proteiny
FECT	vektory odvozené od <i>Foxtail mosaic virus</i>
FoMV	<i>Foxtail mosaic virus</i>
GDD	doména tvořená glycinem a dvěma kyselinami asparagovými
GFP	zelený fluorescenční protein
Hel	helikázová doména
HIGS	hostitelem indukované umlčování genů
chv	geny bakteriálního chromozomu
iLOV	fotoreverzibilní fluorescenční protein
LIC	klonovací místo
LRR	na leucin bohaté repetice
LRSV	<i>Lychnis ringspot virus</i>
LTR	dlouhé koncové repetice
Mt	metyltransferázová doména
NB	vazebné místo na N-konci
PAMP	pathogen-associated molecular patterns
PCR	polymerázová řetězová reakce
PDS	fyteon desaturáza
PSLV	<i>Poa semilatent virus</i>

PTI	PAMP-vyvolaná imunita
PVX	<i>Potato virus X</i>
R	rezistence
REMI	restriction enzyme-mediated integration
RISC	nukleázu obsahující komplex
T-DNA	transferová DNA
TGB	triple gene block
TMV	<i>Tobacco mosaic virus</i>
VIGS	virem indukované umlčování genů
vir	gen virulence
VOX	virem indukovaná nadexprese genů

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Nepohlavní rozmnožování padlí travního.....	4
Obrázek 2: Model RNAi odpovědi hostitele proti dsRNA sekvencím viru.....	11
Obrázek 3: Schéma tříšložkového genomu a sgRNA BSMV viru.	13
Obrázek 4: Struktura TGB2 a TGB3 proteinů.	14
Obrázek 5: Schéma čtyřšložkového BSMV.	15
Obrázek 6: Ověření úspěšnosti transformace bakterií <i>E. coli</i> DH10 α vektory γ 1:iLOV a γ 2:iLOV colony PCR.....	34
Obrázek 7: Šíření virového vektoru BSMV s modifikovanou podjednotkou γ 1:iLOV a exprese fluorescenčního proteinu iLOV v rostlině <i>Nicotiana benthamiana</i>	36
Obrázek 8: Šíření virového vektoru BSMV s modifikovanou podjednotkou γ 2:iLOV a exprese fluorescenčního proteinu iLOV v rostlině <i>Nicotiana benthamiana</i>	37
Obrázek 9: Šíření virového vektoru BSMV s modifikovanou podjednotkou γ 2:GFP a exprese fluorescenčního proteinu GFP v rostlině <i>Nicotiana benthamiana</i>	38
Obrázek 10: Infekce tabáku BSMV s modifikovanou podjednotkou γ 2:iLOV s klonovaným genem AVR _{a1} a exprese fluorescenčního proteinu iLOV v rostlině.....	40
Obrázek 11: Infekce tabáku BSMV s modifikovanou podjednotkou γ 2:iLOV s klonovaným genem AVR _{a10} a exprese fluorescenčního proteinu iLOV v rostlině.....	41
Obrázek 12: Reakce buněk listů ječmene na listovou abrazi.	43
Obrázek 13: Detekce reakce buněk v listové části ječmene vystaveného imbibici.	44
Obrázek 14: Detekce signálu iLOV v ječmenném kultivaru Stirling po agroinfiltraci mezofylu.	45
Obrázek 15: Detekce signálu iLOV v ječmenném kultivaru Lumar po agroinfiltraci mezofylu.	46
Obrázek 16: Snímky listů ječmenů Stirling a Lumar po agroinfiltraci.	47

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Schéma pipetování PCR reakční směsi pro 1 vzorek/20 µl.....	22
Tabulka 2: Navržené primery a jejich použití v této bakalářské práci.....	23
Tabulka 3: Podmínky PCR reakce.	23
Tabulka 4: Reakční směs pro štěpení virových podjednotek a amplifikovaného genu <i>iLOV</i> pomocí enzymu ApaI.....	25
Tabulka 5: Příprava pracovního roztoku pro Qubit.	26
Tabulka 6: Tabulka pro přípravu 20 µl ligační směsi.....	26
Tabulka 7: Příprava agroinfiltračního pufru.	31
Tabulka 8: Příprava reakční směsi pro restrikční štěpení enzymem NcoI.....	32

1 ÚVOD

Ječmen (*Hordeum vulgare*) je travina z čeledi lipnicovitých a je čtvrtou nejhojněji pěstovanou plodinou světa. Je také jednou ze světově nejdůležitějších kulturních plodin. Stejně jako u ostatních obilovin je jeho výnos ovlivňován měnícím se okolním prostředím a stresovými faktory. Ke stresovým faktorům působícím na výnos jsou řazeny houbové patogeny způsobující choroby jako rez či padlí travní. Metody genového inženýrství umožňují produkci rezistentních odrůd, avšak jsou zde určité limity. Patogeny jsou schopny se rychle přizpůsobovat a geny rezistence upravených odrůd bývají překonány geny virulence patogenu. K tomu, aby byly produkovány odolnější odrůdy ječmene, je nutné studovat doposud ne zcela známou funkci genů objevených při nedávném rozluštění genomu ječmene. Toto studium umožňují zejména metody funkční genomiky jako virus-induced gene silencing (VIGS) a další metody využívající virových vektorů. Tato práce se zabývá patogenní houbou padlí travní a studiem jejich genů virulence, které jsou schopny interferovat s geny rezistence hostitele, pomocí metod genového inženýrství využívajících virových vektorů.

2 CÍLE PRÁCE

Cílem teoretické části bakalářské práce je zpracovat literární rešerši na téma padlí travní a metody transformace pomocí virových vektorů se zaměřením na *Barley stripe mosaic virus*.

Cílem praktické části je klonovat gen *iLOV* do virové podjednotky viru BSMV a schopnost replikace takto upraveného viru ověřit pomocí agroinfiltrace na rostlině *Nicotiana benthamiana*. Dalším cílem je vytvořit virový konstrukt s inzerty genů virulence padlí travního AVR_{al} a AVR_{al0} a pomocí transmisních metod tyto geny validovat.

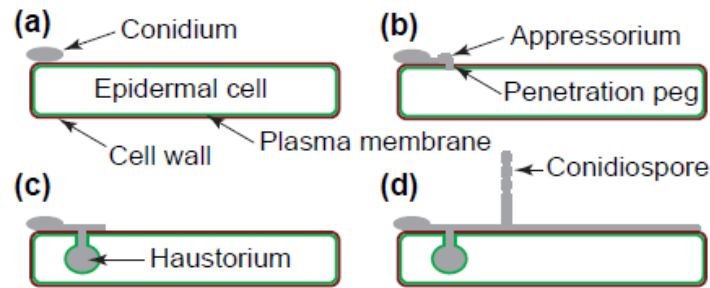
3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Padlí travní (*Blumeria graminis*)

Padlí travní je v celosvětovém měřítku ekonomicky významnou chorobou způsobenou obligátním houbovým patogenem *Blumeria* náležícím do řádu *Erysiphales* a čeledi *Erysiphaceae*. Tato čeleď zahrnuje 13 rodů infikujících přes 650 druhů jednoděložných a více než 9 000 druhů dvouděložných rostlin (Schulze-Lefert a Vogel, 2000) včetně agronomicky významných druhů. Proto došlo u padlí k adaptaci patogenu na určitý hostitelský druh a velice úzké hostitelské specializaci. Například padlí travní je možné rozdělit na osm hostitelských forem (*formae speciales*, ff. spp.), z nichž největší význam pro člověka mají *Blumeria graminis* ff. spp. *hordei*, *tritici*, *secalis* a *avenae*, parazitující na obilovinách. Zbylé čtyři hostitelské formy se vyskytují na planě rostoucích travách. Nakažená rostlina vykazuje typické symptomy bílých práškových povlaků na listech a trpí také nedostatkem živin, které jsou odebírány haustorii houby. Pravděpodobně nejlépe prostudovanou formou je *Blumeria graminis hordei* (*Bgh*) napadající ječmen (Both a Spanu, 2018). Tato kapitola se zaměřuje na zajímavý životní cyklus této houby a interakci s hostitelem.

3.1.1 Životní cyklus

B. graminis se může v průběhu roku rozmnožovat pohlavně i nepohlavně. Nepohlavní rozmnožování (Obr. 1) je typické pro období růstu hostitele a začíná disperzí konidií vzduchem. Spóry (konidie) asi minutu po dopadu na hostitelskou rostlinu začnou vylučovat extracelulární matrix, který jim umožňuje lepší zachycení na rostlině. Vývoj primárního klíčného vlákna začíná během jedné hodiny. Několik hodin poté se vyvíjí druhé (apresoriální) klíčící vlákno, na němž se tvoří hákovitá struktura zakončená penetračními výběžky zvaná apresorium. Penetrační háčky s pomocí enzymatické aktivity pronikají skrze epidermální buněčnou stěnu hostitele, kde se prodlužují v haustoria, která slouží jako vyživovací pletiva dodávající živiny houbě z hostitelské rostliny. Haustoria se prodlužují a větví, vytváří se i sekundární apresoria, která zajišťují penetraci do dalších buněk. Po několika dnech dochází k formaci kruhových kolonií, které jsou tvořeny vláknitými hyfami. Tyto kolonie jsou patrné na povrchu hostitelské rostliny jako bílé až šedé plaky a dávají vzniknout novým sporám. Konidie vznikají postupným dozráváním z konidioforů, které jsou tvořeny vegetativními hyfami. K uvolnění konidií z konidioforů dochází mechanickými vlivy, větrem či pohybem listů, po uvolnění jsou konidie přenášeny větrem. Zráním konidioforů se vytváří obrovské množství konidií, které jsou následně šířeny buď jednotlivě, nebo v řetězcích a na rozdíl od jiných hub nepotřebují ke klíčení vodu. Konidie se mohou šířit do vzdálenosti až několika stovek kilometrů v průběhu sezóny (Glawe, 2008).



Obrázek 1: Nepohlavní rozmnožování padlí travního (převzato ze Schulze-Lefert, 2000).

a) Konidie je vzduchem transportována na pletivo rostliny a začíná vylučovat extracelulární matrix. b) Začíná vývoj primárního klíčného vlákna a následně i apresoriálního klíčného vlákna, na kterém se tvoří apresorium s penetračními háčky. Apresorium následně proniká skrze buněčnou stěnu do hostitelské buňky. c) Apresorium se prodlužuje a vzniká haustorium. d) Z haustoria vyrůstají vlákna, která tvoří na povrchu pletiva kolonie, ty dozrávají v konidiofory a z konidioforů poté vznikají nové konidie.

Patogen se ale může množit i pohlavně, a to pomocí askospor, která se vyvíjí v chasmothécium (kleistothécium). Pohlavní rozmnožování je iniciováno tvorbou gametangií. Samčích gametangií (antheridií) a samičích gametangií (askogonií). Následuje splývání cytoplazmatických membrán gametangií, po kterém dochází k přesunu jádra z antheridia do askogonia. Výsledkem tohoto procesu je buňka zvaná dikaryon tvořená dvěma jádry. Po fúzi jader vzniká zygota, která vyrůstá v uzavřený askokarp zvaný chasmothécium. Zralé chasmothécium je tmavě zbarveno. V chasmothécium vznikají meiotickým dělením vřeska s haploidními askosporami. Chasmothécia jsou tvořena zejména na konci vegetačního období a slouží k přečkání nepříznivých podmínek jako jsou vysoké teploty, sucho nebo příliš nízké teploty. Protože je padlí travní obligátní parazit, musí být schopno přežít období, kdy není k dispozici infikovatelná tkáň hostitele. V chasmothécii dochází ke genetické rekombinaci, tak mohou vznikat nové kombinace genů virulence, které budou popsány níže. Další možností přečkávání nepříznivých období je tvorba dormantních pupenů či tvorba mycelií na přetrvávajících listech hostitele. Při těchto dvou variantách nedochází ke genetické rekombinaci (Glawe, 2008).

Během životního cyklu dochází k interakci mezi patogenem a hostitelem. Jakmile se primární klíčící vlákno zachytí na buněčné stěně hostitele, začne nasávat vodu a vylučovat do rostliny efekторы neboli efektorové proteiny. Efekторы jsou důležité nejen pro vývoj haustoria, ale také pro překonání prvotních obranných reakcí hostitele. Produkce efektorových proteinů pokračuje, jakmile penetrační háčky proniknou skrze buněčnou stěnu a začne se formovat haustorium. V této chvíli může dojít k rozpoznání patogenu hostitelem a k zastavení vzniku haustoria (Nowara *et al.*, 2010). Jako efekторы se označují geny virulence. Geny virulence mohou být rozpoznávány buď přímo, nebo nepřímo proteiny rezistence (R), které se nachází v rostlině. Proteiny virulence rozpoznávány proteiny rezistence, se nazývají proteiny avirulence (AVR) (Petit-Houdnot a Fudal, 2017). Interakce mezi geny avirulence a geny rezistence vede k lokální hypersenzitivní reakci rostliny, která má často za následek buněčnou smrt v místě infekce, a tím dojde k zabránění šíření patogenu (Nowara *et al.*, 2010). Na základě různých reakcí hostitele na pronikající patogen je možné definovat různé typy interakce patogen-hostitel.

3.2 Interakce patogen-hostitel

Již více než před 50 lety navrhl Van Der Plank (1968) rozlišit horizontální a vertikální rezistenci. Dnes je již prokázáno, že rostliny skutečně disponují dvěma obrannými mechanismy. První mechanismus zajišťuje ochranu vůči všem patogenům a je založen na rozpoznání základních složek patogenu nazývaných pathogen-associated molecular patterns (PAMP). Tento mechanismus dokáže zmírnit infekci nebo patogen zcela usmrtit pomocí tzv. PAMP-vyvolané imunity (PTI). Druhým mechanismem je mechanismus interakce gen-proti-genu, který se vyvinul v průběhu evoluce. Nejdříve došlo k vytvoření efektorových genů u patogenů, které způsobovaly umlčení PTI. Rostliny reagovaly na tuto změnu vytvořením nových, specifitějších a sofistikovanějších genů rezistence, které byly schopné rozpoznávat geny virulence (Rouxel a Balesdent, 2010). Jak již bylo zmíněno, geny virulence a geny rezistence fungují na principu hypotézy gen-proti-genu, která předpokládá, že pro každý gen kontrolující rezistenci v hostiteli, existuje gen virulence korespondující s tímto genem v patogenu (Bourras *et al.*, 2016). To má za následek specifitu rozpoznání a odpovědi hostitele na rasu patogenu tzv. rasově specifická rezistence (Race-specific resistance).

3.2.1 Race-specific resistance

Race-specific resistance proti padlí travnímu byla poprvé popsána v 30. letech 20. století v Evropě a USA. Později byla rozsáhle studována i v Argentíně a Japonsku. Evropské druhy jarního a zimního ječmene nesou několik race-specific genů, z nichž nejčastějším je gen *Mla* (Jørgensen a Wolfe, 1994).

Genovým lokusem, který kóduje nejvíce R genů v ječmenu, je lokus *Mla* (Schulze-Lefert a Vogel, 2000). Tento lokus se nachází na chromozomu 5. Na tomto chromozomu se nachází také lokusy pro geny rezistence *Mlat*, *MIGa*, *Mlk*, *Mlnn* a *Mlra* (Jørgensen a Wolfe, 1994). *Mla* lokus obsahuje více než 30 genů rezistence, z nichž prvním izolovaným *Mla* genem rezistence byl *Mla-1*. Tento patří mezi tzv. NB-LRR geny. NB-LRR geny dostali svůj název podle toho, že kódují protein s nukleotidovým vazebným místem na N-konci (NB) a na C-konci kódují repetice bohaté na leucin (Leucin Rich Repeats – LRRs). NB-LRR proteiny jsou převládající skupinou rostlinných R proteinů a podílí se na rezistenci proti široké škále rostlinných patogenů. Rozpoznání patogenu je umožňováno LRR repeticemi, pro které je typická sekvenční variabilita. *Mla-1* gen kóduje protein o velikosti 109 kD, který je tvořen sedmi LRR jednotkami. *Mla-1* protein je tvořen v cytoplazmě, z toho je zřejmé, že k rozpoznání patogenu dochází intracelulárně. Patogen tedy musí transportovat své AVR proteiny přes rostlinnou membránu, aby mohlo dojít k rozpoznání patogenu hostitelem. Smrt hostitelské buňky během *Mla*-zprostředkované rezistence nastává během 24 hodin od inokulace a proniknutí patogenu skrze buněčnou stěnu. Několik hodin před buněčnou smrtí je aktivována signální dráha, díky které se v buňce těsně pod houbovým apresoriem akumuluje peroxid vodíku (H₂O₂), který následně zaplňuje celou infikovanou buňku. Buňka poté odumírá řízenou buněčnou smrtí. Některé *Mla* geny potřebují ke své funkci alespoň další dva pomocné

geny *Rar1* a *Rar2*. Naopak některé jiné *Mla* geny fungují nezávisle na *Rar* genech. Mezi takové geny se řadí i již zmíněné *Mla-1* (Schulze-Lefert a Vogel, 2000).

3.2.2 *Mlo*-zprostředkovaná rezistence

V letech 1937–1938 byly uskutečněny německé expedice do Etiopie, kde bylo sesbíráno velké množství semen ječmene různých linií. Pouze dvě linie vykazovaly výjimečnou rezistenci ke všem testovaným *Bgh* izolátům. Byl tak nalezen zcela nový typ rezistence na široké spektrum patogenů, která byla zprostředkovávána jediným recesivním genem *mlo*, je tedy tzv. monogenní. Na cytologické úrovni dochází k přerušení infekce během procesu penetrace patogenu přes epidermální buněčnou stěnu. Buňky nemusejí podstoupit řízenou smrt (Schulze-Lefert a Vogel, 2000). Další zvláštností této rezistence je, že neodpovídá systému gen-proti-genu a liší se i její mechanismus (Jørgensen a Wolfe, 1994).

Mlo lokus se nachází na dlouhém rameni 4. chromozomu ječmene. Při *Mlo* rezistenci dochází přímo pod plochou styku houby a rostliny k řízenému zesílení buněčné stěny. Tento proces zamezuje proniknutí penetračního háčku houby přes rostlinnou membránu (Jørgensen a Wolfe, 1994). K tomu, aby byly *mlo* alely funkční, jsou nezbytné geny *Ror1* a *Ror2*. Mutace těchto genů vedou u *mlo* rostlin ke ztrátě rezistence a schopnosti vytvářet silnější buněčnou stěnu (Freialdenhoven et al., 1996). Rostliny disponující *Mlo* rezistencí často vytvářejí nekrotické či chlorotické skvrny na listech, to je způsobeno pleiotropním efektem *mlo* genu. Na vývoj těchto nekrotů má velký vliv prostředí a také celkový genotyp *Mlo* rezistentní rostliny. Například některé *Mlo* rezistentní odrůdy se specifickým genotypem pěstované v Etiopii tvoří nekrotů, avšak jakmile jsou pěstovány v Evropě, nekrotů tvoří. Jiné genotypy zahrnující i kultivary *Mlo* rezistentního evropského jarního ječmene tvoří nekrotů jen zřídka. Tvorba nekrotů je nežádoucím jevem, protože snižuje výnos a kvalitu sklizně (Jørgensen a Wolfe, 1994). *Mlo* rezistence je v Evropě od roku 1972 využíváno ve šlechtitelství k přípravě kultivarů jarního ječmene (Jørgensen, 1992). Pro zimní odrůdy se využití *Mlo* rezistence nedoporučuje, protože by mohlo dojít k přežití patogenu v zimních obdobích a jeho přenosu i na jarní kultivary, což by mohlo vyústit v adaptaci patogenu a ke snížení efektivity rezistence (Dreiseitl, 2017).

3.2.3 Geny avirulence

Produkty *Avr* genů jsou faktory schopné interakce s obrannými mechanismy rostlin v souladu s modelem gen-proti-genu. Mohou je produkovat nejen houby, ale také bakterie a viry. Interakce gen-proti-genu byla poprvé studována v roce 1946 H. H. Florem. Rozpoznání genu virulence vede v rostlině k hypersenzitivní reakci (Bonas, 1998). V současnosti bylo identifikováno nejméně 35 *AVR* genů nacházejících se u vláknitých hub napadajících širokou škálu zemědělsky významných plodin (Bourras et al., 2016). Ze všech těchto patogenů bylo nejvíce *AVR* genů detekováno právě v *Bgh* (Skamnioti et al., 2008).

Většina AVR proteinů je rozpoznávána jen jedním R proteinem, avšak může docházet k tomu, že více R proteinů rozpoznává tentýž AVR protein, jak ukázala studie Bourrase *et al.* (2016). Dále se mohou paralogy *R* genů exprimující tytéž R proteiny nacházet na různých chromozomech, přičemž ale rozpoznávají tentýž AVR protein. Dalším případem může být, že produkt AVR genu jednoho druhu, potlačí rozpoznání produktu AVR genu jiného druhu. V tomto případě dochází k tomu, že AVR protein, který je za normálních okolností rozpoznáván specifickým R proteinem, nebude R proteinem rozpoznán kvůli přítomnosti jiného AVR proteinu (Petit-Houdenot a Fudal, 2017).

