

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Úprava genů rostlin zprostředkovaná rostlinnými viry

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Vendula Weissová
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biotechnologie a genové inženýrství
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Miroslav Valárik, Ph.D.
Rok:	2020

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne

Ráda bych poděkovala Mgr. Miroslavu Valárikovi, Ph.D. za jeho odborné vedení, rady, trpělivost a čas při zpracování této diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat Bc. Zuzaně Korchanové, Mgr. Lucii Bílkové a Mgr. Alžbětě Němečkové za pomoc při provádění experimentů. A v neposlední řadě děkuji prof. Ing. Jaroslavu Doleželovi, DrSc. za možnost vypracovat diplomovou práci na Ústavu experimentální botaniky AV ČR v.v.i. v Olomouci.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Vendula Weissová
Název práce	Úprava genů rostlin zprostředkovaná rostlinnými viry
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	ÚEB AV ČR, Centrum strukturní a funkční genomiky
Vedoucí práce	Mgr. Miroslav Valárik, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2020

Abstrakt

Předkládaná diplomová práce se zaměřuje na možnosti využití viru *Barley stripe mosaic virus* (BSMV) pro vnášení cizorodé DNA do obilovin. Cílem experimentální části této práce bylo navýšení kapacity viru použitím reportérového genu *iLOV* (~ 336 bp), který byl zaklonován do dvou podjednotek genomu viru (γ_1 a γ_2). Dále byla provedena elektroporace bakterie *Agrobacterium tumefaciens* (kmen EHA105) za účelem následné agroinfiltrace *Nicotiana benthamiana*. Z infiltrovaných listů *N. benthamiana* byl zhotoven virový homogenát, který sloužil k infekci vybraných kultivarů pšenice a ječmene pomocí dvou rozličných metod – abraze listů a imbibice semen. Z celkem 8 kultivarů infikovaných metodou abraze listů bylo 7 vyhodnoceno jako pozitivní (tedy infikovatelné virem BSMV). V případě 2 kultivarů lze hovořit rovněž o šíření viru rostlinou. Metodou imbibice semen byly infikovány 4 kultivary, z nichž u 2 byla potvrzena infikovatelnost virem BSMV.

Klíčová slova	Pšenice, BSMV, editace genomu, VIGS, <i>iLOV</i> .
Počet stran	65
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Vendula Weissová
Title	Gene editing mediated by plant viruses
Type of thesis	Diploma
Department	Institute of Experimental Botany, Czech Academy of Sciences, Centre of Structural and Functional Genomics
Supervisor	Mgr. Miroslav Valárik, Ph.D.
The year of presentation	2020

Abstract

The presented diploma thesis focuses on the possibility of using the *Barley stripe mosaic virus* (BSMV) for the introduction of foreign DNA into cereals. The aim of the experimental part was to increase the capacity of the virus using the reporter gene *iLOV* (~ 336 bp), which was cloned into two subunits of the virus genome ($\gamma 1$ and $\gamma 2$). Furthermore, electroporation of *Agrobacterium tumefaciens* (strain EHA105) was performed for subsequent agroinfiltration of *Nicotiana benthamiana*. A viral homogenate was made from infiltrated *N. benthamiana* leaves, which was used to infect selected wheat and barley cultivars using two different methods – leaf abrasion and seed imbibition. Out of a total of 8 cultivars infected by the leaf abrasion method, 7 were evaluated as positive (ie infectable by the BSMV virus). In the case of 2 cultivars, it is also possible to speak of the spread of the virus in the plant. 4 cultivars were infected by the seed imbibition method, of which 2 were confirmed to be BSMV infectious.

Keywords	Wheat, BSMV, gene editing, VIGS, <i>iLOV</i> .
Number of pages	65
Language	Czech