3.2.3.1 Struktura genů avirulence u *Blumeria graminis*

Houbové AVR geny jsou studovány již několik dekad. Poprvé byla struktura houbového AVR genu zjištěna u *Cladosporium fulvum*, které produkuje gen *avr9*, v roce 1991 (van Kan, 1991). V posledních letech je studováno stále více genů avirulence a rezistence. Hledají se podobnosti v jejich strukturních motivech, které by usnadnili jejich identifikaci. Většina genů avirulence kóduje typický efektorový protein o velikosti 63–314 aminokyselin s předurčeným signálním peptidem k sekreci. Na rozdíl od houbových AVR proteinů, které jsou vylučovány houbami infikující rostlinu skrze hyfy, a které ve svých sekvencích obsahují velké množství cysteinů, jsou AVR proteiny hub napadající rostlinu skrze haustoria, jak je tomu u *B. graminis*, tvořeny jen malým množstvím cysteinů (Bourras *et al.*, 2016). Efektorový protein je vylučován haustorii houby při infekci rostliny a nese speciální Y/F/WxC-motiv na N-terminálním konci. První aminokyselinou motivu je vždy tyrosin, následuje fenylalanin nebo tryptofan a poslední je vždy cystein. Ačkoliv je celková podobnost v sekvencích efektorových proteinů padlí travního malá, sdílejí tyto proteiny podobné exon-intron struktury, což naznačuje, že během evoluce vznikaly společně. Motiv je důležitý pro správnou funkci efektorového proteinu (Godfrey *et al.*, 2010) a nachází se u většiny proteinů, které jsou souhrnně nazývány jako kandidátní efektorové proteiny (CSEPs). Jedná se o potenciální proteiny avirulence a v genomu *Blumeria graminis* jich Pedersen *et al.*, 2012 identifikoval 491. CSEPs často nesou cystein nacházející se blízko C-konce (cca 10 aminokyselin od C-konce) a disponují krátkými ORF (Pedersen *et al.*, 2012).

Mapováním genomu *B. graminis hordei* byly nalezeny dva AVR geny, *Avr_{kl}* a *Avr_{a10}* patřící do multigenové rodiny (Ridout *et al.*, 2006). Tyto dva geny avirulence postrádají signální peptidy a bylo prokázáno, že jsou deriváty replikačního počátku ORF1 non-LTR retrotranspozonů. ORF1 kóduje protein, který umožňuje přenos retrovirových částí do jádra (Bourras *et al.*, 2016). Dalšími dvěma studovanými a popsány AVR geny jsou *AVR_{a22}* a *AVR_{a12}*. Lokusy, kde se tyto geny nachází, jsou tvořeny velkým množstvím repetitivní DNA tvořenou dlouhými repetitivními sekvencemi a zkrácenými LTR retrotranspozony. AVR geny se také často nachází v blízkosti mobilních elementů nebo telomer, to jim umožňuje adaptaci a rychlý vývoj (Skamnioti *et al.*, 2008).

3.2.4 Identifikace genů avirulence a rezistence

Existuje řada postupů, které vedou k identifikaci genů avirulence. Nejpřímočařejší metodou je izolace proteinu z extracelulárních tekutin infikované rostliny následovaná sekvenací proteinu. Druhou metodou je získání houbové DNA sekvence, která je specificky exprimována v hostiteli, pomocí subtrakčních metod s využitím cDNA knihoven (Rep, 2005). Možné jsou také postupy využívající techniky restriction enzyme-mediated integration (REMI). Nicméně výše zmíněné metody jsou poměrně pracné a jejich úspěšnost je nízká (Stergiopoulos a de Wit, 2009). Další možností identifikace je využití genetického mapování. Tímto způsobem lze identifikovat velké množství potenciálních genů avirulence, které je následně třeba analyzovat (Rep, 2005). Ačkoliv genetické mapování ukrývá velký potenciál k hledání kandidátních efektorových proteinů, musí být funkce těchto proteinů dodatečně experimentálně ověřena transformačními metodami např. pomocí nadexprese či genového umlčování v houbovém izolátu (Stergiopoulos a de Wit, 2009), nebo pomocí metod transformace (Houterman *et al.*, 2008).

3.3 Metody transformace

Transformace je proces, ve kterém se vloží cizorodá DNA do rostliny, tato DNA může pocházet buď z jiné nepříbuzné rostliny, nebo dokonce může pocházet i z úplně jiného organismu. Tento proces se provádí zejména za účelem zjištění a ověření funkce genů. Avšak dá se použít i na vylepšení vlastností zvířat a zemědělských plodin, které tak mohou nabýt například rezistence vůči patogenům či škůdcům nebo se mohou zvýšit jejich kvalita a výnos.

Metody, jakými lze cizorodou DNA do rostlin vpravit, dělíme na přímé a nepřímé. Nejznámější a zřejmě také nejpoužívanější metodou přenosu je nepřímá metoda zprostředkovaná bakterií *Agrobacterium tumefaciens*. Mezi přímé metody patří tzv. biolistické metody, které využívají bombardování vzorku mikročásticemi, dalšími metodami jsou elektroporace nebo mikroinjekce (Barampuram a Zhang, 2010).

3.3.1 *Agrobacterium*-zprostředkovaná transformace

Metoda *Agrobacterium*-zprostředkované transformace byla vyvinuta v 80. letech 20. století (Bradshaw, 2016) a její hlavní výhodou je možnost použití jak u dvouděložných, tak částečně i u jednoděložných rostlin. Právě neschopnost *A. tumefaciens* infikovat některé jednoděložné rostliny je nevýhodou této metody. Neopomenutelnou výhodou této metody je také možnost stabilního přenosu velkých segmentů DNA (Barampuram a Zhang, 2010).

Agrobacterium tumefaciens je gram-negativní bakterie, která způsobuje nádorová onemocnění v rostlinných pletivech. Schopnost způsobovat tato onemocnění je umožněna přítomností Ti plazmidu, který obsahuje transferovou T-DNA. Tato T-DNA je tvořena geny onkogeneze a geny zodpovědnými za syntézu auxinů a cytokininů, právě tyto fytohormony jsou zodpovědné za vývoj nádoru. Dále T-DNA

nese geny pro produkci opinů (Barampuram a Zhang, 2010). Důležitou součástí plazmidů *Agrobacteria* je systém nezbytný pro produkci a transport T-DNA do hostitelské buňky. Tento systém je tvořen proteiny, které jsou kódovány geny bakteriálního chromozomu (*chv*) zodpovědnými za transport T-DNA a geny virulence Ti-plazmidu (*vir*), ty jsou zodpovědné za tvorbu T-DNA a nachází se v oblasti *vir* genového regionu (Tzfira a Citovsky, 2006).

Mechanismus genového transportu z *A. tumefaciens* do hostitelské buňky zahrnuje několik kroků. Proces je iniciován příjmem specifických signálů ve formě fenolických sloučenin od hostitelské buňky. Transfer T-DNA také podporují zranění či rány na hostitelské rostlině, které způsobují produkci fenolických látek v rostlině v rámci reparace buněk. Signál z buněk je přijímán *virA* virulentním genem *A. tumefaciens* a aktivuje kaskádu dalších *vir* genů. VirD1 a virD2 proteiny se napojují na pravou a levou hranici dvouvlákna T-DNA a umožňují tak vznik jednovláknové T-DNA, tzv. T-vlákná, které je následně přenášeno přes kanál, který tvoří *Agrobacterium* VirD4 a VirB proteinový komplex. T-vlákná je v buňce chráněno před degradací proteinem VirE2, který jej obaluje (Barampuram a Zhang, 2010). Následně vlákno vstupuje do jádra, kde je změněno na dvouvláknovou formu a začleňuje se do genomu hostitele (Bradshaw, 2016).

3.3.2 Biolistická metoda

Biolistická metoda neboli mikroprojektilové bombardování je jednou z přímých metod genového přenosu pro vývoj transgenních rostlin, která byla vyvinuta v roce 1987 (Bradshaw, 2016). Jedná se o metodu, při níž jsou na zlaté či wolframové nosiče navázány fragmenty DNA. Pomocí zařízení nazývaného genové dělo jsou následně mikročástice vystřelovány na vzorek rostlinné tkáně. Mikročástice následně pronikají přes rostlinnou membránu a dopravují DNA fragmenty do buněk (Barampuram a Zhang, 2010).

Nespornou výhodou metody je schopnost přenosu cizorodé DNA velkých velikostí (až 150 kb) do jakékoli buňky či tkáně, jejichž buněčná stěna a cytoplazmatická membrána mohou být penetrovány, ať už se jedná o jednoděložné či dvouděložné rostliny. Další výhodou je přenos více transgenů, kterého je možné dosáhnout fúzí genů v rámci jednoho plazmidu, který je následně bombardován do cílové tkáně (Barampuram a Zhang, 2010). Naopak se ukazuje, že při použití *Agrobacterium*-zprostředkované transformace, dochází ke stabilnější expresi transformovaných genů. Při biolistické metodě také dochází k integraci velkého množství DNA fragmentů do cílové buňky, přičemž může docházet i k jejich přestavbám, to je samozřejmě nežádoucí. U *Agrobacterium*-zprostředkované transformace dochází k inzerci menšího počtu transgenů, přičemž jen zřídka dochází k přestavbě vložených fragmentů (Travella *et al.*, 2004).

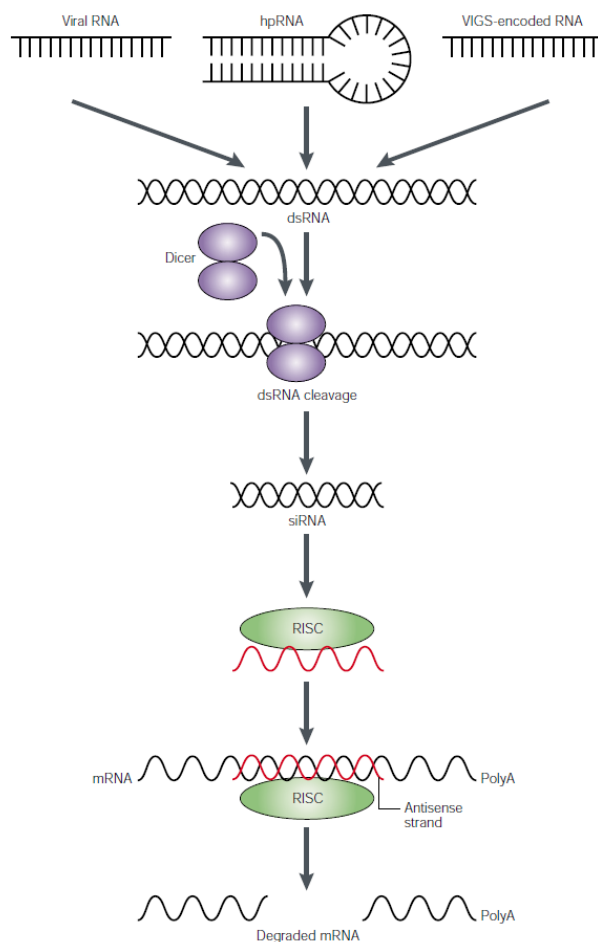
3.4 Metody využívající virové vektory

Tato skupina metod využívá virů jako virových vektorů. Viry disponují značnými výhodami. Jsou malé, snadno se s nimi manipuluje a procesy jejich životního cyklu jsou poměrně jednoduché. Další výhodou použití virů jako vektorů je rychlá a efektivní transformace. Jako virové vektory lze použít řadu virů s různými okruhy hostitelů. Může se jednat o bakteriofágy, savčí retroviry či rostlinné viry. Virové vektory jsou geneticky modifikovány k expresi heterologních proteinů (Lico *et al.*, 2008). Tyto metody umožňují jak umlčování genů (virus-induced gene silencing – VIGS), tak jejich nadexpresi (virus-mediated gene overexpression – VOX).

3.4.1 Virus-induced gene silencing (VIGS)

VIGS byla poprvé aplikována u *Nicotiana benthamiana* za použití virového vektoru *Tobacco mosaic virus* (TMV) k potlačení fytoen desaturázy (PDS), která je nezbytná pro produkci karotenoidů chránících chlorofyl před ztrátou pigmentu (Kumagai *et al.*, 1995). Od té doby byla vytvořena řada virových vektorů využitelných pro analýzu funkční genomiky u dvouděložných rostlin. Tato technika má velký potenciál v umlčování specifických genů a byla přizpůsobena již pro širokou škálu rostlinných druhů, zejména pro ty, které je obtížné transformovat. VIGS je také účinným nástrojem funkční genomiky při studiu genů a jejich funkcí zejména u jednoděložných rostlin významných pro zemědělství, tedy u ječmene (*Hordeum vulgare*), kukuřice (*Zea mays*) či pšenice (*Triticum aestivum*) (Becker a Lange, 2010). Avšak, pro studium jednoděložných rostlin pomocí VIGS je příprava vektorů složitější. Nejčastěji je pro VIGS u obilovin využíváno vektorů *Barley stripe mosaic virus* (BSMV) a *Brome mosaic virus* (BMV) (Jackson *et al.*, 2009).

Genomy většiny virů napadajících rostliny tvoří jednovláknová RNA, která je po proniknutí do hostitelské buňky uvolněna z proteinového pláště. Genomická RNA viru je následně replikována RNA-depedentní RNA polymerázou kódovanou virem a dochází k produkci sense a antisense RNA. Tyto dvě RNA mají tendenci hybridizovat a vytvářet dvouvláknovou RNA (dsRNA). Dvouvláknová RNA poté vyvolá RNAi odpověď hostitele proti sekvencím dsRNA viru. Tento proces probíhá tak, že dsRNA je rozkládána na cca 21 nukleotidů dlouhé fragmenty, které jsou označovány jako malé interferující RNA (siRNA). Tyto siRNA jsou začleněny do nukleázu-obsahujícího komplexu, tzv. RISC, který rozkládá mRNA komplementární k jednovláknovému siRNA v komplexu (Waterhouse a Helliwell, 2003). Tohoto procesu (Obr. 2) je využíváno právě při technice VIGS. Replikací vzniká dsRNA, která je štěpena na siRNA v infikované buňce tak, aby jednotlivé fragmenty odpovídaly sekvenci virového genomu. Pokud je do genomu viru vložen fragment, odpovídá siRNA i vloženému fragmentu a navíc, jestliže vložený fragment je původem genem, nebo částí genu hostitelské rostliny, bude RISC cílen jak na virovou RNA, tak na mRNA hostitele. Výsledkem bude nepřítomnost nebo výrazné snížení množství proteinu kódovaného genem, jehož mRNA byla vložená do virového vektoru (Lu, 2003).



Obrázek 2: Model RNAi odpovědi hostitele proti dsRNA sekvencím viru (převzato z Waterhouse a Helliwell, 2003).

Dvouvláknová RNA viru replikované virové RNA, vlásenkové RNA (hpRNA) nebo replikovaná RNA využívána právě v technice VIGS, je zpracována dicerem na siRNA. Tyto siRNA, konkrétně jejich antisense-vláknou, jsou následně začleněny do RISC komplexu. RISC komplex štěpí mRNA komplementární antisense-siRNA vláknou a zajišťuje tak degradaci mRNA.

3.4.2 Host-induced gene silencing (HIGS)

Technika host-induced gene silencing (HIGS) se vyvinula z metody VIGS. HIGS je podobně jako VIGS metoda založená na procesu RNA interference. Avšak na rozdíl od VIGS, při které dochází k vyvolání RNAi-zprostředkované přirozené imunity rostliny k obraně proti virům pomocí vložení genového inzertu do virového vektoru, je u HIGS využíváno vložení obrácené sekvence genu nacházejícího se v genomu patogenu do genomu rostliny. Tato sekvence je následně přepisována do siRNA cílenou na gen v patogenu. Výsledkem je umlčení tohoto genu. HIGS vektory byly konstruovány tak, aby přenášely, jak dlouhé dsRNA, tak vlásenkové sekvence v podobě obrácených sekvencí genu nebo obrácených promotorových sekvencí do rostlinného genomu. Metody HIGS je využíváno k produkci transgenních rostlin rezistentních proti řadě patogenů, ať už se jedná o hmyz, houby či viry, a to metodou šetrnou k životnímu prostředí (Qi *et al.*, 2019).

3.4.3 Virus-mediated gene overexpression (VOX)

Metoda virus-mediated gene overexpression (VOX) je další z metod využívajících virových vektorů, která umožňuje rychlou nadexpresi heterologního proteinů v rostlině. Takto byla upravena již řada rostlinných virů, zejména těch s positive-sense ssRNA genomy, aby byly schopny exprese cizorodých proteinů v rostlinách. Dnes nejčastěji používaným systémem, který umožňuje využití VOX, je nadexprese proteinů pomocí *Potato virus X* (PVX) ve dvouděložné modelové rostlině *N. benthamiana*. Hlavní využití VOX je při výzkumech metabolických drah v rostlinách, funkční charakterizaci onemocnění hostitelské rostliny, genů rezistence a patogenních efektorových proteinů a v neposlední řadě také při studiích zabývajících se lokalizací proteinů v buňce. VOX však nese jednu zásadní limitaci, nedovoluje totiž přenos větších inzertů než 150 aminokyselin, to značně omezuje škálu možných aplikací VOX v praxi (Bouton *et al.* 2018).

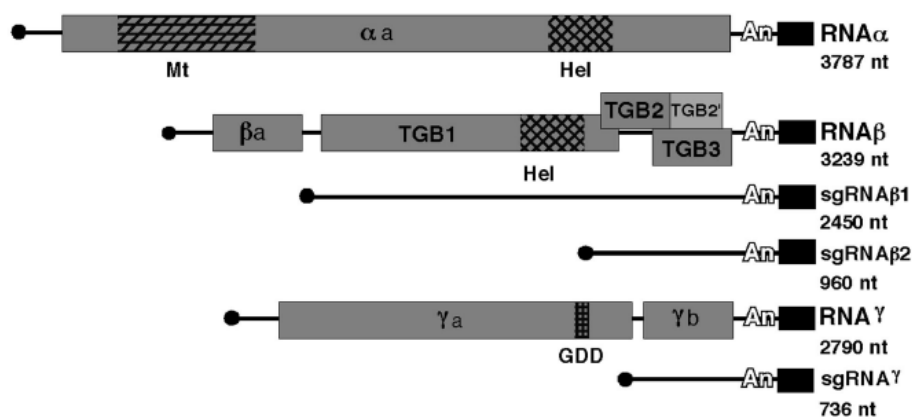
3.4.4 Virové vektory

Rostlinné viry jsou používány k přenosu fragmentů, např. genů do rostlin, již od 80. let 20. století. Dříve byl používán zejména virový vektor *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) z rodiny *Caulimoviridae*, a to hlavně proto, že je tvořen dvouvláknovou DNA. Nevýhodou použití tohoto viru byla jeho malá kapacita a také omezené množství virové DNA, která by mohla být odstraněna, aniž by to ovlivnilo nezbytné funkce viru (Lico *et al.*, 2008). Zmenšování virového genomu se provádí za účelem ochrany před nekontrolovatelným šířením a udržením virového vektoru v prostředí (Liu a Kearney, 2010). Technický pokrok v molekulární biologii, zejména vytváření cDNA z RNA templátu, umožnil používání jako virových vektorů i virů tvořených jednovláknovou RNA. Viry s genomem sestávajícím z jednovláknové RNA tvoří většinu rostlinných virů (Lico *et al.*, 2008). K ssRNA virům patří i *Barely stripe mosaic virus* (BSMV), který je dnes populárním virovým vektorem pro VIGS v pšenici (*T. aestivum*) a ječmenu (*H. vulgare*). Důvodem pro popularitu BSMV je detailní prostudování jeho genomu a molekulárních a biologických funkcí (Lee *et al.*, 2012).

3.4.4.1 Barley Stripe Mosaic Virus (BSMV)

BSMV je virus patřící do rodiny Hordeivirů. Hordeiviry jsou unikátní skupinou RNA virů tvořenou třemi členy. Kromě BSMV jsou do této skupiny řazeny *Poa semilatent virus* (PSLV) a *Lychnis ringspot virus* (LRSV). Viriony hordeivirů mají helikázovou strukturu složenou z bílkovinných podjednotek obalujících ssRNA, jejíž velikost se mezi jednotlivými zástupci liší. Přenos BSMV a LRSV je zajištěn jak semeny, tak pylem, avšak pro PSLV nebyl přenos semeny zaznamenán (Jackson *et al.*, 1989). V této bakalářské práci je pracováno s BSMV virem, který je detailně rozebrán dále.

Analýza genomu BSMV ukázala, že je virus složen ze tří genomických RNA (Obr. 3) (Jackson *et al.*, 1989) s označením RNA α (3,8 kb), RNA β (3,3 kb) a RNA γ (2,8 nebo 3,2 kb) (Solovyev *et al.*, 1996), které jsou tvořeny positive-sense vlákny a dohromady kódují sedm hlavních proteinů (Lee *et al.*, 2012). Tyto proteiny jsou exprimovány přímo z genomické RNA. Expresse TGB pohybových proteinů je zajišťována subgenomickou (sg) RNA β 1 a sgRNA β 2, které vznikají během patogenez. TGB1 je exprimován sgRNA β 1 a TGB2 a TGB3 jsou exprimovány sgRNA β 2. Na cystein bohatý protein patogenez γ b je exprimován sgRNA γ . Každá z pozitivních RNA disponuje ve svých nekódujících regionech 7-methylguanidinovou čepičkou na 5'konci, která je nezbytná pro infekčnost BSMV a obsahuje také tRNA iniciální sekvenci na 3'konci (Jackson *et al.*, 2009).

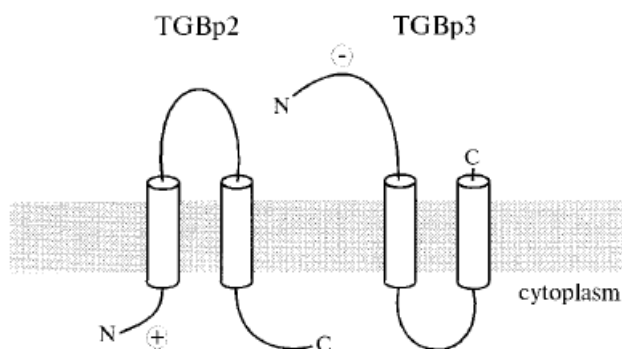


Obrázek 3: Schéma tříšložkového genomu a sgRNA BSMV viru (převzato z Bragg *et al.*, 2004).

Plné kroužky na levé straně genomů reprezentují čepičku na 5'konci, kterou disponují všechny genomické a subgenomické RNA. Všechny 3'konce jsou zakončeny UAA kodonem, za kterým následuje PolyA sekvence (An). Genomické RNA α , RNA β a RNA γ jsou na tomto schématu znázorněny pomocí obdelníků. RNA α kóduje α a protein, který je nutný pro replikaci viru. α a protein nese helikázové (Hel) a metyltransferázové (Mt) domény. Genomická RNA β kóduje pět replikačních počátků. Počátek obalového proteinu β a a překrývající se počátky TGB proteinů TGB1, TGB2 a TGB3. TGB1 na rozdíl od TGB2 a TGB3 nese helikázovou doménu (Hel). Genomická RNA γ je bicistronická a jsou z ní translační tvořeny proteiny γ a, obsahující GDD doménu, a γ b, jež je bohatý na cystein a je exprimován ze sgRNA γ .

Enkapsidaci a transport BSMV zajišťuje genom RNA β , ten kóduje β a kapsidový protein a také tzv. triple gene block (TGB), ze kterého jsou exprimovány proteiny nezbytné pro transport viru mezi buňkami hostitele. TGB sestává ze tří vzájemně se překrývajících čtecích rámců pro geny TGB1, TGB2 a TGB3 (Solovyev *et al.*, 1996). TGB1 se díky sedmi konzervovaným helikázovým motivům na C-terminálním konci účastní homologních interakcí viru v hostitelské buňce. Jedná se o 50–63 kDa velký protein s N-terminálním koncem obsahujícím dvě pozitivně nabitě oblasti bohaté na zbytky lysinu a argininu, jež se jeví jako důležité pro pohyb viru na velké vzdálenosti. TGB1 se vyznačuje vazebnou aktivitou jak k ssRNA, tak k dsRNA, na které se může vázat hned několika vazebnými místy nacházejícími se zejména v C-terminální oblasti. Část TGB1 proteinu složená z konzervovaných motivů I, Ia a II je nezbytná pro ATP hydrolýzu (Jackson *et al.*, 2009). TGB1 také heterologně interaguje s TGB3, ale ne s TGB2 (Lim *et al.*, 2008). TGB2 protein se vyznačuje největší sekvencí podobností

mezi TGB proteiny Hordeivirů. Je tvořen vláknem prostupujícím membránou, jehož hydrofobní N a C-konce směřují do cytoplazmy a centrální hydrofilní smyčka, která slouží k oddělení hydrofobních částí, je vystavena extracelulární části membrány. Celá struktura tak vytváří tvar písmene V (Obr. 4) (Solovyev *et al.*, 1996). TGB2 interaguje s TGB3. TGB3 protein je stejně jako TGB2 exprimován ze sgRNA β 2. Translace proteinu začíná po tzv. leaky scanning 40S ribozomální podjednotky za TGB2 AUG. Tímto mechanismem je produkováno desetkrát méně TGB3 proteinu než TGB2 proteinu. TGB3 proteiny jsou nejméně konzervovanými proteiny ze skupiny TGB proteinů. Jejich velikost se pohybuje mezi 18–24 kDa (Jackson *et al.*, 2009). Jsou tvořeny dvěma transmembránovými doménami, které podobně jako u TGB2 zajišťují vznik hydrofilní smyčky, v tomto případě je však smyčka orientována do cytoplazmy a hydrofobní N a C-konce směřují do extracelulárního prostoru (Obr. 4) (Solovyev *et al.*, 1996). Aby mohl probíhat pohyb viru přes plasmodesmata z buňky do buňky, musí fungovat všechny tři zmíněné interakce mezi TGB proteiny (Lim *et al.*, 2008). Studie Lawrence a Jackson (2001), prokázala, že při nepřítomnosti TGB2 a TGB3 proteinů není schopen virus proniknout přes plasmodesmata. Všechny tři TGB proteiny spolu vytvářejí komplex nukleoproteinů. Nejdříve se TGB1 naváže na virovou RNA, následně se na tento komplex připojí TGB3. Celá struktura se poté připojuje na plasmodesma. Stabilizaci komplexu a ulehčení průniku skrze plasmodesmata zajišťuje TGB2, který se váže na TGB3 (Jackson *et al.*, 2009).



Obrázek 4: Struktura TGB2 a TGB3 proteinů (převzato ze Solovyev *et al.*, 1996).

TGB2 protein (TGBp2) je tvořen vláknem, jehož N- a C-konce směřují do cytoplazmy, hydrofobní části jsou zanořeny do membrány a oddělují N- a C-konec hydrofilní smyčkou, ta je vystavena extracelulární části membrány. TGB3 protein (TGBp3) má N- a C-konec orientovány extracelulárně a hydrofilní smyčka je orientována intracelulárně.

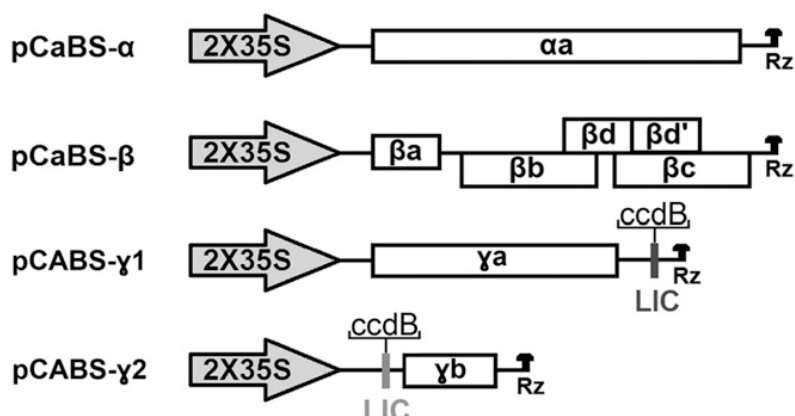
Ze sedmi proteinů, které kóduje genom BSMV jsou naprosto nezbytné pro virovou RNA replikaci pouze $\alpha\alpha$ a γb (Petty *et al.*, 1990). Protein $\alpha\alpha$ je 130kDa produktem RNA α a je tvořen methyltransferázovými a NTPázovými doménami. Protein γb je exprimován z ORF umístěného na 3' konci RNA γ a ve své sekvenci obsahuje RNA-dependentní RNA polymerázový sekvenční motiv (Solovyev *et al.*, 1996). γb je malý na cystein bohatý protein jehož velikost se pohybuje mezi 16–20 kDa. Devět z jedenácti cysteinových zbytků v γb proteinu jsou koncentrovány do dvou klastrů blíže N-konci proteinu. Tyto klastry se značí C1, který zahrnuje aminokyseliny 1–23, a C2, ten je tvořen aminokyselinami 60–85.

Oba tyto klastry jsou organizovány do motivu zinkových prstů. Mezi C1 a C2 se nachází základní motiv (BM) proteinu obsahující lysin a arginin, který je stejně jako oba klastry schopen vázat zinek. BM je schopný zprostředkovat RNA-vazebnou aktivitu. Na C-konci γb proteinu se nachází struktura coiled-coils (Bragg *et al.*, 2004). Tato struktura je významnou částí, která je potřebná pro potlačení RNA umlčovacích mechanismů v hostitelské rostlině (Jackson *et al.*, 2009).

3.4.4.1.1 Využití a limitace BSMV

BSMV má nepochybně výhodu v tom, že je schopen infikovat velký okruh obilovin. Dále se dokáže velmi efektivně množit v rostlině, což ho činí výborným nástrojem pro studium patogeneze a mechanismu patogeneze v rostlinách (Jackson *et al.*, 1989).

Rostlinné viry jsou také účinné nástroje, kterými lze exprimovat heterologní proteiny. BSMV vektor lze použít tak, že se vloží fragment do jeho γ podjednotky. Do této podjednotky lze však vložit jen fragment o určité velikosti. Jako stabilní se jeví použití fragmentů o velikosti 150–500 bp. V dřívějších experimentech byl do γ podjednotky vkládán protein GFP, který má velikost cca 720 bp. Tato velikost je větší než ideální velikost fragmentu, a proto často docházelo k nerovnoměrné infekci. Cheuk a Houde (2019) proto ve svých experimentech použili protein iLOV o velikosti cca 360 bp, u kterého již docházelo k rovnoměrné expresi vloženého genu. Dále modifikovali BSMV vektor tak, aby sestával ze čtyř namísto tří podjednotek (Obr. 5). Genom γ modifikovali tak, aby jej tvořily 2 podjednotky ($\gamma 1$ a $\gamma 2$) namísto jedné. Nový čtyřkomponentový BSMV byl tedy složen z α , β a $\gamma 1$ a $\gamma 2$ genomů. Kromě navýšení kapacity virového vektoru tak umožnili i vložení dvou inzertů, a to zároveň do $\gamma 1$ i $\gamma 2$ podjednotky. Maximální kapacita pro inzertovanou cDNA do BSMV vektoru vzrostla na 2106–2448 bp (Cheuk a Houde, 2019).



Obrázek 5: Schéma čtyřsložkového BSMV (převzato ze Cheuk a Houde, 2019).

Genom γ byl rozdělen na dvě podjednotky $\gamma 1$ a $\gamma 2$. Každá z podjednotek byla opatřena LIC klonovacím místem. Pro usnadnění klonování genů do těchto podjednotek byly LIC místa opatřena i *ccdB* kazetou.

Ačkoliv lze BSMV použít jak pro metodu VIGS, tak pro VOX, nese tento vektor jednu zásadní nevýhodu, a to sice, že pro jeho použití je nutná přítomnost všech čtyř částí genomu (Bouton *et al.* 2018). Z tohoto důvodu byla vytvořena nová série virových vektorů, tzv. FECT, jež jsou odvozeny od

Foxtail mosaic virus (FoMV). FECT jsou jednosložkové FoMV viry, u kterých byl zmenšen genom o 29 % (Liu a Kearney, 2010).

3.4.4.2 Foxtail mosaic virus (FoMV)

Foxtail mosaic virus patří do rodiny Potexvirů s širokou škálou hostitelů. Potexviry jsou velkou skupinou vláknitých virů, jejichž genom tvoří positive-sense ssRNA s čepičkou na 5'konci a poly-A sekvencí na 3'konci. FoMV je schopen infikovat širokou škálu hostitelů z řad jednoděložných i dvouděložných rostlin, nicméně způsobuje jen lehké symptomy (Liu a Kearney, 2010). Jeho genom je znám již od roku 1991 (Bancroft *et al.*, 1991). Je tvořen pěti čtecími rámci (ORF) a dvěma subgenomickými promotory, které zahajují transkripci subgenomické RNA 1 a 2. ORF1 na 5'konci kóduje RNA-dependentní RNA polymerázu, která je zodpovědná za replikaci virové RNA a subgenomické mRNA. ORF 2, 3 a 4 kódují tzv. triple gene block (TGB) a jsou důležité pro pohyb viru z buňky do buňky. TGB jsou exprimovány sgRNA1 a sgRNA2 (Mei *et al.*, 2016). Nejbližše 3'konci se nachází ORF5, který je zodpovědný za produkci obalového proteinu, tzv. 5A proteinu (Robertson *et al.*, 2000). ORF5 je exprimován ze sgRNA3 (Mei *et al.*, 2016).

Úpravou genomu byly vytvořeny virové vektory odvozeny od FoMV nazývané FECT (Bouton *et al.*, 2018). FECT vektory nejsou schopny se systematicky šířit, jelikož jsou zbaveny pohyb umožňujících TGB proteinů a obalového proteinu (Liu a Kearney, 2010). FECT umožňují expresi proteinů jen v primárně inokulovaných listech. Tyto vektory lze použít při metodách VIGS v kukuřici, pšenici i ječmenu (Bouton *et al.*, 2018).

3.4.4.2.1 Využití a limitace FoMV

Jak již bylo zmíněno, BSMV disponuje řadou nevýhod, mezi které patří jak nutná přítomnost všech čtyř složek jeho genomu, tak možnost exprese jen malých proteinů, jelikož použití proteinů větších než 500 bp se jeví jako nestabilní. Upravený FoMV dokáže přenést a exprimovat proteiny o velikosti 178–600 aminokyselin (Bouton *et al.*, 2018). Použití FECT nese také menší rizika dopadu na životní prostředí. To, že je jejich genom zmenšen téměř o jednu třetinu, je však činí výrazně slabšími. Nejsou schopny se množit v hostiteli, pokud není jeho imunitní systém oslaben, jestliže by i přesto došlo k množení, budou se FECT množit špatně. Dále FECT postrádají obalový protein, a tudíž nejsou schopny vytvářet virion, což činí jejich přežití mimo hostitele téměř nemožným (Liu a Kearney, 2010).

3.5 Transmise virových konstruktů

K provedení všech výše zmíněných metod využívajících virů jako vektorů se využívá strategie, při které je část vektoru odstraněna a ponechány jsou jen naprosto nezbytné části viru. Mezi elementy, které lze viru odebrat patří např. molekulární systémy zajišťující infekčnost virového systému. Za obvyklých podmínek je schopnost samotného viru infikovat rostlinu poměrně malá a je k tomu potřeba buď

mechanické poškození rostlinné tkáně, nebo přenos pomocí hmyzu. V genovém inženýrství je využíváno bakterie *Agrobacterium tumefaciens*, jež efektivně dopraví DNA kopii virového vektoru do rostlinné buňky. Tento proces se nazývá agroinfekce. Agroinfekce je snadným a levným nástrojem, při které dochází k sestavení RNA vektoru z jednotlivých podjednotek nesených *Agrobacterií* a produkci rekombinantních proteinů v rostlině (Gleba *et al.*, 2004). Agroinfekce se většinou provádí v *N. benthamiana*. Homogenát z takto úspěšně infikované rostliny poté slouží k přenosu virového vektoru na rostliny zájmu (Cheuk a Houde, 2017), v našem případě na ječmen. Jsou dvě cesty, jak tento přenos uskutečnit, buď pomocí listové abraze, nebo imbibicí semen (Cheuk a Houde, 2017).

3.5.1 Abraze listů

Abraze listů je tradiční metodou mechanické inokulace, kdy je homogenát obsahující virové částice, zpravidla se používá homogenát listů rostliny, která byla předtím podrobena agroinfekci, obohacen o karborundum či křemelinu, které slouží k narušení buněčné stěny. Tento homogenát je následně potřen na mladé listy cílové rostliny, např. ječmene (Ascencio-Ibañez a Settlage, 2007). Ačkoliv je tato metoda nejpoužívanější metodou k přenosu virových částic do rostliny, nese řadu nevýhod. Cheuk a Houde (2017) testovali tuto metodu s použitím virového vektoru BSMV, do kterého byl vložen fluorescenční reportérový gen *iLOV* a pozorovali poměrně pomalou a nerovnoměrnou propagaci BSMV do různých tkání skrze sousední buňky.

3.5.2 Imbibice

Imbibice je efektivní metodou umožňující uniformní genovou expresi, kterou, jak již bylo uvedeno výše, poprvé publikovali ve své studii Cheuk a Houde (2017). Při imbibici jsou klíčící semena na Petriho misce inkubována s homogenátem z *N. benthamiana* obsahujícím virové částice. Cheuk a Houde (2017) prokázali, že propagace BSMV rostlinnými tkáněmi byla rychlejší než u listové abraze. Prokázali také, že při imbibici dochází k větší expresi reportérového proteinu. Další výhodou imbibice je, že při ní nedochází k úbytku biomasy ani k ovlivnění výšky rostliny, proto se předpokládá, že je tato metoda vhodnou zejména pro studium fenotypových projevů genů, které ovlivňují reakci na stres. Při imbibici dále dochází k expresi v celé rostlině. Větší exprese je pozorovatelná v kořenech, nicméně v rámci jednotlivých tkání je exprese víceméně uniformní (Cheuk a Houde, 2017).

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Biologický materiál

Pro přípravu virového vektoru byly použity podjednotky α , β , $\gamma 1$ ccdb a $\gamma 2$ ccdb viru BSMV připravené Cheuk a Houde (2019) a podjednotka BSMV $\gamma 2:GFP$ připravená Bc. Martinem Lukáčem v rámci jeho bakalářské práce. Fluorescenční reportérový gen *iLOV* byl amplifikován z plazmidu pGEX_iLOV (addgene.org). Kandidátní geny avirulence *AVRa1* a *AVRa10* *Blumeria graminis* byly syntetizovány firmou General Biosystems, Inc. (generalbiosystems.com). Pro množení plazmidů a jejich agroinfiltraci byly použity kmeny bakterií *Escherichia coli* DH10 α (Invitrogene) a *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 (addgene.org). Množení virových částic a ověření jejich funkce byly prováděny na rostlině *N. benthamiana* (Mgr. Aleš Pečinka, Ph. D., ÚEB Olomouc).

Kultivary ječmenů (*H. vulgare*) Timori, BR-5783, Lumar, HE-2716, Algerian 3 a Stirling poskytl Doc. Ing. Antonín Dreiseitl, CSc. (Agrotest Fyto s.r.o., Kroměříž).

4.2 Použité chemikálie, kity a roztoky

Použité chemikálie:

- *Taq* DNA polymeráza 2 U. μ l⁻¹ (Thermo Fisher Scientific, kat. č. F530S, Waltham, USA)
- agaróza (VWR, Radnor, USA)
- chlorid hořečnatý hexahydrát (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- destilovaná voda
- ethidium bromid (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- nukleotidy, 100mmol.l⁻¹ dATP, dCTP, dGTP, dTTP (VWR; Radnor, USA)
- primery pro PCR (Eurofins Genomics, ČR)
- restrikční enzym *Apa*I 50 U. μ l⁻¹ (Thermo Fisher Scientific, kat. č. R0114S, Waltham, USA)
- restrikční enzym *Nco*I 10 U. μ l⁻¹ (Thermo Fisher Scientific, kat. č. R0193S, Waltham, USA)
- fosfatáza 1 U. μ l⁻¹ FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (Thermo Fisher Scientific, kat. č. EF0651, Waltham, USA)
- T4 DNA Ligase 5U. μ l⁻¹ (Thermo Fisher Scientific, kat. č. EL0011, Waltham, USA)
- CutSmart pufr 10x (BioLabs, kat. č. B7204S, New England)
- glycerol
- SOC médium (Thermo Fisher Scientific, kat. č. 15544034, Waltham, USA)
- isopropanol (Sigma-Aldrich, kat. č. 67-63-0, St. Louis, USA)

- fenol (Sigma-Aldrich, kat. č. 108-95-2, St. Louis, USA)
- 2-(N-morpholino)ethansulfonová kyselina (MES; Sigma-Aldrich, kat. č. M3671, St. Louis, USA)
- 3',5'-Dimethoxy-4'-hydroxyacetofenon (Acetosyringon; Sigma-Aldrich, kat. č. D134406, St. Louis, USA)
- $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich, kat. č. 442611-M, ČR)
- Hydrogenfosforečnan sodný (Sigma-Aldrich, kat. č. 7558-79-4, St. Louis, USA)
- Dihydrogenfosforečnan sodný (Sigma-Aldrich, kat. č. 1.06346, St. Louis, USA)
- 70% a 96% etanol
- 40% směs akrylamid:N, N'- methylenbisakrylamid 19:1 (5% crosslinker; Bio-Rad; Hercules, USA)
- N,N,N',N'-tetramethylethylenediamin (TEMED; Bio-Rad; Hercules, USA)

Použité kity:

- Qubit™ dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, kat. č. Q32850, Waltham, USA)

Použité roztoky:

- 5× TBE pufr:
 - 450 mmol.l⁻¹ Tris (Sigma-Aldrich; St. Louis, USA)
 - 450 mmol.l⁻¹ kyselina boritá (Lach-Ner; Neratovice, ČR)
 - 10 mmol.l⁻¹ EDTA, pH = 8,0 (Sigma-Aldrich; St. Louis, USA)
- 10× PCR pufr (s Mg²⁺):
 - 100mmol.l⁻¹ Tris-HCl, pH = 8,2 (Sigma-Aldrich, USA)
 - 500mmol.l⁻¹ KCl (Lach-Ner, ČR)
 - 15mmol.l⁻¹ $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ (Lach-Ner, ČR)
 - 1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, USA)
- Marker molekulové hmotnosti Gene Ruler 100 bp DNA Ladder Plus (Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA)
- 6× STOP C:
 - 100mmol.l⁻¹ EDTA (Sigma-Aldrich; St. Louis, USA)
 - 1% SDS (Sigma-Aldrich; St. Louis, USA)
 - 0,05% bromfenolová modř (Sigma-Aldrich; St. Louis, USA)
 - 0,05% xylén kyanol (Sigma-Aldrich; St. Louis, USA)
 - 42,5% glycerol (Sigma-Aldrich; St. Louis, USA)
 - 300 µl destilovaná voda