Obsah

1	Úvod	1
2	Současný stav řešené problematiky	3
2.1	Pšenice	3
2.1.1	Domestikace pšenice.....	3
2.1.2	Genom pšenice.....	5
2.2	Metody editace genomu	6
2.2.1	Meganukleasy	8
2.2.2	Zinc finger nucleases (ZFNs).....	8
2.2.3	Transcription activator-like effector nucleases (TALENs).....	9
2.2.4	CRISPR/Cas.....	10
2.3	Metody transformace rostlin	11
2.3.1	Nepřímé metody transformace.....	12
2.3.2	Přímé metody transformace	13
2.4	Funkční genomika.....	15
2.4.1	RNA interference	15
2.4.2	Virem indukované umlčení genu (VIGS)	16
2.4.3	Virem zprostředkovaná nadexprese (VOX).....	16
2.5	Rostlinné viry jako expresní vektory	16
2.5.1	<i>Barley stripe mosaic virus</i>	18
3	Experimentální část	20
3.1	Použitý materiál a přístroje	20
3.1.1	Biologický materiál.....	20
3.1.2	Chemikálie	20
3.1.3	Roztoky	21
3.1.4	Laboratorní vybavení a přístroje	22
3.2	Metody	23
3.2.1	Klonování genu <i>iLOV</i> do podjednotek viru BSMV	23
3.2.2	Transformace <i>Escherichia coli</i> DH5 α	30
3.2.3	Transformace <i>Agrobacterium tumefaciens</i> EHA105	35
3.2.4	Agroinfiltrace listů <i>Nicotiana benthamiana</i>	37
3.2.5	Infekce <i>Triticum</i> sp. a <i>Hordeum</i> sp.	39
4	Výsledky.....	42
4.1	Klonování genu <i>iLOV</i> do podjednotek viru BSMV	42
4.1.1	Amplifikace genu <i>iLOV</i>	42
4.1.2	Restrikční štěpení genu <i>iLOV</i>	42
4.1.3	Restrikční štěpení a defosforylace virových podjednotek γ_1 a γ_2	43
4.1.4	Ligace genu <i>iLOV</i> do virových podjednotek	43
4.2	Transformace <i>Escherichia coli</i> DH5 α	45

4.2.1	Ověření úspěšnosti elektroporace pomocí colony PCR	45
4.2.2	Vyhodnocení sekvenačních dat.....	45
4.3	Transformace <i>Agrobacterium tumefaciens</i> EHA105	46
4.4	Agroinfiltrace listů <i>Nicotiana benthamiana</i>	47
4.5	Infekce <i>Triticum</i> sp. a <i>Hordeum</i> sp.....	48
4.5.1	Abraze listů <i>Triticum</i> sp. a <i>Hordeum</i> sp.	48
4.5.2	Imbibice semen <i>Triticum</i> sp.....	52
5	Diskuze.....	56
6	Závěr	57
7	Literatura.....	59
8	Seznam použitých symbolů a zkratek	65

Cíle práce

- Zpracování literární rešerše na téma pšenice, editace genomu a rostlinné viry používané pro genové inženýrství, se zaměřením na *Barley stripe mosaic virus* (BSMV).
- Klonování reportérového genu *iLOV* do podjednotek viru BSMV za účelem zvýšení jeho kapacity.
- Příprava klonů *Agrobacterium tumefaciens* nesoucí modifikované podjednotky viru BSMV a následná transformace *Nicotiana benthamiana* za účelem namnožení virových částic.
- Ověření infikovatelnosti vybraných kultivarů pšenice a ječmene.

1 ÚVOD

Kromě kukuřice a rýže je pšenice jednou z nejdůležitějších plodin. Pšenice poskytuje přibližně pětinu spotřebovaných kalorií a čtvrtinu zkonsumovaných proteinů (což je největší množství ze všech zdrojů proteinů pro světovou populaci). Díky Dr. Normanu Borlaugovi došlo v 80. letech minulého století k takzvané Zelené revoluci, za což mu byla udělena Nobelova cena. Zelená revoluce představovala zavedení rezistentních zakrslých (semi-dwarf) pšeničných odrůd, odolávajících poléhání a zároveň s vylepšeným výnosem. Dalším prvkem byl rozvoj moderních metod v zavlažování, intenzivní používání hnojiv a pokročilé šlechtění. V tomto období došlo ke ztrojnásobení výnosů. Od té doby však globální produkce pšenice víceméně stagnuje. Dle Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj (OECD) bylo v roce 2018 z každého hektaru orné půdy sklizeno přibližně 3,4 tun pšeničného zrna. Navzdory tomuto faktu pšenice stále zaostává za kukuřicí, která měla přibližně dvakrát větší výnos na jednotku plochy. Avšak na rozdíl od kukuřice, jejíž velká část se spotřebovává na krmení pro zvířata nebo pro účely průmyslu, pšenice se v převážné míře využívá jako potravina pro lidi.