- 5x Cresol red:
 - 0,01% *o*-kresolová červeň (Sigma-Aldrich; St. Louis, USA)
 - 1,5% sacharóza (Lach-Ner; Neratovice, ČR)
- GET pufr
 - 50mmol.l⁻¹ glukosa
 - 10mmol.l⁻¹ EDTA (Sigma-Aldrich, USA)
 - 25mmol.l⁻¹ Tris-HCl, pH = 8 (Sigma-Aldrich, USA)
- TE pufr
 - 10mmol.l⁻¹ Tris
 - 1mmol.l⁻¹ EDTA, pH = 8 (Sigma-Aldrich, USA)
- Alkalické SDS
 - 0,2mol.l⁻¹ NaOH
 - 1% SDS v/v
 - ddH₂O
- Neutralizační roztok (pH 4,8–5,3)
 - KAc 5mol.l⁻¹ 60 ml/100 ml
 - ledová CH₃COOH 11,5 ml/100 ml
 - ddH₂O 28,5 ml
- 2YT médium
 - kaseinový enzym 1,6 g/100 ml
 - kvasinkový autolyzát 1 g/100 ml
 - NaCl 0,5 g/100 ml
 - agar 1,6 g/100 ml
- Persulfát amonný 10%
 - 1 g persulfát amonný
 - Doplnit na 10 ml destilovanou vodou.
- kanamycin 50 µg.ml⁻¹
- rifampicin 0,5 µg.ml⁻¹
- ribonukleasa A 10 mg.ml⁻¹
- Chloroform:isoamylalkohol 24:1
- fenol (pH > 7,8)
- 3mol.l⁻¹ NaAc (pH 5,5)
- 7,5mol.l⁻¹ NH₄Ac

- 20 mmol.l⁻¹ sodno-fosfátový pufr (pH 7,2)

4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

- horizontální laminární box (Jouan; Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
- mrazicí box (-20°C; Nord Line, ČR)
- termocyklér C1000 Touch™ (Bio-Rad, Hercules, USA)
- zdroj stejnosměrného napětí (MP-500V, Major Science, USA)
- zdroj stejnosměrného napětí EC 1000 XI power supply (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
- aparatura pro vertikální gelovou elektroforézu (C-DASG-400-50, C.B.S. Scientific, USA)
- aparatura pro horizontální gelovou elektroforézu Owl A6 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
- UV transiluminátor, InGenius system (Syngene; Bengaluru, IND)
- fluorometr Qubit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
- třepačka Reax Control (Heidolph Instruments, Německo)
- mrazicí box (-80°C; Thermo Fisher Scientific, USA)
- mikrobiologický Termostat BT 120 (Labo MS s.r.o., ČR)
- třepačka (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
- třepačka s houpavým pohybem Duomax 1030 (Heidolph; Schwabach; Německo)
- jednopaprskový spektrofotometr Ultrospec 10 (AP Czech; Praha; ČR)
- sálová centrifuga Heraeus Multifuge X1R (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
- centrifuga Mega Star 600R (VWR Collection; Leicestershire; Velká Británie)
- elektroporátor (KRD Technologies, ČR)
- mikrovlnná trouba (KOR-6C2B; DAEWOO, Korea)
- stolní centrifuga (5415 Eppendorf; Hamburk; Německo)
- konfokální mikroskop Leica TCS SP8 STED 3X (Leica Microsystems, Wetzlar, Německo)
- fytotron pro růst kultivarů ječmenů (Fytoscope, FS-SI-4600, Photon Systems Instruments, ČR)
- fytotron pro růst *Nicotiana benthamiana* (Weiss Gallenkamp, Velká Británie)
- magnetická míchačka IKA RCT Basic (IKAMAG™, Německo)
- digitální předvážky Vibra AJ-820CE (Shinko Denshi; Tokio, Japonsko)
- sekvenátor ABI 3730xl (Applied Biosystems; Foster City; USA)

4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

Cílem této bakalářské práce bylo vyvinout novou metodu ke zjištění, jestli kandidátní gen avirulence *AVR_{ai10}* je genem avirulence, tedy, že kultivary ječmenů nesou k tomuto genu odpovídající gen rezistence. Jako pozitivní kontrola nové metodiky byl použit *AVR_{ai}* gen, který je potvrzeným genem avirulence (Lu *et al.*, 2016). Prvním krokem bylo vytvoření vhodného vektoru pro dopravení těchto genů do cílové rostliny. Jako vektor byl zvolen čtyř-podjednotkový vir BSMV (Cheuk a Houde, 2019), do jehož podjednotek $\gamma 1$ a $\gamma 2$ byl vložen fluorescenční reportérový gen *iLOV* o velikosti 358 bp (cca 10 kDa). Díky fluorescenčním vlastnostem *iLOV* lze ve fluorescenčním mikroskopu sledovat, zda došlo k úspěšnému přenosu a množení virových částí v hostitelské rostlině či nikoliv, navíc je *iLOV* podstatně menší než často používaný fluorescenční protein GFP, jež má velikost cca 700 bp (cca 25 kDa), což zvyšuje kapacitu vektoru pro přenos cizorodé DNA. Virový vektor BSMV s inzertem *iLOV* byl již připraven Mgr. Vendulou Weissovou v rámci její diplomové práce, nicméně tento připravený vektor se ukázal jako nevhodný a byl připraven jinak v rámci této bakalářské práce.

4.4.1 Klonování genu *iLOV* do gamma podjednotek viru BSMV

Gen *iLOV* PCR amplifikovaný z plazmidu pGEX_*iLOV* byl do virových podjednotek $\gamma 1ccdb$ a $\gamma 2ccdb$ vložen s použitím restrikčního místa pro *ApaI* enzym. Před gen *iLOV* bylo vloženo unikátní restrikční místo pro restrikční enzym *NcoI* tak, aby byl dodržený čtecí rámeček. *iLOV* byl amplifikován použitím primerů *iLOV-KA_F* a *iLOV-KA_R* (Tab.1) v PCR reakční směsi o objemu 20 μ l (Tab. 2). PCR reakce probíhala v termocykléru C1000 (TouchTM, Bio-Rad, USA) za podmínek uvedených v Tab. 3.

Tabulka 1: Schéma pipetování PCR reakční směsi pro 1 vzorek/20 μ l.

Složka PCR reakční směsi	Koncentrace zásobního roztoku	Finální koncentrace	Objem ve 20 μ l reakci
PCR pufr (Mg^{2+})	10x	1x	2 μ l
Cresol Red	5x	1x	4 μ l
Forward primer	10 μ mol.l ⁻¹	1 μ mol.l ⁻¹	2 μ l
Reverse primer	10 μ mol.l ⁻¹	1 μ mol.l ⁻¹	2 μ l
dNTPs	10 mmol.l ⁻¹	200 μ mol.l ⁻¹	0,4 μ l
Taq polymeráza	2 U/ μ l	0,5 U	0,4 μ l
DNA	-	0,1–0,5 ng	1 μ l
ddH ₂ O	-	-	8,2 μ l

Tabulka 2: Navržené primery a jejich použití v této bakalářské práci.

Podtržení znázorňuje místa pro restriční enzymy ApaI (GGGCC) a NcoI (CCATGG).

Název primeru	Sekvence primeru (5' → 3')	Použití
iLOV-KA_F	ACT <u>GGG CCC</u> ATG GTC AGA TCT ATG ATA GAG AAG AAT TTC GTC ATC ACT G	PCR amplifikace <i>iLOV</i>
iLOV-KA_R	ACT <u>GGG CCC</u> TTA TAC ATG ATC ACT TCC ATC GAG	
iLOV_cloning_sequencing_F	TAC TCC ACC TGC AAC CTG TG	ověření úspěšnosti a orientace ligovaného fragmentu <i>iLOV</i> pro γ_1 a γ_2
BS_32_R	TGG TCT TCC CTT GGG GGA C	
AVR_A1_NcoI_F2	ACT <u>CCA TGG</u> ATG AGG ACG TGG CAA TGC C	PCR amplifikace <i>AVR_{a1}</i> ;
AVR_A1_NcoI_R3	GAT <u>CCA TGG</u> TAC TAA GTA CAT TCC TCG ATG AAC	
AvrA10_op_NcoI_F	ACT <u>CCA TGG</u> TAA TGG ACG GTT GGA CGT GT	PCR amplifikace <i>AVR_{a10}</i>
AvrA10_op_NcoI_R	GAT <u>CCA TGG</u> TAC TAA CGG TAA TCG GAC TCG	
BS_24_F	GTA AAA GAA AAG GAA CAA CCC TG	ověření úspěšnosti a orientace ligace pro <i>AVR_{a10}</i>
AvrA10_op_colony_R	TGG CCT GAC CTC TAA CTT GG	

Tabulka 3: Podmínky PCR reakce.

Krok reakce	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
denaturace	95	5 min	1
syntéza	denaturace	95	30 s
	nasedání primerů	55	30 s
	elongace	72	30 s
extenze	72	10 min	1
udržování	12	∞	1

4.4.1.1 Polyakrylamidová elektroforéza

Úspěšnost PCR reakce byla ověřena polyakrylamidovou elektroforézou (PAGE) v nativním 4% polyakrylamidovém gelu za přítomnosti ethidium bromidu. Výsledky byly vizualizovány dokumentačním zařízením SnapGene (GSL Biotech LLC, San Diego, USA).

Příprava 4% polyakrylamidového gelu

- Po důkladném očištění skel pomocí 70% etanolu, větší sklo ošetřit 1 ml 0,003% 3-methakryloxypropyltrimethoxysilanu rozpuštěného v kyselém 96% etanolu (0,5% kyseliny octové).

2. Skla sestavit k sobě, oddělit 1 mm spacersy a utěsnit gumovým těsněním. Sestavu naplnit 4% směsí akrylamid:N, N'- methylenbisakrylamidu 19:1, 0,5x TBE, 0,073% N,N,N',N'- tetramethylethyldiaminu (TEMED) a 0,067% persulfátu amonného.
3. Poté mezi skla vložit hřebínek a nechat polymerovat 1 hodinu při pokojové teplotě.
4. Skla se ztuhlým gelem vložit do elektroforetické aparatury a řádně upevnit. Do obou elektrodových komor nalít 0,5x TBE pufr. Do katodové komory přidat 0,00002% ethidium bromidu a spustit pre-run 60 min při 300 V.
5. DNA fragmenty separovat 30–90 min při 350 V a vizualizovat dokumentačním zařízením SnapGene.

4.4.1.2 Extrakce a purifikace plasmidové DNA – MiniPrep

1. První den na Petriho misky s 2YT médiem a kanamycinem (50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) provést sterilní kličkou křížový roztěr kultury *Escherichia coli* s požadovaným plazmidem.
2. Misky kultivovat přes noc v termostatu při 37 °C.
3. Druhý den kulturu naočkovat do 3 ml 2YT média s kanamycinem (50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$).
4. Zkumavky inkubovat přes noc na třepačce při 37 °C, 220 rpm.
5. Třetí den rozpipetovat obsah zkumavek po 1,5 ml do sterilních 1,5ml mikrozkušavek. Mikrozkušavky centrifugovat 10 000 rpm, 5 min, 4 °C.
6. Supernatant ze zkumavek odlít a pelet rozsuspendovat ve 100 μl GET s RNasou A (100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$).
7. Do mikrozkušavek přidat 200 μl alkalického SDS a vzorky inkubovat 5 min na ledu.
8. Následně přidat 75 μl neutralizačního roztoku. Suspenze promíchat a ponechat 30 min na ledu.
9. Vzorky centrifugovat 10 000 g, 10 min, 4 °C.
10. Supernatant přenést do nových 1,5ml mikrozkušavek a poté přidat 225 μl isopropanolu. Vzorky inkubovat 30 min při laboratorní teplotě.
11. Vzorky centrifugovat 10 000 g, 10 min, 4 °C.
12. Supernatant po centrifugaci odstranit. Pelet omýt 300 μl vychlazeného 70% etanolu. Před odlitím etanolu mikrozkušavky centrifugovat 2 min, 10 000 g, 4°C.
13. Dále přidat 300 μl vychlazeného 96% etanolu. Mikrozkušavky centrifugovat 2 min, 10 000 g, 4°C. Supernatant odstranit.
14. Pelety sušit 10 min při laboratorní teplotě.

15. Vysušené pelety rozpustit ve 100 μl TE pufru.
16. Ke vzorkům přidat 50 μl fenolu (pH 8,0) a promíchat.
17. Přidat 50 μl chloroform:isoamylalkoholu 24:1. Vzorky promíchat a centrifugovat 17 000 g, 2 min ve 4 °C.
18. Po centrifugaci odebrat horní fázi a kvantitativně přenést do čisté mikrozumavky. Ke vzorku horní fáze přidat stejný objem chloroform:isoamylalkoholu 24:1 a centrifugovat 17 000 g, 2 min ve 4 °C.
19. Krok 17 opakovat celkem 3krát, poté odebrat horní fázi, kvantitativně přenést do nové mikrozumavky a přidat 1/10V 3mol.l⁻¹ NaAc (pH 5,2-5,5) a 0,6V isopropanolu. Vzorky promíchat a nechat stát 5 min při laboratorní teplotě.
20. Vzorky centrifugovat 17 000 g, 10 min, 4 °C. Pokračovat jako v krocích 12-14.
21. Vysušené pelety rozpustit v 50 μl TE pufru a uchovávat při -20 °C.

4.4.1.3 Restrikční štěpení a defosforylace vektorů a štěpení PCR produktů s genem *iLOV*

Před ligací genu *iLOV* do virových vektorů bylo nejdříve nutné štěpit jak *iLOV*, tak plazmidovou DNA γ1ccdb a γ2ccdb pomocí restrikčního enzymu *ApaI*. Reakční směs byla připravena podle tabulky 4. 41,7 ng *iLOV* bylo štěpeno v celkovém objemu 50 μl , 54 ng vektorů γ1ccdb a γ2ccdb bylo štěpeno v celkovém objemu 20 μl . Směs byla inkubována po dobu 90 minut při 25 °C a inaktivace enzymu probíhala 20 min při 65 °C. Vektory byly dále defosforylovány 1 U FastAP fosfatázy v termocykléru po dobu 1 hodiny při 37 °C. Fosfatáza byla inaktivovaná 20 min při 65 °C.

Tabulka 4: Reakční směs pro štěpení virových podjednotek a amplifikovaného genu *iLOV* pomocí enzymu *ApaI*.

Složky reakční směsi	Koncentrace zásobního roztoku	Výsledná koncentrace
enzym <i>ApaI</i>	50 U. μl^{-1}	50 U/reakce
DNA	500 ng. μl^{-1}	27 ng. μl^{-1}
10x CutSmart pufr	10x	5x
dH ₂ O	doplnit do výsledného objemu	

4.4.1.4 Fluorimetrické stanovení koncentrace DNA

Pro provedení ligace reportérového genu *iLOV* do virových podjednotek bylo nutné změřit koncentraci jak štěpených vektorů γ1 a γ2 , tak štěpeného reportérového genu *iLOV* na přístroji Qubit (Invitrogen).

1. Standardy 1 a 2 s koncentracemi $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ a $0 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ 20–30 minut temperovat na pokojovou teplotu.
2. Pracovní roztok (Tab. 5) připravit do mikrozkušavky a řádně promíchat.

Tabulka 5: Příprava pracovního roztoku pro Qubit.

Složení pracovního roztoku	1 vzorek	n vzorků
BR pufr	199 μl	199*n μl
Qubit Reagent	1 μl	1*n μl

3. Pracovní roztok rozpipetovat do mikrozkušavek pro vzorky po 199 μl a po 190 μl pro standardy.
4. Standardy 1 a 2 po 10 μl pipetovat do příslušných mikrozkušavek. Do mikrozkušavek pro vzorky pipetovat po 1 μl vzorku.
5. Obsah všech mikrozkušavek zamíchat a uložit na 2 min do tmy.
6. Měření koncentrace provádět v režimu Broad Range dsDNA. Nejdříve vytvořit kalibrační křivku ze standardů 1 a 2 a poté měřit koncentrace jednotlivých vzorků.

4.4.1.5 Ligace reportérového genu *iLOV* do virových podjednotek

Ligační směs byla připravena dle Tab. 6 a DNA vektoru a insertu byly smíchány v poměru 3:1 (insert:vektor). Množství insertu, které bylo nutné přidat do reakční směsi bylo spočítáno dle vzorce:

$$x (\text{množství insertu [ng]}) = \frac{y (\text{množství vektoru [ng]}) * \text{velikost insertu [bp]}}{\text{velikost vektoru [bp]}} * \frac{3}{1} [\text{insert:vektor}]$$

Tabulka 6: Tabulka pro přípravu 20 μl ligační směsi.

Složky ligační směsi	Objem [μl]
10x ligační pufr	4 (finální koncentrace 5x)
T4 DNA ligáza ($5 \text{ U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$)	0,2 (1U)
vektor	x
insert	y
dH ₂ O	doplnit do objemu 20 μl

Připravené ligační směsi byly inkubovány v termocykléru po dobu 3 hodin při $16 \text{ }^\circ\text{C}$.

Úspěšnost ligace byla ověřena pomocí PCR amplifikace (viz kapitola 4.4.1) a polyakrylamidové elektroforózy (viz kapitola 4.4.1.1) za použití primerů *iLOV_cloning_sequencing_F* a *BS_32_R* (Tab. 1) a teplotního programu dle Tab. 3 s dobou elongace 1 min. Fragmenty byly vizualizovány dokumentačním zařízením SnapGene.

4.4.2 Transformace buněk *Escherichia coli* DH10 α elektroporací

Jakmile byl insert *iLOV* vložen do vektoru, bylo možné jej transformovat do elektrokompetentních buněk *E. coli* DH10 α . Jako transformační metoda byla zvolena elektroporace.

4.4.2.1 Příprava elektrokompetentních buněk

K elektroporaci je zapotřebí elektrokompetentních buněk, které odolají vysokému napětí. Elektrokompetentní bakteriální buňky byly připraveny ze startovací kultury *E. coli* DH10 α a *A. tumefaciens* EHA105.

1. Do 100 ml 2YT média s vhodným antibiotikem naočkovat požadované bakterie. Médium inkubovat přes noc na třepačce při teplotě optimální pro dané bakterie (37 °C pro *E. coli* a 28 °C pro *A. tumefaciens*) a 220 rpm.
2. Druhý den 50 ml bakteriální suspenze přidat do 1 litru sterilního 2YT média a změřit absorbanci při vlnové délce 600 nm pomocí jednopaprskového spektrofotometru.
3. Médium umístit na třepačku a inkubovat při vhodné teplotě a 220 rpm.
4. Po dosažení absorbance 0,35, inkubovat médium 30 min na ledu.
5. Bakteriální suspenzi rozdělit po 250 ml do sterilních centrifugačních kyvet. Suspenze centrifugovat 10 min, při 2000 g a 4 °C.
6. Supernatant odlít a pelety rozsuspendovat v 200 ml ledové sterilní destilované vody. Suspenze centrifugovat 10 min, při 2000 g a 4 °C.
7. Supernatant odlít a pelety rozsuspendovat ve 100 ml ledové sterilní destilované vody. Suspenze spojit do dvou centrifugačních kyvet a centrifugovat při 2000 g, 10 min, 4 °C.
8. Supernatant odlít a pelety rozpustit ve 40 ml ledového sterilního 10% glycerolu. Suspenze přenést do připravených 50 ml kyvet a centrifugovat 10 min, 2000 g, 4 °C.
9. Odebrat supernatant a pelet rozpustit v 1 ml sterilního ledového 10% glycerolu.
10. Bakteriální suspenzi po 50 μ l rozdělit do 1,5ml mikrozkušavek. Mikrozkušavky zmrazit v tekutém dusíku a uchovávat při -80 °C.

4.4.2.2 Elektroporace

1. Do dvou sterilních zkumavek připravit 750 μ l SOC média.
2. K bakteriální suspenzi elektrokompetentních buněk přidat maximálně 5 μ l ligační směsi.
3. Elektroporaci provést ve sterilních elektroporačních kyvetách při 2.1 kV, 100 Ω , 25 μ F a časové konstantě přibližně 2,6 milisekund.

4. Suspenze z kyvet kvantitativně převést do SOC média a inkubovat 90 minut ve vhodné teplotě na třepačce při 220 rpm.
5. Suspenze sterilní hokejkou rozetřít na misky s 2YT médiem a kanamycinem ($50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) a misky umístit přes noc do inkubátoru s vhodnou teplotou.

4.4.2.3 Colony PCR pro ověření úspěšnosti transformace

Druhý den byla úspěšnost elektroporace ověřena pomocí colony PCR. Pro *iLOV* byly použity primery *iLOV_cloning_sequencing_F* a *BS_32_R* (Tab. 1). K reakční směsi (Tab. 2) byla sterilní špičkou přidána část kolonie. Elongace byla prodloužena na 1 min. PCR produkty byly separovány pomocí agarózové elektroforézy a vizualizovány dokumentačním zařízením.

4.4.2.4 Agarózová gelová elektroforéza PCR produktů

Příprava 1,2% gelu

1. Roztok tvořený 3,6 g agarózy a 300 ml 0,5x TBE pufru rozvařit v mikrovlnné troubě.
2. Připravit elektroforetickou vanu. Do vany vylít rozvařený gel zchlazený na 40–50 °C a přidat hřebínky. Gel nechat ztuhnout při laboratorní teplotě 30 minut.
3. Ze ztuhlého gelu vyjmout hřebínky a umístit do elektroforetické komory a převrstvit 0,5x TBE pufrem.
4. Separaci vzorků provádět 90 min při napětí 3–5 V.cm⁻¹ poté gel barvit v 0,01% roztoku ethidium bromidu 20 min. Fragmenty vizualizovat dokumentačním zařízením.
5. Pozitivní kolonie pasážovat na misku s 2YT médiem a kanamycinem ($50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$).

4.4.2.5 Sekvence

Ověření sekvence vektorů s vloženým insertem byla provedena Sangerovou sekvenací Ing. Marií Seifertovou na genetickém analyzátoru ABI 3730xl (Applied Biosystems). Získaná data byla vyhodnocena pomocí programu software MEGA-X (Pensylvánská státní univerzita, USA).

4.4.3 Preparativní extrakce DNA vektorů $\gamma 1:iLOV$ a $\gamma 2:iLOV$

Pro další využití připravených vektorů nesoucích reportérový gen *iLOV* byla provedena preparativní extrakce vektorů $\gamma 1:iLOV$ a $\gamma 2:iLOV$.

1. První den naočkovat 100 ml 2YT média s kanamycinem ($50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) pozitivní bakteriální kolonií a suspenzi umístit přes noc na třepačku na 37 °C a 220 rpm.
2. Druhý den suspenzi přelít do sterilní kyvety a centrifugovat 10 min při 3000 g a 4°C.

3. Supernatant odlít a pelet rozsuspendovat ve 4 ml GET. Dále přidat 8 ml alkalického SDS. Suspenzi inkubovat 30 min na ledu. Následně přidat 3 ml neutralizačního roztoku a roztok inkubovat dalších 30 min na ledu a poté centrifugovat 10 min při 3000 g a 4 °C.
4. Do sterilní kyvety přes gázu přelít supernatant a přidat 9 ml isopropanolu. Suspenze inkubovat 30 min při laboratorní teplotě a poté centrifugovat 10 min při 12 000 g a 4°C. Supernatant vylít a pelet omýt nejdříve 70% etanolem a poté 96% etanolem. Pelet vysušit a rozpustit ve 2 ml TE pufru a po kapkách a za stálého míchaní přidat 2 ml 7,5mol.l⁻¹ NH₄Ac. Roztok inkubovat 20 minut na ledu.
5. Suspenzi centrifugovat 10 min při 12 000 g a 4 °C. Supernatant přelít do čisté kyvety a přidat 8 ml 96% etanolu. Kyvetu inkubovat 1 hodinu v -20 °C.
6. Suspenze centrifugovat 10 min při 12 000 g a 4 °C. Supernatant odlít a pelety omýt 70% etanolem a 96% etanolem. Pelet usušit, rozpustit v 1 ml TE pufru a k suspenzi přidat 10 µl RNázy A (100 µg.ml⁻¹). Roztok inkubovat 20 min při 37 °C.
7. Roztok po 500 µl rozpipetovat do 2ml mikrozkušavek a přidat 250 µl fenolu (pH 8) a 250 µl chloroform:isoamylalkoholu (24:1). Roztoky centrifugovat 2 min při 12 000 g a 4 °C.
8. Odebrat 500 µl horní fáze do nové 2ml mikrozkušavky a přidat 500 µl chloroform:isoamylalkoholu (24:1). Roztoky centrifugovat 2 min při 12 000 g a 4 °C. Krok 8 opakovat celkem 3krát.
9. Odpipetovat 500 µl horní fáze do čisté mikrozkušavky a přidat 200 µl 3mol.l⁻¹ NaAc (pH 5,5) a 1200 µl 96% etanolu. Roztoky inkubovat 1 hodinu při -20 °C.
10. Roztoky centrifugovat 10 min při 15 000 g a 4 °C. Supernatant vylít a pelety omýt 70% a 96% etanolem a vysušit.
11. Pelety rozpustit v 500 µl TE pufru a změřit koncentraci plazmidové DNA (viz kapitola 4.4.1.4), uchovávat v -20 °C.

4.4.4 Transformace *Agrobacterium tumefaciens* EHA105

Pro účely agroinfiltrace rostliny *Nicotiana benthamiana* musely být všechny podjednotky BSMV přeneseny do *A. tumefaciens* EHA105 pomocí elektroporace (viz kapitola 4.4.2.2). Elektrokompentní buňky byly transformovány 2 ng plazmidové DNA. Po inkubaci 90 min 28 °C byly suspenze rozetřeny na misky se selekčním médiem (s obsahem kanamycinu 50 µg.ml⁻¹ a rifampicinu, 25 µg.ml⁻¹). Misky byly inkubovány 2 dny při 28 °C. Elektroporace byla ověřena colony PCR (viz kapitola 4.4.2.3) s primery iLOV_cloning_sequencing_F a BS_32_R (Tab 1.).

4.4.5 Agroinfiltrace

Agroinfiltrace byla provedena k ověření funkčnosti připravených vektorů v genomu BSMV v hostiteli. Semenáčky *N. benthamiana* byly 3 týdny pěstovány ve fytotronu Weiss Gallenkamp v režimu den: 16 hod/20 °C, noc: 8 hod/16 °C při 60% vlhkosti. BSMV potřebuje ke svému úspěšnému množení a šíření v rostlině kompletní genom složený ze čtyř podjednotek, proto byla pro agroinfiltraci použita kombinace podjednotek α , β , $\gamma 1ccdb$ a $\gamma 2:iLOV$ a kombinace α , β , $\gamma 1:iLOV$ a $\gamma 2ccdb$. Jako pozitivní kontrola byla použita kombinace α , β , $\gamma 1ccdb$ a $\gamma 2:GFP$.

Příprava materiálu k agroinfiltraci

1. Všechny potřebné a testované podjednotky BSMV v *A. tumefaciens* individuálně namnožit ve 100 ml 2YT média s kanamycinem (50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$).
2. Suspenze inkubovat 48 hodin na třepačce při 28 °C a 220 rpm.

Příprava bakteriálních konzerv *A. tumefaciens* EHA105 s $\gamma 1:iLOV$ a s $\gamma 2:iLOV$

1. Mililitr bakteriální suspenze převést do sterilní 2ml mikrozkušavky.
2. K bakteriální suspenzi přidat 150 μl sterilního glycerolu. Suspenze důkladně promíchat.
3. Takto vyrobené konzervy uchovávat při -80 °C.

Postup agroinfiltrace

1. Připravit agroinfiltrační pufr (Tab. 7).
2. Suspenze buněk rozlít do sterilních centrifugačních kyvet a centrifugovat 10 min při 2800 g a 4 °C.
3. Supernatant odlít a pelety rozpustit v 50 ml agroinfiltračního pufru.
4. Jednopaprskovým spektrofotometrem změřit absorbanci při vlnové délce 600 nm. Suspenze ředit agroinfiltračním pufrem, dokud absorbance u všech nedosáhne hodnoty 0,7.
5. Naředěné suspenze s podjednotkami α , β , $\gamma 1ccdb$ a $\gamma 2:iLOV$ smíchat v poměru 1:1:1:1. Ve stejném poměru smíchat i podjednotky v kombinaci α , β , $\gamma 1:iLOV$ a $\gamma 2ccdb$ a kombinace pro pozitivní kontrolu α , β , $\gamma 1ccdb$ a $\gamma 2:GFP$.
6. Směsi suspenzí umístit na třepačku na 3–5 hodin na 28 °C a 220 rpm.
7. Směsí podjednotek infiltrovat spodní stranu listů *N. benthamiana*.
8. Sterilním skalpelem list naříznout a injekční stříkačkou do něj vpravit suspenzi. Infiltrovaná místa označit fixem.
9. Rostliny přes noc uchovávat ve tmě a druhý den umístit zpět do fytotronu při podmínkách uvedených výše.

Tabulka 7: Příprava agroinfiltračního pufru.

Složka pufru	Příprava zásobního roztoku	Koncentrace zásobního roztoku	Konečná koncentrace
MES	1,95 g v 10 ml ddH ₂ O	1 mol.l ⁻¹	10 mmol.l ⁻¹
MgCl ₂	0,95 g v 10 ml ddH ₂ O	1 mol.l ⁻¹	10 mmol.l ⁻¹
acetosyringone	19,62 mg v 1 ml DMSO	100 mmol.l ⁻¹	100 μmol.l ⁻¹
ddH ₂ O	doplnit do objemu		

4.4.5.1 Fluorescenční mikroskopie *N. benthamiana*

Schopnost šíření virových částic rostlinou a úspěšnost agroinfiltrace byly ověřeny pomocí konfokálního fluorescenčního mikroskopu (Leica TCS SP8 STED 3X), který umožňuje snímání jednotlivých vrstev připraveného preparátu. Mikroskopie byla prováděna ve spolupráci s Mgr. Alžbětou Němečkovou, Ph. D.

1. Místa označená fixem vyříznout čistým skalpelem a nařezat na 1x4mm kousky.
2. Kousky umístit do kapky vody na podložním skle a přikrýt krycím sklem. Jako negativní kontrolu použít listy z neinfiltrované rostliny.
3. Preparáty pozorovat pomocí konfokálního fluorescenčního mikroskopu. Pro snímání byl použit objektiv 63x s imerzním olejem. Pro detekci iLOV bylo použito emisní spektrum 510–550 nm a excitační spektrum 476 nm. Pro detekci autofluorescence bylo použito emisní spektrum 570–700 nm a excitační spektrum 561 nm. Struktura listu byla snímána pomocí transmise.

4.4.6 Příprava virové podjednotky nesoucí gen avirulence

Klonování genů avirulence *AVR_{ai}* a *AVR_{ai10}* probíhalo obdobným způsobem jako v případě klonování genu *iLOV*. Nejdříve byla provedena extrakce DNA (viz kapitola 4.4.1.2) plazmidů pIPKb002::*Avr_{ai}* a pIPKb002::*Avr_{ai10}*.

AVR geny byly PCR reakcí (viz kapitola 4.4.1) amplifikovány z 1 ng plazmidové DNA za použití primerů v Tab. 1. V podmínkách PCR (Tab. 3) byla upravena teplota nasedání primerů na 60 °C a doba elongace na 1 minutu. Produkty reakce byly separovány pomocí polyakrylamidové elektroforézy (viz kapitola 4.4.1.1) a vizualizovány dokumentačním zařízením SnapGene.

Koncentrace PCR produktů byla změřena pomocí zařízení Qubit (viz kapitola 4.4.1.4). PCR produkty a virový vektor γ 2:*iLOV* byly restriktivně štěpeny (Tab. 8) enzymem NcoI. Štěpení probíhalo 2 hodiny při 37 °C. Enzym byl inaktivován 20 min při 80 °C. Virový vektor byl defosforylován (viz kapitola 4.4.1.3).

Tabulka 8: Příprava reakční směsi pro restrikční štěpení enzymem NcoI.

Složky reakční směsi	Množství a koncentrace složek v jednotlivých roztocích		
	AVRa1	AVRa10	$\gamma 2:iLOV$
enzym NcoI (10 U. μl^{-1})	10 U	10 U	50 U
DNA	99 ng	90 ng	5 μg
10x CutSmart pufr	1x	1x	1x
dH ₂ O	doplnit do objemu		
Výsledný objem reakce [μl]	20	20	100
Výsledná koncentrace DNA po naštěpení [$\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$]	4,95	4,5	50

Následovala ligace AVR genů do virového vektoru (viz kapitola 4.4.1.5) a transformace *E. coli* DH10 α (viz kapitola 4.4.2.2) a její ověření pomocí colony PCR (viz kapitola 4.4.2.3) s primery uvedenými v Tab. 1. V podmínkách PCR (Tab. 3) byla upravena doba elongace na 1 min. Amplifikované vzorky byly separovány agarózovou elektroforézou (viz kapitola 4.4.2.4) a fragmenty byly vizualizovány dokumentačním zařízením SnapGene. PCR produkty byly osekvenovány Ing. Marií Seifertovou a data byla vyhodnocena v programu MEGA-X (Pensylvánská státní univerzita, USA).

Dvěma ng izolované plazmidové DNA $\gamma 2:iLOV:AVR_{a1}$ a $\gamma 2:iLOV:AVR_{a10}$ byly transformovány bakterie *A. tumefaciens* (viz kapitola 4.4.4) a byla provedena agroinfiltrace (viz kapitola 4.4.5).

Agroinfiltrace byla provedena také na ječmenných kultivarech Lumar a Stirling obdobným způsobem jako v kapitole 4.4.5. Po sedmi dnech byla funkčnost viru s AVR geny ověřena konfokální fluorescenční mikroskopií agroinfiltrovaných listů (viz kapitola 4.4.5.1).

4.4.7 Příprava virového homogenátu z listů *N. benthamiana*

K transmisi virových konstruktů do ječmene byl vytvořen z agroinfiltrovaných listů *N. benthamiana* homogenát.

1. Navážít a homogenizovat 0,5 g agroinfiltrovaných listů. Homogenizaci provést ve vychlazené třecí misce v 1 ml 20 mmol.l⁻¹ sodno-fosfátového pufru (pH 7,2).
2. Homogenát uchovávat v mrazničce při -20 °C.

4.4.7.1 Listová abraze

Tato metoda byla použita k infikaci kultivarů *Hordeum vulgare*. Jedná se o metodu, při níž dochází k narušení buněčné stěny rostlinných buněk pomocí práškového silikagelu za přítomnosti virového homogenátu.

1. Do Petriho misek umístit na mokrou buničinu semena a misky uložit na 3 dny do lednice.

2. Po 3 dnech umístit misky na den do tmy.
3. Následně zasadit semena do substrátu a květináče umístit do fytotronu (Fytoscope, FS-SI-4600) (den: 10 hodin/22 °C; noc: 14 hodin/16 °C; vlhkost: 60 %).
4. Abrazi provést na rostlinách disponujících alespoň druhým listem.
5. Virový homogenát rozmrazit a smíchat se silikagelem (na 1 ml homogenátu 3–5 mg silikagelu).
6. Na první list nanést třením prstů směs homogenátu a silikagelu a místo abraze označit.
7. Rostliny přesunout zpět do fytotronu a po 7 dnech provést fluorescenční mikroskopii (viz kapitola 4.4.5.1).

4.4.7.2 Imbibice semen

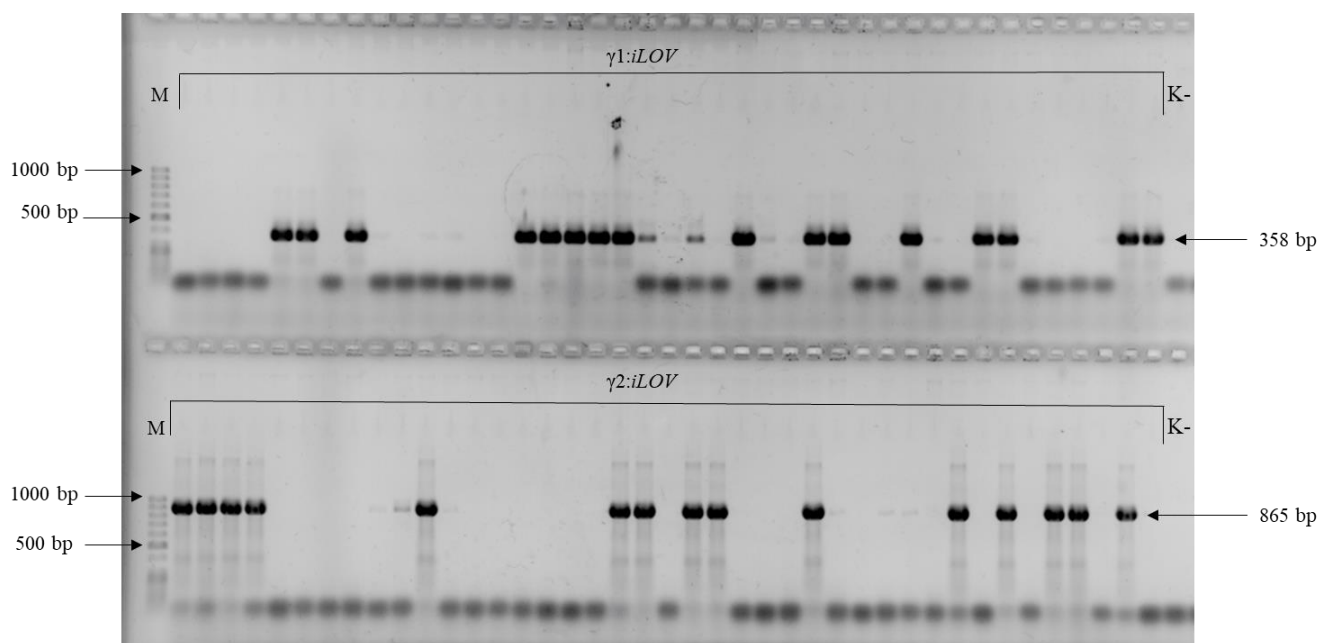
Metoda imbibice spočívá v klíčení semen ve virovém homogenátu.

1. Do Petriho misek s mokrou buničinou umístit semena a misky uložit na 2 dny do lednice.
2. Virový homogenát zředit deionizovanou vodou v poměru 1:100 (homogenát : deionizovaná voda).
3. Buničinu z misek odstranit a semena zalít do poloviny zředěným homogenátem.
4. Misky zabalit do alobalu a umístit na 2 dny na třepačku (2 rpm, laboratorní teplota).
5. Semena zasadit do substrátu a květináče umístit do fytotronu (Fytoscope, FS-SI-4600) (den: 10 hodin/22 °C; noc: 14 hodin/16 °C; vlhkost: 60 %).
6. Po sedmi dnech provést kontrolu infekce fluorescenční mikroskopii (viz kapitola 4.4.5.1).

5 VÝSLEDKY

5.1 Příprava $\gamma 1$ a $\gamma 2$ podjednotek nesoucích reportérový gen *iLOV*

Gen *iLOV* byl úspěšně amplifikován PCR reakcí. Výsledný fragment na polyakrylamidovém gelu odpovídal předpokládaným 358 bp. Plazmidy nesoucí virové podjednotky $\gamma 1$ ccdb a $\gamma 2$ ccdb byly extrahovány a byla změřena jejich koncentrace na zařízení Qubit. Koncentrace $\gamma 1$ ccdb byla $54,4 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ a koncentrace $\gamma 2$ ccdb byla $54,0 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. Po štěpení PCR produktů s genem *iLOV* enzymem *ApaI* bylo získáno $8,34 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ DNA. Na přípravu ligační směsi bylo použito 50 ng vektoru (velikost 12 kbp) a 4,4 ng insertu (358 bp). Úspěšnost ligace a správnost orientace inzertu byla potvrzena colony PCR a polyakrylamidovou elektroforézou. Pouze konstrukty s ligovaným inzertem ve správné orientaci mohou poskytnout PCR produkty (Obr. 6). 19 kolonií ze 47 testovaných poskytlo fragmenty o očekávané velikosti 358 bp u vzorku $\gamma 1:iLOV$ a 16 kolonií ze 47 testovaných poskytlo fragmenty o očekávané velikosti 865 bp u vzorku $\gamma 2:iLOV$. Vybranými konstrukty byly transformovány bakterie *A. tumefaciens* EHA 105 a úspěšnost transformace by ověřena pomocí colony PCR. Všech 22 testovaných kolonií $\gamma 1:iLOV$ i $\gamma 2:iLOV$ neslo vektor s inzertem.

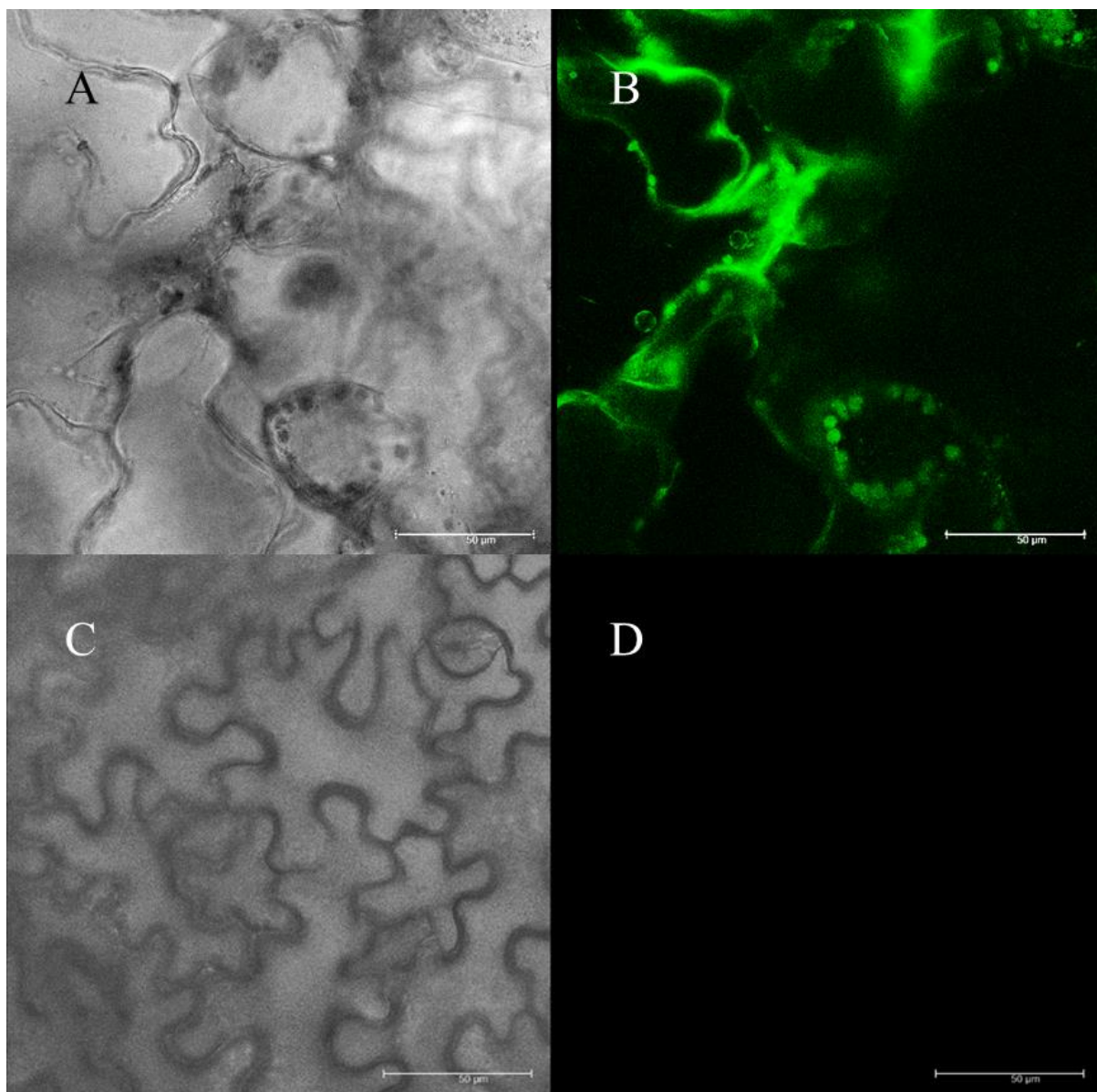


Obrázek 6: Ověření úspěšnosti transformace bakterií *E. coli* DH10a vektory $\gamma 1:iLOV$ a $\gamma 2:iLOV$ colony PCR.