Aby bylo možné zajistit dostatečné množství potravy pro populaci čítající 9,6 miliard lidí, jak je předpovídáno pro rok 2050, je nutno každoročně zvýšit výnos pšenice až o 1,6 % při zachování či dokonce zlepšení jejích nutričních vlastností, a to bez neustálého zvětšování osevní plochy, která není k dispozici. K dosažení tohoto cíle musí být kladen velký důraz na zlepšení produktivity rostlin a jejich přizpůsobivost měnícím se přírodním podmínkám, k čemuž nejsou klasické metody šlechtění dostačující a výnos roste přibližně o 1 % ročně. S rostoucí lidskou populací a změnou stravovacích návyků by nedostatek této klíčové plodiny mohl znamenat vážnou hrozbu ve světovém měřítku. Proto je nutné zefektivnit metody šlechtění. Velký potenciál ke zrychlení a zefektivnění šlechtění nabízejí moderní metody molekulární biologie a genového inženýrství.

Hlavními nástroji molekulární biologie a genového inženýrství jsou markerem zprostředkovaná selekce (MAS) a editace genů (gene editing). Hlavní limitací pro gene editing je způsob doručení editačního konstruktů do cílové rostliny (transformace) a hlavně reprodukčních orgánů. Velmi účinnou metodou transformace rostlin je využití rostlinných virů jako vektorů pro doručení DNA konstruktů do široké škály rostlinných kultivarů. Předkládaná diplomová práce se zabývá možnostmi využití viru *Barley stripe mosaic virus* (BSMV) pro vnášení cizorodé DNA do obilovin. Takto zprostředkovaná

transformace rostlin bude sloužit k identifikaci, charakterizaci, validaci kandidátních genů a jejich případnou editaci.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Pšenice

Obiloviny jsou taxonomicky řazeny do rostlinné říše (*Plantae*), podříše cévnaté rostliny (*Tracheobionta*), oddělení krytosemenných (*Magnoliophyta*), třídy jednoděložných rostlin (*Liliopsida*), řádu lipnicotvarých (*Poales*) a čeledi lipnicovitých (*Poaceae*).

Čeď *Poaceae* patří mezi nejdůležitější čeledi pro zemědělství, jelikož tvoří přibližně 50 % kalorií přijímaných lidmi (Alexandratos et Bruinsma, 2012). Nejvýznamnějšími rody této čeledi z hlediska výnosu jsou pšenice (*Triticum* L.), kukuřice (*Zea* L.) a rýže (*Oryza* L.) - celosvětová produkce těchto tří plodin za rok 2018 dosahovala dle Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj (OECD) 2,4 miliard tun. Všechny uvedené obiloviny se přibližně před 55–75 miliony lety vyvinuly ze společného předka (Kellogg, 2001). Tato diplomová práce bude zaměřena na rod *Triticum*.

Do rodu *Triticum* řadíme celkem 6 druhů, a to *Triticum monococcum* L. (genom AA), *T. urartu* Tumanian ex Gandilyan (genom AA), *T. turgidum* L. (genom AABB), *T. timopheevii* (Zhuk.; genom AAGG), *T. aestivum* L. (genom AABBDD) a *T. zhukovskyi* Menabde & Ericz. (genom AAAAGG). Dle ploidie jednotlivé druhy dělíme do skupin: Monococca (diploidní druhy), Dicoccoidea (tetraploidní druhy) a *Triticum* (hexaploidní druhy).

V roce 2018 byla pšenice vyseta na ploše 216,1 milionů hektarů, čímž si zasloužila prvenství ve velikosti osevní plochy ze všech obilovin. Ve stejném roce byla celosvětová produkce pšenice přes 733 milionů tun, což je po kukuřici druhá nejčastěji sklízená obilovina. Mezi největší producenty patří dle OECD Čína, Indie a státy EU.

2.1.1 Domestikace pšenice

Počátky pěstování a domestikace pšenice sahají do období mezi 8. a 10. tisíciletím př. n. l., kdy v oblasti úrodného půlměsíce (oblast dnešní Palestiny, Sýrie, Turecka, Íránu, Iráku, Libanonu, Izraele, Jordánska a Egypta; Obr. 1) probíhala Neolitická revoluce, která se vyznačovala přechodem společnosti z lovců a sběračů na společnost usedlou, kdy se do popředí dostalo zemědělství (Heun *et al.*, 1997). V tomto období zde lidé začali pěstovat a domestikovat obilí, a to hlavně pšenici jednozrnku, dvouzrnku a ječmen. Domestikace tehdy spočívala v prostém křížení kultivarů a selekci nejvýnosnějších rostlin.



Obr. 1 Oblast úrodného půlměsíce (červeně zvýrazněno). Převzato z https://www.researchgate.net/figure/The-Historic-Map-of-the-Fertile-Crescent-Mark-2009_fig3_324680990

Dále se pšenice rozšířila do Řecka, na Kypr a do Indie (6500 př. n. l.), krátce poté do Egypta a následně na území dnešního Španělska a Německa (5000 př. n. l.). První Egypťané jsou považováni za vynálezce chleba, a s příchodem pecí se právě jeho pečení stalo jedním z prvních průmyslových potravinářských odvětví. Ve 3. tisíciletí př. n. l. pšenice prorazila do Anglie a Skandinávie a o tisíciletí později do Číny (Cooper, 2015).

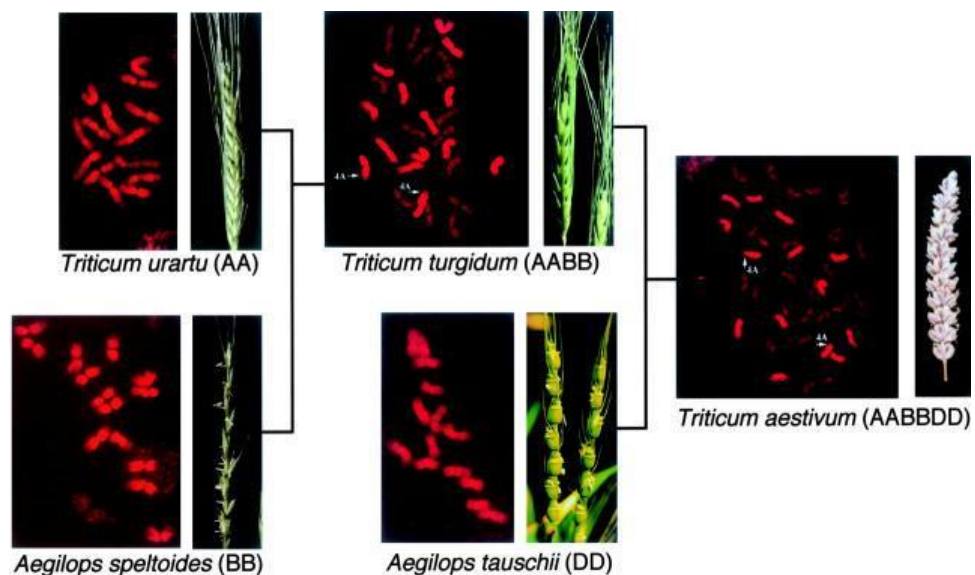
Zrno pšenice vždy představovalo důležitý zdroj rostlinných proteinů v lidské potravě. Snadná kultivace a možnost skladování patřily mezi další nesporné výhody této plodiny, které způsobily rozšíření jejího pěstování téměř do celého světa.

Domestikace měla mimo jiné za následek morfologické změny na pšeničných klasech. Zatímco u planých druhů dochází po dozrání k rozpadnutí klasů na jednotlivé klásky, klasy domestikovaných druhů zůstávají pohromadě. Mezi další důležité znaky vzniklé domestikací patří ztráta pluch (tuhých obalů), vzpřímený růst rostliny, zvětšení velikosti zrn nebo zredukovaná dormance semen (Dubcovsky a Dvořák, 2007).

2.1.2 Genom pšenice

Genom *T. aestivum* vznikl díky dvěma hybridizacím. V první hybridizaci, ke které došlo dle odhadů zhruba před 500 000 lety (Feldman *et al.*, 1995), se zkřížily dva diploidní druhy: *Triticum urartu* (AA; $2n = 2x = 14$) s druhem příbuzným *Aegilops speltoides* (SS; $2n = 14$), za vzniku tetraploida *Triticum turgidum* (AABB; $2n = 4x = 28$), jenž je považován za předka dnešní tvrdozrné pšenice, *T. turgidum*, sp. durum, která se používá k přípravě těstovin. Tento druh měl oproti svým předkům vyšší výnos, vitalitu a lepší schopnost adaptace k různým environmentálním podmínkám (Luo *et al.*, 2007). Ke druhé hybridizaci došlo dle Feldmana *et al.* (1995) zhruba před 10 000 lety. Zde se zkřížil tetraploidní *T. turgidum* s diploidem *Aegilops tauschii* (DD; $2n = 2x = 14$) za vzniku hexaploidní *Triticum aestivum* (AABBDD; $2n = 6x = 42$), který obsahuje kompletní sady chromozomů od všech svých předků (Dvořák *et al.*, 1988; Dvořák et Zhang, 1990; Dvořák *et al.*, 1993; Feuillet *et al.*, 2007). Nově získaný genom D nese geny zodpovědné za lepší adaptaci na středoasijské klima a rovněž kóduje proteiny, které zlepšují vlastnosti kynutých pšeničných produktů tím, že zadržují CO₂ během kynutí těsta. Hexaploidní pšenice je rovněž tolerantnější k solím, mrazu, nízkému pH nebo biotickým stresům. Také díky těmto faktorům se pšenice rozšířila téměř do celého světa (Feuillet *et al.*, 2007).