M je marker relativní molekulové hmotnosti GeneRuler 100 bp. **K-** je negativní kontrola. Šipka v pozici 358 bp označuje pozitivní klony pro $\gamma 1:iLOV$ a v pozici 865 bp pozitivní klony pro $\gamma 2:iLOV$.

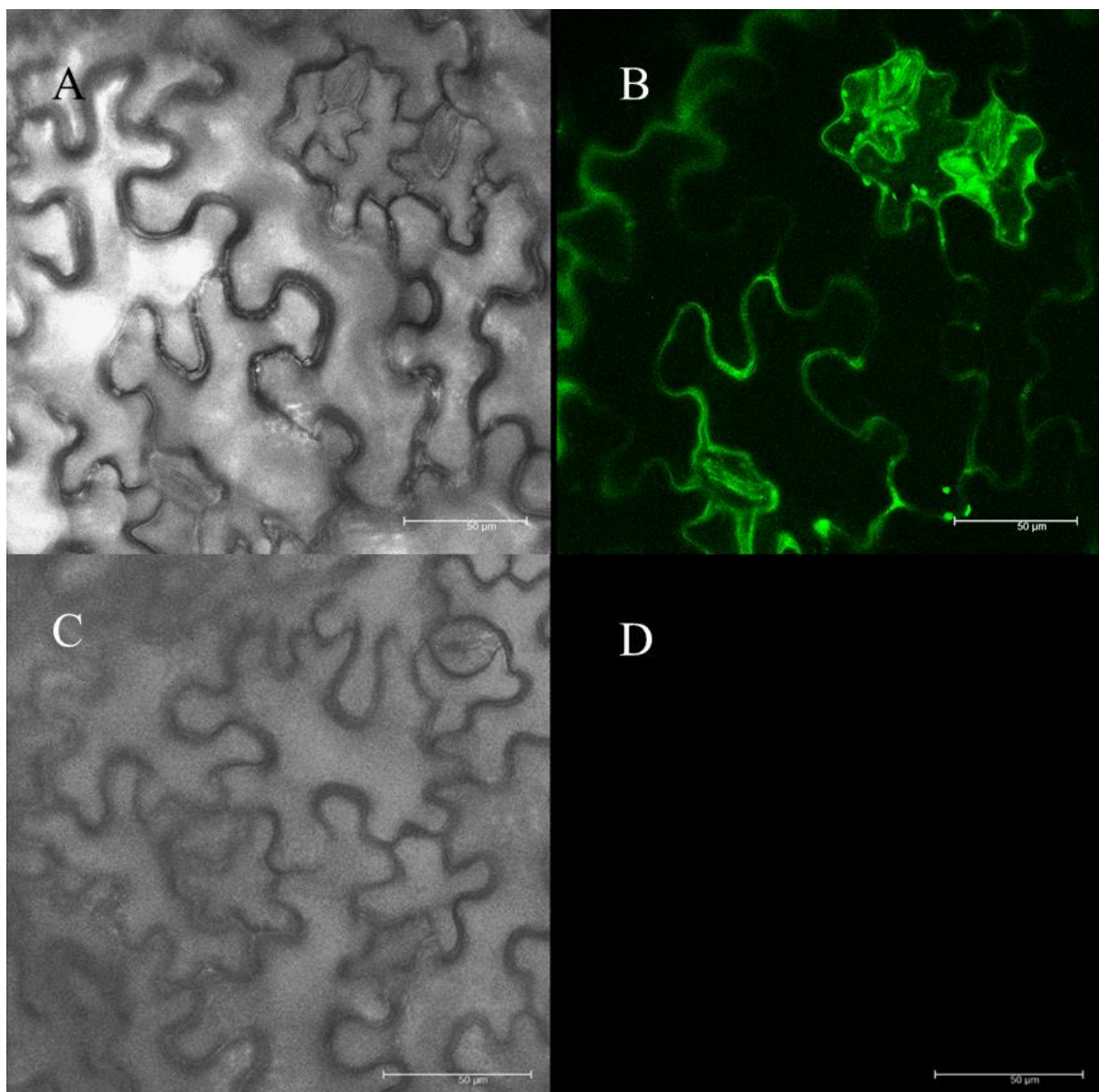
5.1.1 Ověření funkce připravených konstruktů BSMV:*iLOV* fluorescenční mikroskopii

Agroinfiltrace a následná konfokální fluorescenční mikroskopie ukázaly, že připravené virové vektory s reportérovým genem *iLOV* mají schopnost množit a šířit se ve dvouděložné rostlině *N. benthamiana* (Obr. 7 a 8), stejně jako pozitivní kontrola, kterou byl virový vektor s vloženým genem *GFP* v podjednotce $\gamma 2$ (Obr. 9). Preparáty s *iLOV* a *GFP* vykazovaly fluorescenci v emisním spektru 510–550 nm při excitaci zářením o vlnové délce 476 nm. Jako negativní kontrola sloužily preparáty z listů, které nebyly použity k agroinfiltraci, tento preparát fluorescenci ve spektru pro *iLOV* nevykazoval.



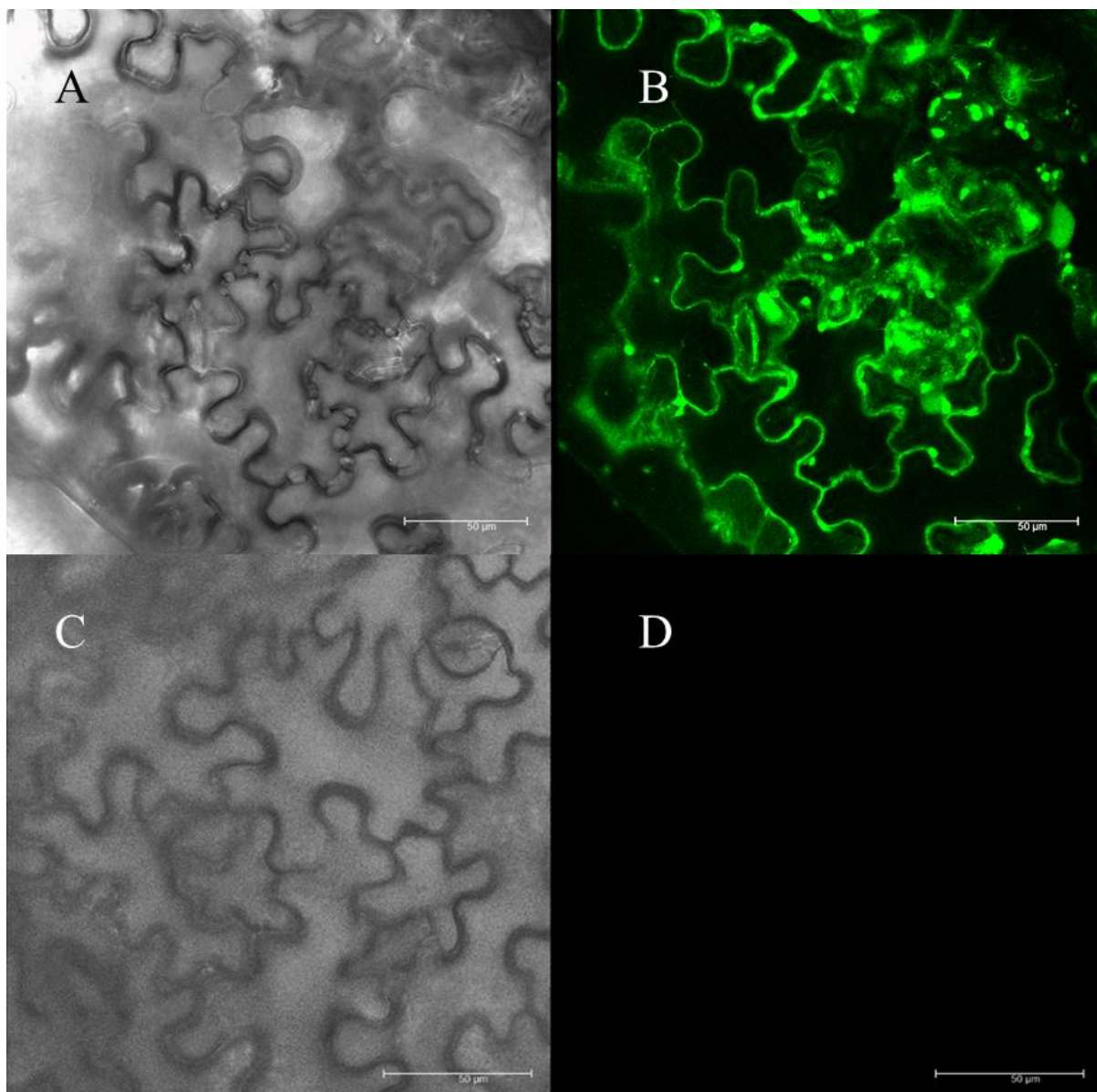
Obrázek 7: Šíření virového vektoru BSMV s modifikovanou podjednotkou $\gamma 1:iLOV$ a exprese fluorescenčního proteinu iLOV v rostlině *Nicotiana benthamiana*.

Na snímcích A a B je preparát z rostliny *N. benthamiana*, která byla agroinfiltrována virem BSMV s genem *iLOV* exprimovaným z podjednotky $\gamma 1$. A) Transmisní struktura listu. B) Fluorescenční iLOV signál exprimovaný z BSMV. C) a D) negativní kontrola, list *N. benthamiana* bez infekce. C) Transmisní struktura listu. D) potvrzuje nepřítomnost iLOV bez infekce virem. Měřítko 50 μm .



Obrázek 8: Šíření virového vektoru BSMV s modifikovanou podjednotkou $\gamma 2:iLOV$ a exprese fluorescenčního proteinu iLOV v rostlině *Nicotiana benthamiana*.

Na snímcích A a B je preparát z rostliny *N. benthamiana*, která byla agroinfiltrována virem BSMV s genem *iLOV* exprimovaným z podjednotky $\gamma 2$. A) Transmisní struktura listu. B) Fluorescenční iLOV signál exprimovaný z BSMV. C) a D) negativní kontrola, list *N. benthamiana* bez infekce. C) Transmisní struktura listu. D) potvrzuje nepřítomnost iLOV bez infekce virem. Měřítko 50 μm .



Obrázek 9: Šíření virového vektoru BSMV s modifikovanou podjednotkou $\gamma 2:GFP$ a exprese fluorescenčního proteinu GFP v rostlině *Nicotiana benthamiana*.

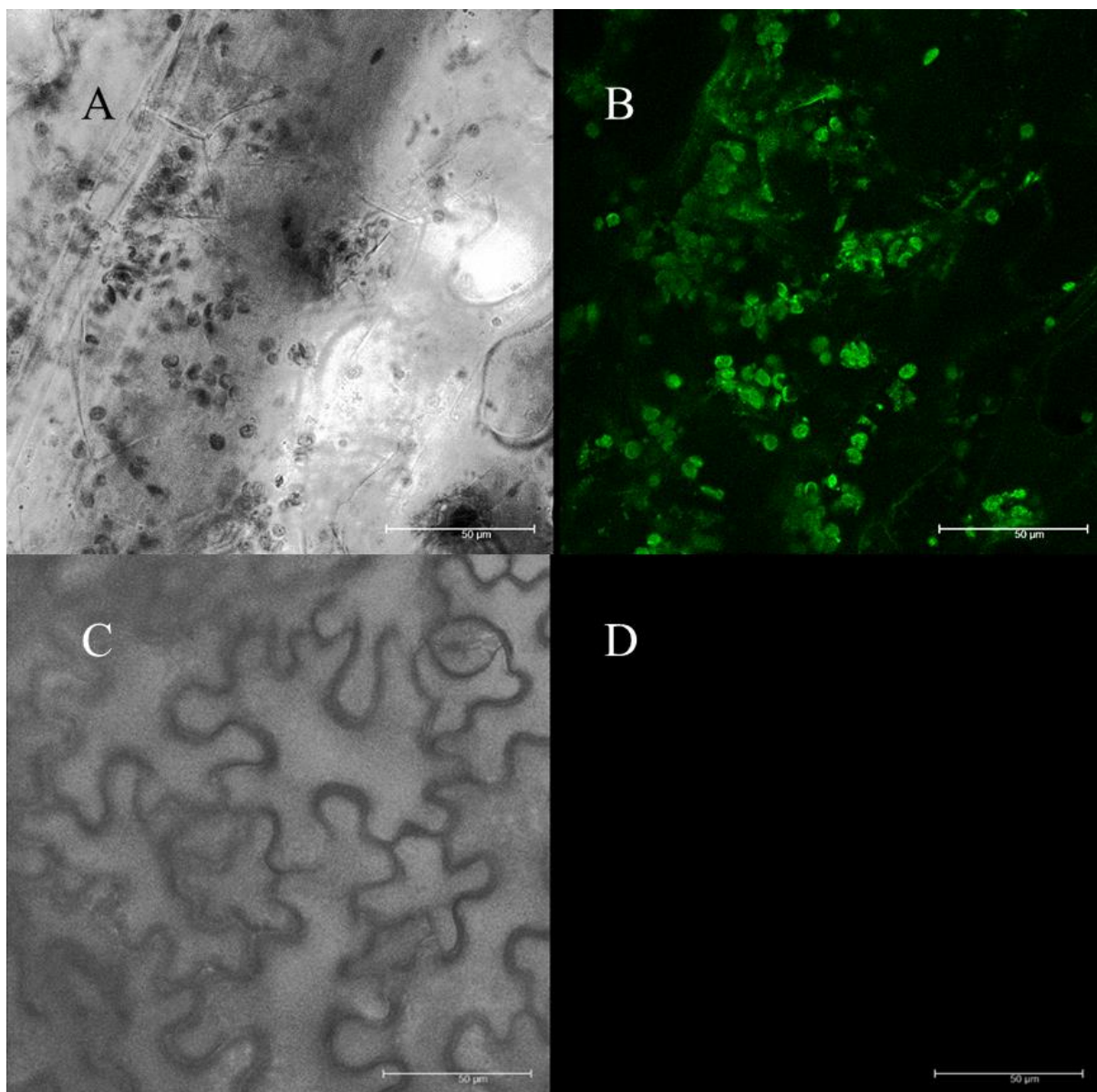
Na snímcích A a B je preparát z rostliny *N. benthamiana*, která byla agroinfiltrována virem BSMV s genem *GFP* exprimovaným z podjednotky $\gamma 2$. Tento preparát sloužil jako pozitivní kontrola. A) Transmisní struktura listu. B) Fluorescenční GFP signál exprimovaný z BSMV. Pozitivní kontrola. C) a D) negativní kontrola, list *N. benthamiana* bez infekce. C) Transmisní struktura listu. D) potvrzuje nepřítomnost GFP bez infekce virem. Měřítko 50 µm.

5.2 Příprava virového konstruktů nesoucího AVR gen

Geny *AVR_{al}* a *AVR_{al0}* byly úspěšně amplifikovány PCR reakcí. Výsledný fragment vzorku *AVR_{al0}* měl očekávanou velikost 319 bp. Fragment vzorku *AVR_{al}* měl očekávanou velikost 296 bp. Po štěpení vektoru a insertů enzymem NcoI byla připravena ligační směs složená z 50 ng vektoru (12 kb) a 4 ng insertu (cca 300 bp). Úspěšnost ligace a správná orientace vloženého insertu byla ověřena colony PCR a polyakrylamidovou elektroforézou. Z testovaných 31 kolonií neslo 10 požadovaný fragment o velikosti 296 bp u vzorku *AVR_{al}* a z 31 kolonií u vzorku *AVR_{al0}* neslo 6 požadovaný fragment o velikosti 170 bp. Sekvence produktů colony PCR ukázala, že geny *AVR_{al}* a *AVR_{al0}* byly do virového vektoru naklonovány správně. Vytvořené klony obsahovaly jak sekvenci *iLOV*, tak sekvenci genu avirulence ve správné orientaci. Z pozitivních kolonií byla izolována plazmidová DNA, která byla transformována do *A. tumefaciens* EHA 105 a úspěšnost transformace byla opět potvrzena colony PCR. Všechny 14 testovaných kolonií neslo vektor s insertem *AVR_{al}* a 14 kolonií neslo insert *AVR_{al0}*.

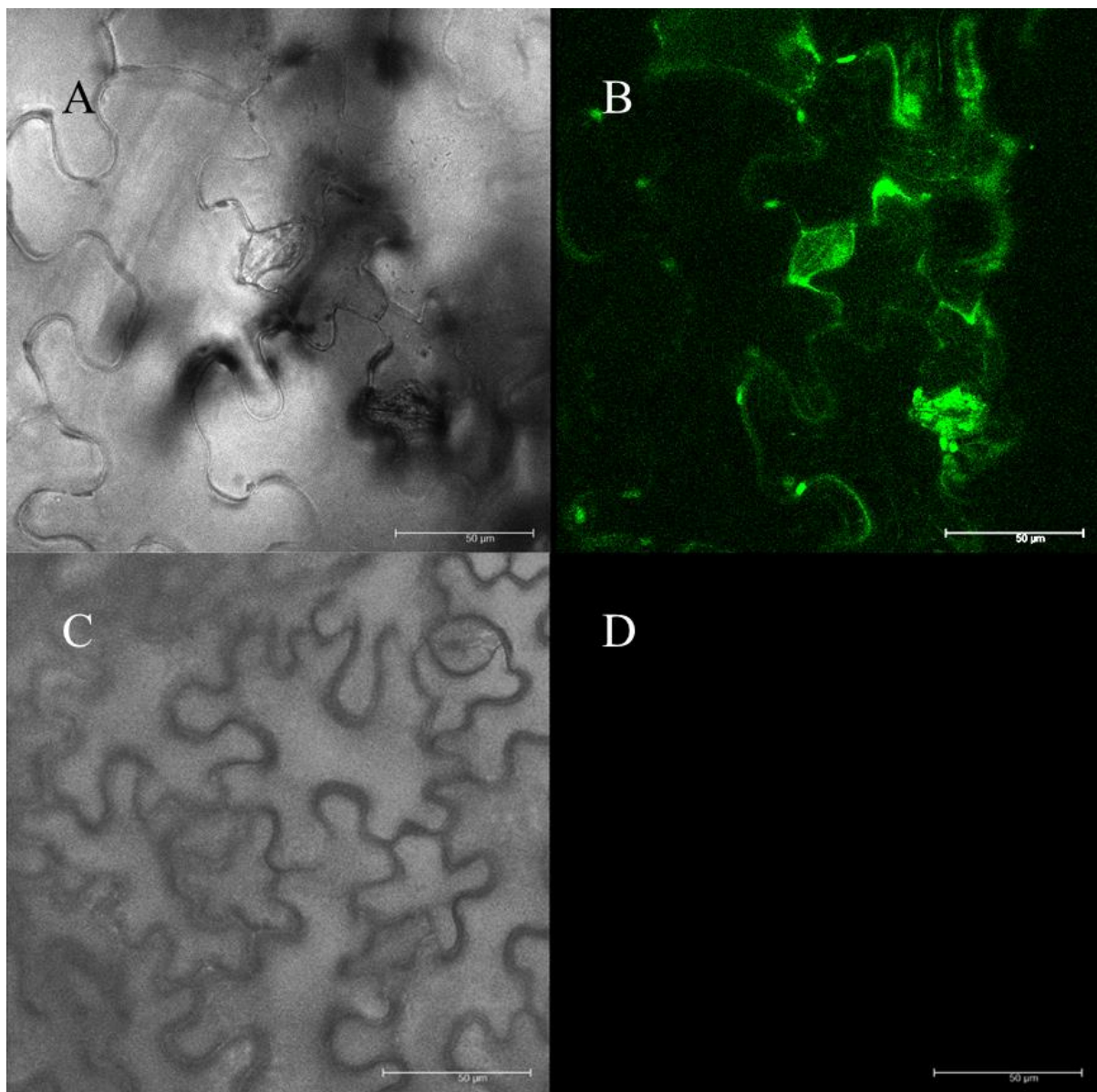
5.2.1 Ověření funkce připravených konstruktů s geny avirulence fluorescenční mikroskopií

Úspěšnost agroinfiltrace listů *N. benthamiana* byla ověřena konfokální fluorescenční mikroskopií. Preparáty listů infiltrovaných $\gamma 2:iLOV$ s inzerty *AVR_{al}* a *AVR_{al0}* vykazovaly fluorescenci v emisním spektru 510–550 nm po excitaci zářením o vlnové délce 476 nm a virové částice nesoucí virovou podjednotku $\gamma 2:iLOV$ s inzerty *AVR_{al}* a *AVR_{al0}* byly tedy schopny replikace a šíření v rostlině (Obr. 9, 10). Jako negativní kontrola byl fluorescenční mikroskopií prohlédnut preparát listů rostliny *N. benthamiana*, která nebyla použita k agroinfiltraci. Preparát negativní kontroly nevykazoval fluorescenci v emisním spektru 510–550 nm.