Jelikož je genom pšenice tvořen ze tří na sobě nezávislých subgenomů a obsahuje velké množství repetice, byl dlouhou dobu velký problém sestavit jeho referenční



Obr. 2 Schéma vývoje genomu hexaploidní pšenice. Převzato z <https://www.genetics.org/content/168/2/1087.figures-only>

sekvenci. To se ale změnilo v srpnu roku 2018, kdy se dvěma stovkám vědců z 20 zemí podařilo popsat referenční genom pšeničné odrůdy Chinese Spring. Tento výsledek byl publikován v časopise Science a stojí za ním Mezinárodní konsorcium pro sekvenování genomu pšenice (IWGSC). Práce (IWGSC, 2018) obsahuje detailní analýzu všech genů a představuje pro vědce i šlechtitele pomůcku k pochopení jejich funkcí, což může vést k získávání nových odrůd pšenice s lepšími vlastnostmi (adaptabilita na změny klimatu, vyšší výnos, lepší výživové hodnoty, stabilnější produkce).

Všechny druhy pšenice sdílí stejnou sadu 7 chromozomů, odlišují se však v ploidii. Genom pšenice seté (*T. aestivum*) má velikost 15,5 Gbp (IWGSC 2018) a jedná se o tzv. allohexaploida s celkem 21 páry chromozomů, které jsou rozděleny do tří homoelogních sad – A, B a D - v každé sadě je 7 chromozomů. Zmíněné sady obsahují velmi podobné geny (Choulet *et al.*, 2010) a přes 85 % sekvence tvoří repetitivní elementy (Moore *et al.*, 1995). Chromozomy jednotlivých sad jsou označovány jako 1A až 7A, 1B až 7B a 1D až 7D. Zajímavostí je, že ačkoliv je pšenice setá hexaploidní druh, v průběhu metafáze I meiotického dělení se chová jako diploid, a to díky lokusu *Ph1* lokalizovanému na chromozomu 5B (Griffiths *et al.*, 2006), který zabraňuje homoelognímu párování chromozomů (Martinez-Perez *et al.*, 2001).

2.2 Metody editace genomu

Do dnešního dne bylo dosaženo mnoha úspěchů ve sféře geneticky upravených plodin, jako jsou sója, kukuřice, bavlna či řepka. Nové odrůdy vytvořené metodami genového inženýrství jsou vysazovány v mnoha zemích světa, přičemž poskytují výhody farmářům a zároveň jsou šetrné k životnímu prostředí. Pšenice, jakožto jedna z nejdůležitějších plodin pro lidstvo, však stále zaostává za výše zmíněnými plodinami, co se týče aplikací technologií genetické modifikace. Je to především díky komplexitě jejího genomu, vysoké četnosti repetitivních sekvencí a nízké schopnosti regenerace (Bhalla, 2006). Z tohoto důvodu tedy dosud není transgenní pšenice komerčně pěstována. Veškeré nové pšeničné odrůdy byly vytvořeny pomocí konvenčních metod šlechtění, které jsou však časově náročné (Li *et al.*, 2012).

Jak již bylo zmíněno výše, stále narůstající počet obyvatel vyžaduje zvýšení výnosu pšeničného zrna z jednoho hektaru půdy z aktuálních zhruba 3,4 tun na 5 tun. K dosažení tohoto cíle je nezbytné využít již dostupné šlechtitelské postupy doplněné o nejnovější techniky založené na nedávných poznatcích o genomu pšenice získaných

ze sekvenování, a nashromážděné informace o důležitých genech, které podmiňují agronomicky významné znaky zodpovědné za výnos a kvalitu plodin.