Obrázek 10: Infekce tabáku BSMV s modifikovanou podjednotkou $\gamma 2:iLOV$ s klonovaným genem AVR_{al} a exprese fluorescenčního proteinu iLOV v rostlině.

Na snímcích A a B je preparát z rostliny *N. benthamiana*, která byla agroinfiltrována virem BSMV s genem *iLOV* a AVR_{al} exprimovanými z podjednotky $\gamma 2$. A) Transmisní struktura listu. B) Fluorescenční signál iLOV exprimovaný z BSMV. C a D je negativní kontrola, list *N. benthamiana* bez infekce. C) Transmisní struktura listu. D) potvrzuje nepřítomnost iLOV bez infekce virem. Měřítka 50 μm .



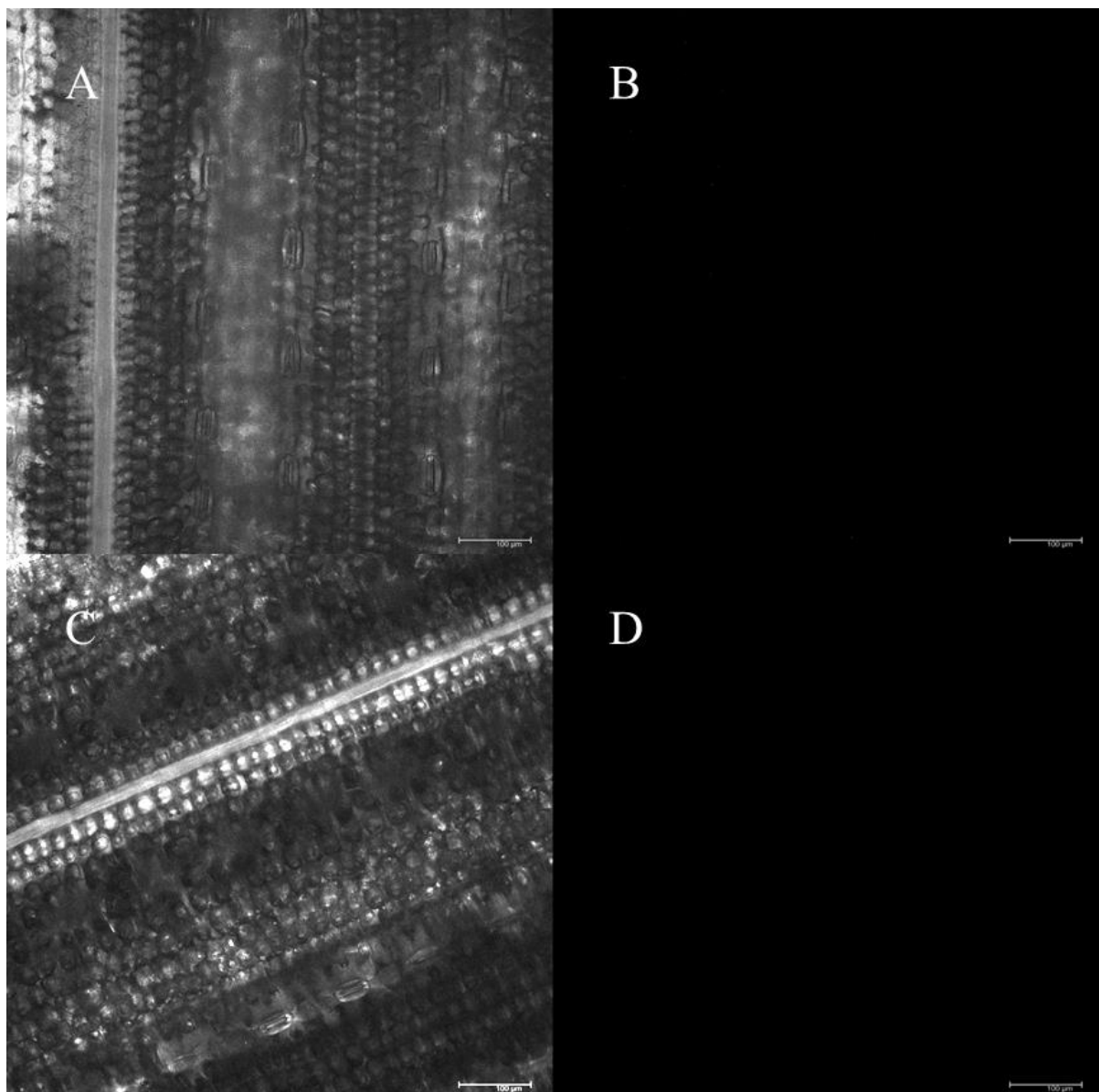
Obrázek 11: Infekce tabáku BSMV s modifikovanou podjednotkou $\gamma 2:iLOV$ s klonovaným genem AVR_{a10} a exprese fluorescenčního proteinu iLOV v rostlině.

Na snímcích A a B je preparát z rostliny *N. benthamiana*, která byla agroinfiltrována virem BSMV s genem *iLOV* a AVR_{a10} exprimovanými z podjednotky $\gamma 2$. A) Transmisní struktura listu. B) Fluorescenční signál iLOV exprimovaný z BSMV. C a D je negativní kontrola, list *N. benthamiana* bez infekce. C) Transmisní struktura listu. D) potvrzuje nepřítomnost iLOV bez infekce virem. Měřítka 50 μm .

5.2.2 Transmise virových konstruktů do ječných kultivarů

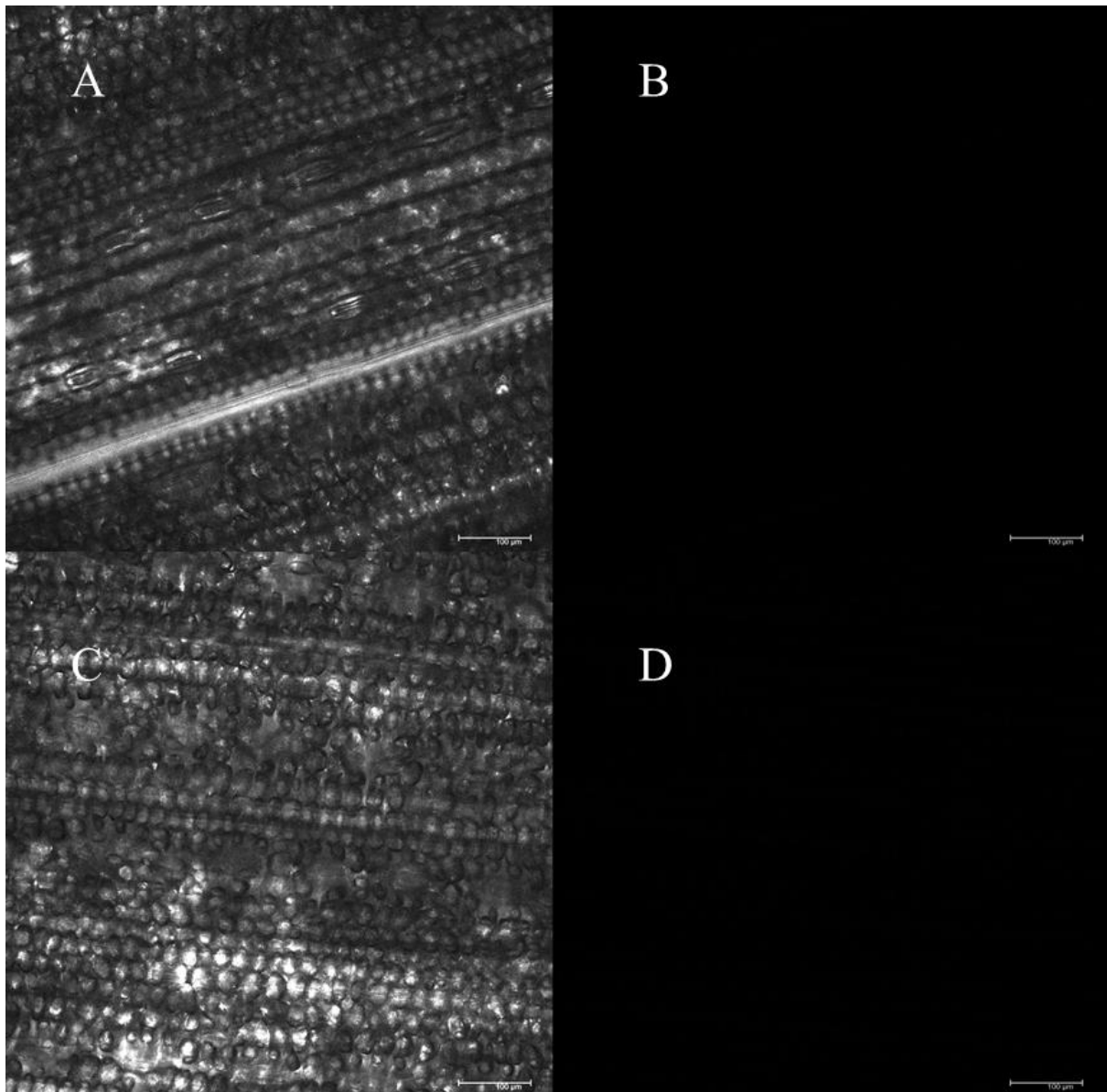
Listová abraze homogenátem z rostliny *N. bethamiana* obsahujícím virové částice BSMV s $\gamma 2:iLOV$ podjednotkou a inzerty AVR_{al} a AVR_{al0} neposkytla očekávanou hypersenzitivní reakci u ječmenných kultivarů disponujících rezistencí *Mla1* (Timori, Lumar, Algerian 3, BR-5783 a HE-2716). Místa abraze zůstala po týdnu bez reakce. Podle očekávání zůstal list po abrazi stejnými homogenáty bez hypersenzitivní reakce u citlivého kultivaru Stirling, který rezistenci *Mla1* nenesl. Místa abraze byla prohlédnuta pomocí konfokální fluorescenční mikroskopie a u žádného ze vzorků nebyl zaznamenán signál v emisním spektru pro iLOV (Obr. 12). Semena ječmenných kultivarů vystavená imbibici s virovými homogenáty obsahující vir BSMV s podjednotkami $\gamma 2:iLOV$ nesoucí inzert AVR_{al} nebo AVR_{al0} byla zasazena a po týdnu byly jejich listy prohlédnuty v konfokálním fluorescenčním mikroskopu. Ani u těchto vzorků nedošlo k hypersenzitivní reakci ani k expresi proteinu iLOV (Obr. 13).

Agroinfiltrace kultivaru Stirling suspenzí s BSMV nesoucím geny *iLOV* a AVR_{al} byla úspěšná a agroinfiltrovaný list zůstal bez hypersenzitivní reakce (Obr.16). Preparát tohoto listu poskytl signál ve spektru pro iLOV ve fluorescenčním mikroskopu (Obr. 14) Také agroinfiltrace listového mezofylu kultivaru Lumar proběhla úspěšně a v listu došlo k detekci AVR_{al} pomocí *Mla1*, to mělo za následek hypersenzitivní reakci (Obr.16) a ve fluorescenčním mikroskopu byl detekován signál pro iLOV (Obr.15). Snímky překryvů fluorescence a autofluorescence dokazují, že je protein iLOV skutečně exprimován a nejedná se o autofluorescenci.



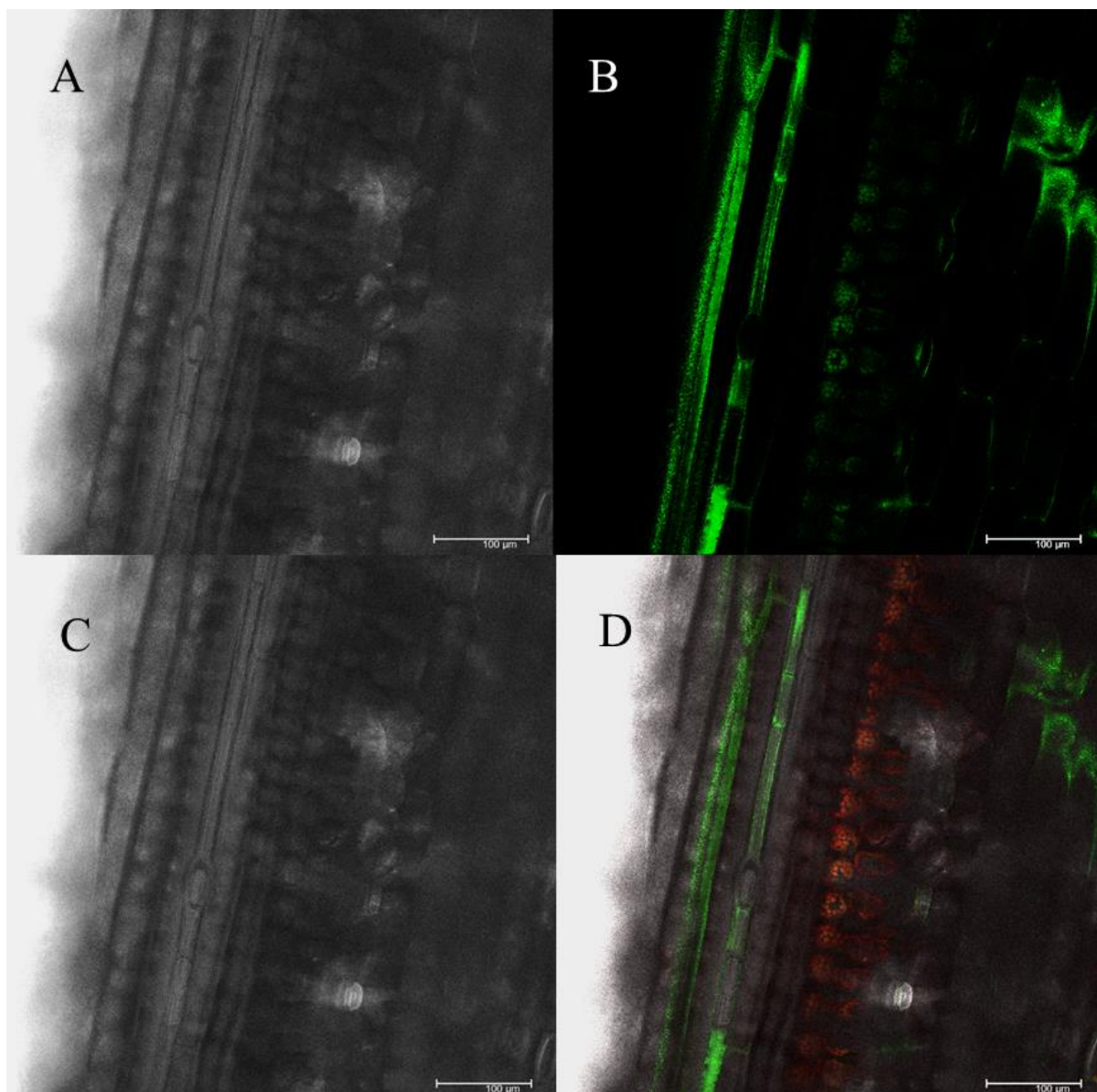
Obrázek 12: Reakce buněk listů ječmene na listovou abrazi.

Na snímcích A a B je preparát z rostliny *H. vulgare*, kultivar Timori, po listové abrazi homogenátem s virem BSMV s genem *iLOV* a *AVR_{al}* exprimovanými z podjednotky $\gamma 2$. A) Transmisní struktura listu. B) Fluorescenční signál *iLOV* exprimovaný z BSMV není přítomen. C a D je pozitivní kontrola, *H. vulgare* kultivar Stirling. C) Transmisní struktura listu. D) nepřítomnost signálu *iLOV*. Měřítko 100 μm .



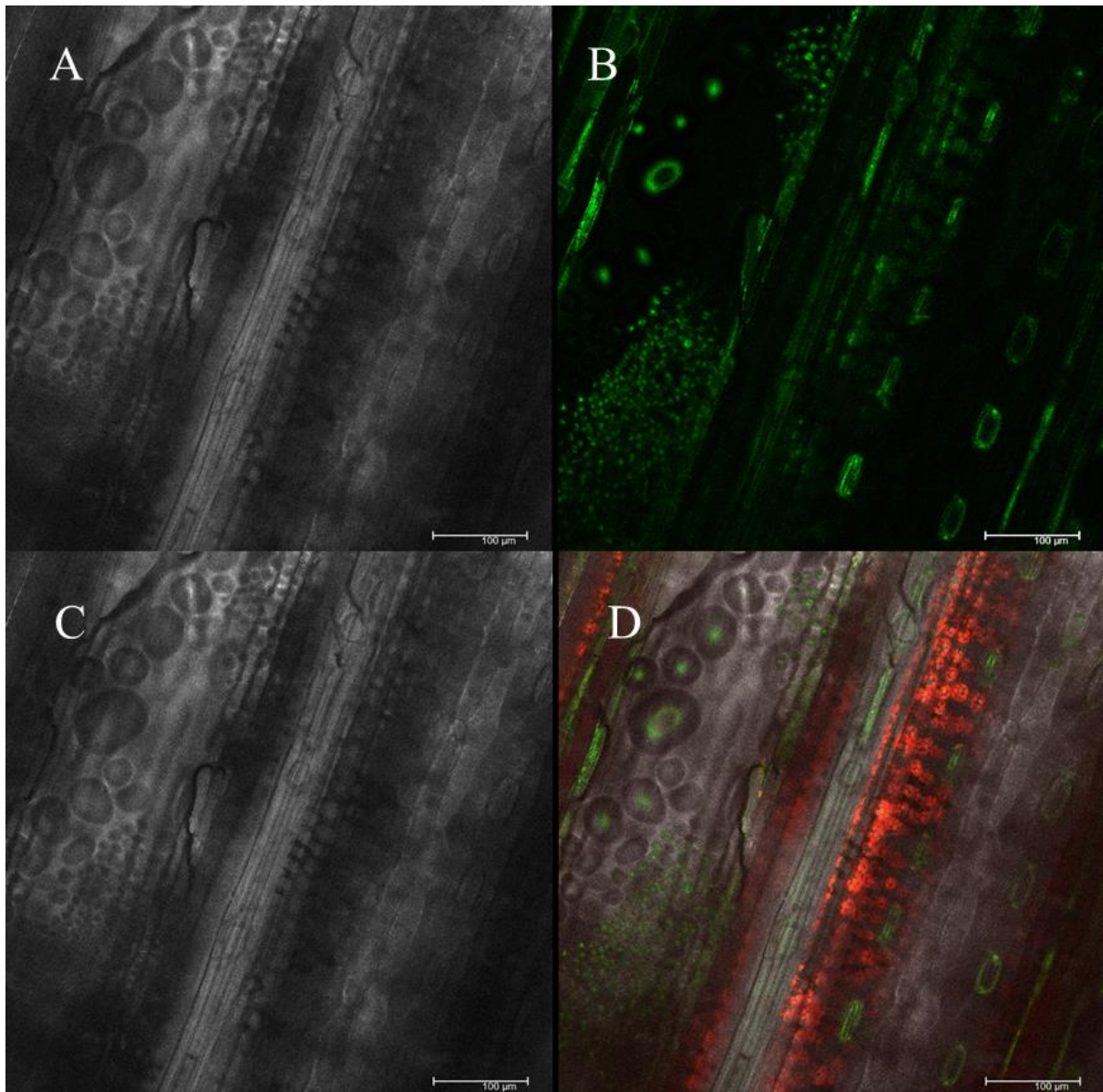
Obrázek 13: Detekce reakce buněk v listové části ječmene vystaveného imbibici.

Na snímcích A a B je preparát z rostliny *H. vulgare*, kultivar Timori, po imbibici semen homogenátem s virem BSMV s genem *iLOV* a *AVR_{ol}* exprimovanými z podjednotky $\gamma 2$. A) Transmisní struktura listu. B) Fluorescenční signál *iLOV* exprimovaný z BSMV není přítomen. C a D je pozitivní kontrola, *H. vulgare* kultivar Stirling. C) Transmisní struktura listu. D) nepřítomnost signálu *iLOV*. Měřítko 100 μm .



Obrázek 14: Detekce signálu iLOV v ječmenném kultivaru Stirling po agroinfiltraci mezofylu.

Na snímcích je preparát z rostliny *H. vulgare*, kultivar Stirling, po agroinfiltraci listového mezofylu virem BSMV s genem *iLOV* a *AVR_{at}*. A) a C) Transmisní struktura listu. B) Fluorescenční signál iLOV. D) Překryv signálů fluorescence a autofluorescence. Měřítko 100 µm.



Obrázek 15: Detekce signálu iLOV v ječmenném kultivaru Lumar po agroinfiltraci mezofylu.

Na snímcích je preparát z rostliny *H. vulgare*, kultivar Lumar, po agroinfiltraci listového mezofylu virem BSMV s genem *iLOV* a *AVR_{at}*. A) a C) Transminí struktura listu. B) Fluorescenční signál iLOV. D) Překryv signálů fluorescence a autofluorescence. Měřítko 100 µm.



Obrázek 16: Snímky listů ječmenů Stirling a Lumar po agroinfiltraci.

1) Símek listu ječmene Stirling po agroinfiltraci mezofylu virem BSMV s *iLOV* a *AVR_{al}*. V listu nedošlo k hypersenzitivní reakci. 2) Snímek listu kultivaru Lumar po agroinfiltraci virem BSMV s *iLOV* a *AVR_{al}*. V listu došlo k hypersenzitivní reakci.