V posledních třech dekáдах došlo k významnému pokroku ve vývoji technologií genového inženýrství rodu *Triticale*. V roce 1992 se americkému vědeckému týmu v čele s Vimlou Vasilem podařilo dosáhnout první stabilní transformace pšenice. Použili k tomu metodu bombardování embryonálních kalusů odvozených z nezralých zygotických embryí (Vasil *et al.*, 1992). Ačkoliv byla účinnost metody velmi nízká, jednalo se o zlomový moment, a sice začátek tradiční transformace pšenice.

Pojem editace genomu představuje skupinu technologií umožňující změnu DNA živého organismu jako přidání, odebrání či nahrazení genetického materiálu na specifickém místě v genomu. Veškeré technologie editace genomu jsou založeny na existenci nukleas. Nukleasy jsou přirozeně se vyskytující enzymy, které byly pro potřeby genového inženýrství modifikovány.

Aby mohla být provedena jakákoliv cílená změna v genomu organismu, je zapotřebí přítomnost tzv. dvouvláknových zlomů DNA (double-strand breaks, DSB) ve vybraném místě (Puchta *et al.*, 1996). Tyto zlomy v buňce vznikají rovněž přirozeně a mají na ni velmi negativní vliv. V průběhu evoluce si organismy vytvořily různé reparační systémy, které DSB opraví. K těmto opravným mechanismům patří nehomologní spojení konců (non-homologous end joining, NHEJ) či homologní rekombinace (homology-directed recombination, HDR). Každý z těchto mechanismů působí optimálně za jiných podmínek. Ačkoliv je přirozená tvorba DSB v organismu nežádoucí, bez tohoto kroku by se neobešla žádná metoda editace genomu.

K vytvoření DSB pro účely editace genomu jsou využívány právě “programovatelné” nukleasy, které se váží na určitou sekvenci nukleotidů a specificky štěpí vlákno DNA (Voytas, 2013; Puchta a Fauser, 2014). Nukleasy jsou složeny z DNA-vazebné a nukleasové domény. DNA-vazebná doména zajišťuje specifitu nukleasy, přičemž nukleasová doména tvoří DSB v požadovaném místě sekvence (Davies *et al.*, 2017). V buňce následně začnou probíhat výše zmíněné reparační mechanismy, při kterých dojde k cílené mutagenézi (Kim a Kim, 2014).

V případě NHEJ není potřeba přítomnost homologní sekvence, což má za následek vnášení INDEL mutací (náhodných delecí či inzercí) do míst oprav (Lieber, 2010). Takové mutace mohou vést k posunu čtecího rámce a vzniku nefunkčního

proteinu. Naproti tomu je mechanismus HDR přesný, právě díky nutnosti homologní sekvence lokalizované na nepoškozené sesterské chromatidě. Z toho vyplývá, že mechanismus HDR je využíván pouze v S a G2 fázi buněčného cyklu, tedy po replikaci DNA (San Filippo *et al.*, 2008; Moynahan a Jasin, 2010).

Při HDR nedochází k delecím, jako je tomu u NHEJ. Esenciálním předpokladem pro reparaci tohoto typu je přítomnost templátu, kterým je nepoškozená homologní sekvence, ideálně lokalizovaná na sesterské chromatidě (Heyer *et al.*, 2010). Opravy homologní rekombinací probíhají prostřednictvím dvou cest. Prvním způsobem je hybridizace řetězců závislá na syntéze (Synthesis Dependent Strand Annealing, SDSA), druhý způsob se nazývá jednořetězcová hybridizace (Single Strand Annealing, SSA).

Níže budou popsány čtyři rodiny používaných programovatelných nukleas, a sice meganukleasy, zinc-finger nucleasy (ZFNs), transcription activator-like nukleasy (TALENs) a nukleasy typu CRISPR/Cas.

2.2.1 Meganukleasy

Meganukleasy byly jako první použity při editaci rostlinného genomu (Puchta *et al.*, 1993). Jedná se o proteiny vyskytující se ve formě homodimeru, jehož každá podjednotka obsahuje 160-200 aminokyselinových zbytků. Meganukleasy jsou schopny rozpoznávat a štěpit sekvence dlouhé 12-40 bp (Belfort a Roberts, 1997). Je popsáno celkem 5 rodin meganukleáz lišících se sekvencí a strukturou motivů, ale zejména rodina enzymů typu LAGLIDADG je nejvyužívanější pro specifickou editaci genomu. Dalšími rodinami jsou GIY-YIG, HNH, His-Cys box nebo PD-(D/E)XK.