6 DISKUZE

Hlavní náplní této bakalářské práce bylo pomocí virového vektoru BSMV nesoucího reportérový fluorescenční gen *iLOV* validovat kandidátní geny avirulence padlí travního *AVR_{al}*, *AVR_{a3}* a *AVR_{a10}* na ječmenných kultivarech. V předešlých pokusech laboratoře Mgr. Eva Janáková, Ph.D pomocí GWAS identifikovala několik kandidátních *AVR* genů. Mezi nimi i *AVR_{al}*, *AVR_{a3}* a *AVR_{a10}*. Tyto geny jsou rozpoznávané geny rezistence z *Mla* rodiny. *AVR_{al}* byl již jako gen avirulence potvrzen v práci Lu *et al.*, (2016) a také v naší laboratoři byla prokázána interakce mezi *AVR_{al}* a *Mla1* geny. Bohužel, kandidátní geny pro *AVR_{a3}* a *AVR_{a10}* nevykázali žádnou interakci s *Mla3* a *Mla10* geny. Jsou dvě nejpravděpodobnější hypotézy proč se tak nestalo. Zaprvé geny potřebují nějaké kofaktory k interakci. Takovéto kofaktory pro geny rezistence již byly popsány (Bourras *et al.*, 2016). Druhou možností je, že identifikované kandidátní geny nejsou *AVR_{a3}* a *AVR_{a10}*. Pro validaci první hypotézy je potřeba exprimovat *AVR* kandidáta v rostlině ječmenu s příslušným genem rezistence. Transformace obilovin je relativně obtížná a silně kultivarově specifická, proto jsme se rozhodli použít VIGS s použitím BSMV který je schopen infikovat široké spektrum hostitelských rostlin a jejich kultivarů (Jackson *et al.*, 1989).

Vir BSMV je za normálních okolností složen jen ze tří genomových podjednotek a v takové podobě je využíván k VIGS například v pracích Yuana *et al.* (2011) a Holzberg *et al.* (2002). Třípodjednotkový BSMV však umožňuje klonování jen menších inzertů kolem 140–500 bp (Lee *et al.*, 2012), naproti tomu vytvoření čtyřpodjednotkového vektoru BSMV pod silným promotorem 2x35S (double *Cauliflower mosaic virus* 35S promotor) Cheukem a Houdem (2019) umožnilo klonování větších inzertů o velikosti až 2106–2448 bp (Cheuk a Houde, 2019) a rovnoměrnější a systematictější šíření virových podjednotek. Tento systém využívá jako reportérový gen *GFP*. Prvním krokem této práce bylo vyměnit *GFP* za fluorescenční gen *iLOV* v $\gamma 1$ a $\gamma 2$ podjednotkách, pro zvýšení jejich kapacity. Gen *iLOV* byl vybrán kvůli jeho poloviční velikosti oproti genu *GFP* a větší stabilitě (Chapman *et al.*, 2008). *iLOV* byl úspěšně vložen do podjednotek $\gamma 1$ a $\gamma 2$ a schopnost šíření viru v rostlině byla ověřena v *N. benthamiana*. Množení viru mělo za následek expresi fluorescenčního proteinu *iLOV* nejen v místě agroinfiltrace (Obr. 7 a 8), ale i v jiných částech rostliny. Fluorescenční signál a jeho distribuce byly porovnatelné s distribucí BSMV s *GFP* (Obr. 9). Tyto pozorování jsou v souladu se zjištěními Cheukem a Houdem (2019) o množení a šíření čtyřpodjednotkového BSMV, to znamená, že upravený vektor je připravený k použití.

Pro test funkce viru jako vektoru přenosu *AVR* genů do obilovin a prokázání jejich funkce byly geny virulence *AVR_{al}* vloženy do $\gamma 2$ podjednotky. Schopnost replikace a šíření virového konstruktů BSMV s podjednotkou $\gamma 2:iLOV:AVR_{al}$ a $\gamma 2:iLOV:AVR_{a10}$ byla potvrzena na *N. benthamiana*. Získaný fluorescenční signál byl slabší po vložení *AVR* genu (Obr.10 a 11) než při použití samotného *iLOV* (Obr.7 a 8). Ve své práci Cheuk a Houde (2019) zmiňují sníženou mobilitu a šíření virového vektoru při klonování více inzertů, proto se výměna *GFP* za *iLOV*, a tím snížení zátěže $\gamma 2$ podjednotky, ukázala jako správné rozhodnutí.

Pro kontrolu funkčnosti *AVR* genu přeneseného do rezistentního kultivaru pomocí BSMV byl použit *AVR_{al}* gen. Gen byl přenášen do ječného kultivaru Timori nesoucího gen rezistence *Mla1*. Jako kontrola byl použitý kultivar Stirling, který geny rezistence z rodiny *Mla* nedisponuje (Dreiseitl a Platz, 2012). Přenos probíhal metodami listové abraze a imbibice semen, které ve své práci použili i Cheuk a Houde (2017). Očekávalo se, že u kultivarů s rezistencí *Mla1* dojde po kontaktu s efektorovým proteinem *AVR_{al}* k hypersenzitivní reakci, jak tomu bylo v práci Lu *et al.* (2016). Listová abraze ani imbibice však neposkytly očekávané výsledky. Ačkoliv bylo pro imbibici použito stejné ředění virového homogenátu agroinfiltrovaných listů, jaké doporučují Cheuk a Houde (2017), nedošlo k expresi proteinů z virového konstruktů BSMV (Obr. 13). Obě metody byly v naší laboratoři úspěšně vyzkoušené v diplomové práci Mgr. Venduly Weissové (2020). Možným vysvětlením by mohla být nízká koncentrace virových částic nebo jejich snížená mobilita. Důvodem pro neúspěch listové abraze by mohlo být nedostatečné narušení listové kutikuly, což mohlo znemožnit, aby se virové konstrukty dostaly do cílové rostliny nebo jich nebyl dostatek, jak bylo zmíněno výše. Obě metody budou dále optimalizovány.

Další metodou infekce ječných kultivarů byla agroinfiltrace přímo v listovém mezofylu. Infiltrace citlivého kultivaru Stirling nezpůsobila na listech žádnou změnu, na druhé straně infiltrace do listu rezistentního kultivaru Lumar způsobila jasnou hypersenzitivní reakci (Obr. 16). Podobnou reakci pozorovali Lu *et al.* (2016) kteří exprimovali gen virulence *AVR_{al}* v rezistentním kultivaru Manchuria nesoucím *Mla1* gen. Tímto jsme prokázali, že je možné sledovat interakci *AVR* a genu rezistence přímo v listech ječmene přeneseného virem BSMV. Testování funkce *AVR_{a3}* a *AVR_{al0}* bude předmětem další práce.

7 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo vytvořit virový vektor vhodný k validaci funkce kandidátních genů avirulence AVR_{a3} a AVR_{a10} získaných GWAS analýzou z patogenu padlí travní.

Jako virový vektor byl vybrán čtyřpodjednotkový vektor BSMV, a jeho γ podjednotky byly doplněny o malý referenční fluorescenční gen *iLOV*. Schopnost replikace a šíření tohoto konstruktů byla ověřena v rostlině *N. benthamiana* pomocí fluorescenční mikroskopie.

Do podjednotky $\gamma 2:iLOV$ byly pro validaci přístupu klonovány AVR_{al} gen a kandidát na gen AVR_{a10} . Agroinfiltrace rostliny *N. benthamiana* ověřila funkčnost vektorů s inzerty. Byl připraven virový homogenát z infikovaných rostlin, který byl dále použit pro transmissi virových konstruktů do ječmenných kultivarů pomocí metod listové abraze a imbibice. Listová abraze ani imbibice z neznámých důvodů neposkytly očekávané výsledky a budou dále optimalizovány.

Vir s AVR_{al} byl také agroinfiltrován přímo do listů ječmene a tato metoda potvrdila funkčnost viru v ječmenu a expresi *AVR* genu která se projevila hypersenzitivní reakcí. VIGS se ukázala jako velmi slibná metoda transferu *AVR* kandidátů přímo do ječmene pro validaci jejich funkce.

8 LITERATURA

- Ascencio-Ibañez, J. T., a Settlege, S. B. (2007). DNA abrasion onto plants is an effective method for geminivirus infection and virus-induced gene silencing. *Journal of Virological Methods*, 142(1–2), 198–203. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2007.01.031>
- Bancroft, J. B., Rouleau, M., Johnston, R., Prins, L., a Mackie, G. A. (1991). The entire nucleotide sequence of foxtail mosaic virus RNA. *Journal of General Virology*, 72(9), 2173–2181. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-72-9-2173>
- Barampuram, S., a Zhang, Z. J. (2010). Recent Advances in Plant Transformation. *Methods in Molecular Biology*, 1–35. https://doi.org/10.1007/978-1-61737-957-4_1
- Becker, A., a Lange, M. (2010). VIGS – genomics goes functional. *Trends in Plant Science*, 15(1), 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.09.002>
- Bonas, U. (1998). 5.4 Avirulence Genes. *Methods in Microbiology*, 149–155. [https://doi.org/10.1016/s0580-9517\(08\)70278-2](https://doi.org/10.1016/s0580-9517(08)70278-2)
- Both, M., a Spanu, P. D. (2018). Blumeria Graminisf. sp.Hordei, an Obligate Pathogen of Barley. *Annual Plant Reviews Online*, 202–218. <https://doi.org/10.1002/9781119312994.apr0108>
- Bourras, S., McNally, K. E., Müller, M. C., Wicker, T., a Keller, B. (2016). Avirulence Genes in Cereal Powdery Mildews: The Gene-for-Gene Hypothesis 2.0. *Frontiers in Plant Science*, 7, 241. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00241>
- Bouton, C., King, R. C., Chen, H., Azhakanandam, K., Bieri, S., Hammond-Kosack, K. E., a Kanyuka, K. (2018). Foxtail mosaic virus: A Viral Vector for Protein Expression in Cereals. *Plant Physiology*, 177(4), 1352–1367. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01679>
- Bradshaw, J. E. (2016). *Plant Breeding: Past, Present and Future* (1st ed. 2016 ed.). Springer.
- Bragg, J. N., Lawrence, D. M., a Jackson, A. O. (2004). The N-Terminal 85 Amino Acids of the Barley Stripe Mosaic Virus γ b Pathogenesis Protein Contain Three Zinc-Binding Motifs. *Journal of Virology*, 78(14), 7379–7391. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.14.7379-7391.2004>
- Dreiseitl, A., a Platz, G. (2012). Powdery mildew resistance genes in barley varieties grown in Australia. *Crop and Pasture Science*, 63(10), 997. <https://doi.org/10.1071/cp12165>
- Dreiseitl, A. (2017). Genes for resistance to powdery mildew in European barley cultivars registered in the Czech Republic from 2011 to 2015. *Plant Breeding*, 136(3), 351–356. <https://doi.org/10.1111/pbr.12471>

- Freialdenhoven, A., Peterhansel, C., Kurth, J., Kreuzaler, F., a Schulze-Lefert, P. (1996). Identification of Genes Required for the Function of Non-Race-Specific mlo Resistance to Powdery Mildew in Barley. *The Plant Cell*, 5–14. <https://doi.org/10.1105/tpc.8.1.5>
- Chapman, S., Faulkner, C., Kaiserli, E., Garcia-Mata, C., Savenkov, E. I., Roberts, A. G., Oparka, K. J., a Christie, J. M. (2008). The photoreversible fluorescent protein iLOV outperforms GFP as a reporter of plant virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(50), 20038–20043. <https://doi.org/10.1073/pnas.0807551105>
- Cheuk, A., a Houde, M. (2017). A rapid and efficient method for uniform gene expression using the barley stripe mosaic virus. *Plant Methods*, 13(1), 24. <https://doi.org/10.1186/s13007-017-0175-5>
- Cheuk, A., a Houde, M. (2019). A New Barley Stripe Mosaic Virus Allows Large Protein Overexpression for Rapid Function Analysis. *Plant Physiology*, 176(3), 1919–1931. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01412>
- Glawe, D. A. (2008). The Powdery Mildews: A Review of the World’s Most Familiar (Yet Poorly Known) Plant Pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 46(1), 27–51. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.46.081407.104740>
- Gleba, Y., Marillonnet, S., a Klimyuk, V. (2004). Engineering viral expression vectors for plants: the ‘full virus’ and the ‘deconstructed virus’ strategies. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(2), 182–188. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2004.01.003>
- Godfrey, D., Böhlenius, H., Pedersen, C., Zhang, Z., Emmersen, J., a Thordal-Christensen, H. (2010). Powdery mildew fungal effector candidates share N-terminal Y/F/WxC-motif. *BMC Genomics*, 11(1), 317. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-317>
- Holzberg, S., Brosio, P., Gross, C., a Pogue, G. P. (2002). Barley stripe mosaic virus-induced gene silencing in a monocot plant. *The Plant Journal*, 30(3), 315–327. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2002.01291.x>
- Houterman, P. M., Cornelissen, B. J. C., a Rep, M. (2008). Suppression of Plant Resistance Gene-Based Immunity by a Fungal Effector. *PLoS Pathogens*, 4(5), e1000061. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000061>
- Jackson, A. O., Hunter, B. G., a Gustafson, G. D. (1989). Hordeivirus Relationships and Genome Organization. *Annual Review of Phytopathology*, 27(1), 95–121. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.27.090189.000523>
- Jackson, A. O., Lim, H.-S., Bragg, J., Ganesan, U., a Lee, M. Y. (2009). Hordeivirus Replication, Movement, and Pathogenesis. *Annual Review of Phytopathology*, 47(1), 385–422. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080508-081733>

- Jørgensen, J. H. (1992). Discovery, characterization and exploitation of Mlo powdery mildew resistance in barley. *Euphytica*, 63(1–2), 141–152. <https://doi.org/10.1007/bf00023919>
- Jørgensen, J. H., a Wolfe, M. (1994). Genetics of Powdery Mildew Resistance in Barley. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 13(1), 97–119. <https://doi.org/10.1080/07352689409701910>
- Kumagai, M. H., Donson, J., della-Cioppa, G., Harvey, D., Hanley, K., a Grill, L. K. (1995). Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(5), 1679–1683. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.5.1679>
- Lawrence, D. M., a Jackson, A. O. (2001). Interactions of the TGB1 Protein during Cell-to-Cell Movement of Barley Stripe Mosaic Virus. *Journal of Virology*, 75(18), 8712–8723. <https://doi.org/10.1128/jvi.75.18.8712-8723.2001>
- Lee, W.-S., Hammond-Kosack, K. E., a Kanyuka, K. (2012). Barley Stripe Mosaic Virus-Mediated Tools for Investigating Gene Function in Cereal Plants and Their Pathogens: Virus-Induced Gene Silencing, Host-Mediated Gene Silencing, and Virus-Mediated Overexpression of Heterologous Protein. *Plant Physiology*, 160(2), 582–590. <https://doi.org/10.1104/pp.112.203489>
- Lico, C., Chen, Q., a Santi, L. (2008). Viral vectors for production of recombinant proteins in plants. *Journal of Cellular Physiology*, 216(2), 366–377. <https://doi.org/10.1002/jcp.21423>
- Lim, H.-S., Bragg, J. N., Ganesan, U., Lawrence, D. M., Yu, J., Isogai, M., Hammond, J., a Jackson, A. O. (2008). Triple Gene Block Protein Interactions Involved in Movement of Barley Stripe Mosaic Virus. *Journal of Virology*, 82(10), 4991–5006. <https://doi.org/10.1128/jvi.02586-0>
- Liu, Z., a Kearney, C. M. (2010). An efficient Foxtail mosaic virus vector system with reduced environmental risk. *BMC Biotechnology*, 10(1), 88. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-10-88>
- Lu, R. (2003). Virus-induced gene silencing in plants. *Methods*, 30(4), 296–303. [https://doi.org/10.1016/s1046-2023\(03\)00037-9](https://doi.org/10.1016/s1046-2023(03)00037-9)
- Lu, X., Kracher, B., Saur, I. M. L., Bauer, S., Ellwood, S. R., Wise, R., Yaeno, T., Maekawa, T., a Schulze-Lefert, P. (2016). Allelic barley MLA immune receptors recognize sequence-unrelated avirulence effectors of the powdery mildew pathogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(42), E6486–E6495. <https://doi.org/10.1073/pnas.1612947113>
- Mei, Y., Zhang, C., Kernodle, B. M., Hill, J. H., a Whitham, S. A. (2016). A Foxtail mosaic virus Vector for Virus-Induced Gene Silencing in Maize. *Plant Physiology*, pp.00172.2016. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00172>
- Nowara, D., Gay, A., Lacomme, C., Shaw, J., Ridout, C., Douchkov, D., Hensel, G., Kumlehn, J., a Schweizer, P. (2010). HIGS: Host-Induced Gene Silencing in the Obligate Biotrophic Fungal Pathogen *Blumeria graminis*. *The Plant Cell*, 22(9), 3130–3141. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.077040>

- Pedersen, C., van Themaat, E. V. L., McGuffin, L. J., Abbott, J. C., Burgis, T. A., Barton, G., Bindschedler, L. V., Lu, X., Maekawa, T., Weßling, R., Cramer, R., Thordal-Christensen, H., Panstruga, R., a Spanu, P. D. (2012). Structure and evolution of barley powdery mildew effector candidates. *BMC Genomics*, 13(1), 694. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-694>
- Petit-Houdenot, Y., a Fudal, I. (2017). Complex Interactions between Fungal Avirulence Genes and Their Corresponding Plant Resistance Genes and Consequences for Disease Resistance Management. *Frontiers in Plant Science*, 8(1072), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01072>
- Petty, I. T., French, R., Jones, R. W., a Jackson, A. O. (1990). Identification of barley stripe mosaic virus genes involved in viral RNA replication and systemic movement. *The EMBO Journal*, 9(11), 3453–3457. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1990.tb07553.x>
- Qi, T., Guo, J., Peng, H., Liu, P., Kang, Z., a Guo, J. (2019). Host-Induced Gene Silencing: A Powerful Strategy to Control Diseases of Wheat and Barley. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(1), 206. <https://doi.org/10.3390/ijms20010206>
- Rep, M. (2005). Small proteins of plant-pathogenic fungi secreted during host colonization. *FEMS Microbiology Letters*, 253(1), 19–27. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.09.014>
- Ridout, C. J., Skamnioti, P., Porritt, O., Sacristan, S., Jones, J. D. G., a Brown, J. K. M. (2006). Multiple Avirulence Paralogues in Cereal Powdery Mildew Fungi May Contribute to Parasite Fitness and Defeat of Plant Resistance. *The Plant Cell*, 18(9), 2402–2414. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.043307>
- Robertson, N. L., French, R., a Morris, T. J. (2000). The open reading frame 5A of foxtail mosaic virus is expressed in vivo and is dispensable for systemic infection. *Archives of Virology*, 145(8), 1685–1698. <https://doi.org/10.1007/s007050070084>
- Rouxel, T., a Balesdent, M.-H. (2010). Avirulence Genes. *Encyclopedia of Life Sciences*, 1–13. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0021267>
- Schulze-Lefert, P., a Vogel, J. (2000). Closing the ranks to attack by powdery mildew. *Trends in Plant Science*, 5(8), 343–348. [https://doi.org/10.1016/s1360-1385\(00\)01683-6](https://doi.org/10.1016/s1360-1385(00)01683-6)
- Skamnioti, P., Pedersen, C., Al-Chaarani, G. R., Holefors, A., Thordal-Christensen, H., Brown, J. K. M., a Ridout, C. J. (2008). Genetics of avirulence genes in *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* and physical mapping of AVR_{a22} and AVR_{a12}. *Fungal Genetics and Biology*, 45(3), 243–252. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2007.09.011>
- SOLOVYEV, A. G., SAVENKOV, E. I., AGRANOVSKY, A. A., a MOROZOV, S. Y. U. (1996). Comparisons of the Genomic Elements and Coding Regions in RNA β Components of the Hordeiviruses Barley Stripe Mosaic Virus, Lychnis Ringspot Virus, and Poa Semilatifolius Virus. *Virology*, 219(1), 9–18. <https://doi.org/10.1006/viro.1996.0217>

- Stergiopoulos, I., a de Wit, P. J. G. M. (2009). Fungal Effector Proteins. *Annual Review of Phytopathology*, 47(1), 233–263. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.112408.132637>
- Travella, S., Ross, S. M., Harden, J., Everett, C., Snape, J. W., a Harwood, W. A. (2004). A comparison of transgenic barley lines produced by particle bombardment and Agrobacterium-mediated techniques. *Plant Cell Reports*, 23(12), 780–789. <https://doi.org/10.1007/s00299-004-0892-x>
- Tzfira, T., a Citovsky, V. (2006). Agrobacterium-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 17(2), 147–154. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2006.01.009>
- Van der Plank, J. E. (1968). Disease resistance in plants. New York (N.Y.): Academic press.
- van Kan, J. A. L. (1991). Cloning and Characterization of cDNA of Avirulence Geneavr9of the Fungal PathogenCladosporium fulvum, Causal Agent of Tomato Leaf Mold. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 4(1), 52. <https://doi.org/10.1094/mpmi-4-052>
- Waterhouse, P. M., a Helliwell, C. A. (2003). Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing. *Nature Reviews Genetics*, 4(1), 29–38. <https://doi.org/10.1038/nrg982>
- Yuan, C., Li, C., Yan, L., Jackson, A. O., Liu, Z., Han, C., Yu, J., & Li, D. (2011). A High Throughput Barley Stripe Mosaic Virus Vector for Virus Induced Gene Silencing in Monocots and Dicots. *PLoS ONE*, 6(10), e26468. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026468>