První popsanou meganukleasou je I-SceI, která byla objevena u kvasinky *Sacharomyces cerevisiae* (Watabe *et al.*, 1983). Meganukleasy štěpí v malém žlábků a vytváří čtyřbázové přesahy na 3' konci (Chevalier a Stoddard, 2001).

2.2.2 Zinc finger nucleases (ZFNs)

Zinc finger nucleases jsou uměle vytvořené enzymy, které jsou založeny na motivu zinkového prstu. Skládají se ze dvou domén, z nichž jedna DNA rozpozná a druhá ji štěpí. Základem domény, která rozpoznává specifickou sekvenci DNA, je právě zinkový prst, nejčastěji typu Cys₂His₂. Jedná se o 30 aminokyselin dlouhý polypeptid, který zaujímá konfiguraci dvou antiparalelních β řetězců a jednoho α helixu. Tato ββ_α struktura je stabilizována pomocí dvou histidinů a dvou cysteinů, mezi které je včleněn atom zinku

(Miller *et al.*, 1985). Struktura α helixu se váže do velkého žlábků DNA pomocí vodíkových můstků aminokyselinami na pozicích -1, -3 a -6. Právě tyto aminokyseliny určují specifitu dané nukleasy. Rovněž aminokyselina vyskytující se v pozici -2 určuje specifitu, jelikož se váže k antiparalelnímu vlákně DNA (Pavletich a Pabo, 1991). Nukleasy zinkových prstů obvykle obsahují 3 až 4 zinkové prsty.

Nukleasová doména, jež je zodpovědná za štěpení rozpoznané sekvence, je odvozena od restričního enzymu *FokI*. Jedná se o endonukleasu přirozeně se vyskytující u *Flavobacterium okeanoicoites*. Je to bakteriální enzym typu IIS. Pomocí DNA-vazebné domény se váže na DNA, konkrétně na sekvenci 5' GGATG 3'. Ke štěpení dochází 9 nukleotidů downstream na jednom vlákně a 13 nukleotidů upstream na vlákně antiparalelním. Bylo zjištěno, že před štěpením DNA musí být tato doména dimerizována (Bitinaite *et al.*, 1998).

Editace genomu prostřednictvím ZFNs tkví v navržení specifické DNA-vazebné domény, jež rozpozná konkrétní sekvenci DNA. Výhodou ZFNs je bezpochyby vysoká účinnost štěpení (Bibikova *et al.*, 2001). Naopak stinnou stránkou je náročnost návrhu nových ZFNs a rovněž náročné testování před samotným praktickým využitím. Dalším problémem je off-target štěpení, které nastává v důsledku homodimerizace jedné podjednotky z nukleasového páru (Miller *et al.*, 2007)

2.2.3 Transcription activator-like effector nucleases (TALENs)

Transcription activator-like effector nucleases jsou rovněž uměle vytvořené enzymy, které vznikají fúzí DNA-vazebné domény s nukleasovou doménou restričního endonukleasy *FokI*. DNA-vazebná doména, která slouží k rozpoznání DNA, je tvořena TAL efektorů, což jsou proteiny sekretované patogenní bakterií z rodu *Xanthomonas* prostřednictvím sekrečního systému typu III (T3SS; Boch a Bonas, 2010). Tato doména se skládá ze série (1,5 až 33,5 repetice) opakujících se sekvencí 33–35 aminokyselin, jež jsou vysoce konzervovány. Výjimkou jsou aminokyseliny na pozicích 12 a 13, které určují afinitu ke specifickým nukleotidům (Boch *et al.*, 2009). Tato oblast je označována jako RVD (repeat-variable diresidues). Každá taková repetice rozpoznává jeden nukleotid (Cermak *et al.*, 2011). Sekundární struktura těchto repetic je tvořena 2 konzervovanými α helixy spojenými smyčkou s RVD oblastí (Schornack *et al.*, 2006). Pro potřeby editace genomu lze navrhnout TALE repetice rozpoznávající libovolné sekvence nukleotidů (Bogdanove a Voytas, 2011). Stejně jako v případě ZFNs, i zde je k vytvoření DSB

využívána endonukleasa *FokI*, tudíž je opět vyžadována dimerizace. V dimerním stavu jsou uměle vytvořené TALENy schopny štěpit molekulu cílové DNA *in vivo* (Christian *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2011; Miller *et al.*, 2011; Mahfouz *et al.*, 2011). Každý z páru štěpí jedno vlákno, přičemž po naštěpení vznikají převisy o délce 4 nukleotidů.

Nukleasy tohoto typu našly využití například v genovém inženýrství rostlin. Příkladem je studie z roku 2012, kdy byly využity pro vytvoření odolnosti vůči chorobám u rýže způsobené bakterií *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*. Pomocí specificky navržených TALE repetice bylo zacíleno na gen sensitivity k bakteriální plísni způsobené touto bakterií (Li *et al.*, 2012). U pšenice bylo dosaženo simultánního knock-outu 3 homologních genů *MLO*, což vedlo k dědičné rezistenci vůči padlí (Wang *et al.*, 2014).

2.2.4 CRISPR/Cas

CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) je skupina opakujících se sekvencí DNA, jež se vyskytují v genomech bakterií a *Archaea* (Barrangou, 2015) společně s CRISPR asociovanými geny, označovanými jako *Cas*. Společně představují významnou složku adaptivní imunity a umožňují organismu zbavit se škodlivého genetického materiálu. Tyto repetice byly objeveny v 80. letech u *Escherichia coli* při sekvenování genu *iap* zodpovědného za přeměnu alkalické fosfatasy. V genomu *E. coli* bylo obsaženo 5 vysoce homologních palindromických sekvencí, oddělených tzv. spacers (Ishino *et al.*, 1987). V roce 2005 bylo zjištěno, že jsou tyto spacers nápadně podobné (homologní) exogenním sekvencím pocházejícím z bakteriálních plasmidů a fágů (Bolotin *et al.*, 2005; Mojica *et al.*, 2005; Pourcel *et al.*, 2005). V roce 2007 bylo prokázáno, že integrace části virového genomu do CRISPR lokusu *Streptococcus thermophilus* způsobí rezistenci této bakterie vůči bakteriofágu (Barrangou, 2015).

Po napadení patogenem dojde k zabudování fragmentu jeho genomu do genomu hostitele v podobě 25-40 nukleotidů dlouhého spaceru, který je vmezeřen mezi krátké repetice (okolo 20 nukleotidů). Při dalším napadení stejným patogenem je sekvence spacerů transkribována na crRNA (CRISPR RNA), která zajistí navádění Cas, což jsou endonukleasy vznikající jako produkty *Cas* genů. Jakmile je Cas endonukleasa navedena na místo, vytvoří se DSB.

Systém CRISPR/Cas je klasifikován do dvou tříd, a to v závislosti na výskytu Cas proteinů. Pro genové inženýrství je nejvýznamnější CRISPR/Cas9, pocházející z bakterie

Streptococcus pyogenes. Tento typ patří do druhé třídy, která se vyznačuje přítomností jediného efektorového proteinu (Makarova *et al.*, 2015). Navedení Cas9 proteinu na specifické místo v cílové DNA sekvenci zajišťuje single-guide RNA (sgRNA), která má 2 molekulární složky. CrRNA, která vznikla transkripcí spaceru, a transaktivační RNA (tracrRNA), která interaguje s crRNA. Konkrétně se crRNA váže na tzv. protospacer, což je 20 nukleotidů dlouhý úsek cílové DNA. Další esenciální složkou je tří-nukleotidový sekvenční motiv (NGG), známý jako protospacer-sousedící motiv (PAM). Jakmile je Cas9 navedena k cílové sekvenci, dojde k jejímu štěpení a vzniku DSB (Jinek *et al.*, 2012). Navržením vlastní crRNA a tracrRNA (tedy sgRNA) a jejich inkorporací do organismu společně s Cas9 lze dosáhnout konkrétních změn v genomu.

Vysoká účinnost a nenáročnost systému CRISPR/Cas9 systému je využívána například v zemědělství. Pomocí tohoto nástroje byly upraveny genomy nejen modelových rostlin (*Arabidopsis thaliana* či *Nicotiana benthamiana*; Song *et al.*, 2016), ale také u významných hospodářských plodin. Například cíleným vyřazením genu sensitivity k houbě *Oidium neolycopersici*, jež způsobuje plísňovou chorobu, bylo dosaženo rezistence rajčete vůči tomuto patogenu (Nekrasov *et al.*, 2017).

2.3 Metody transformace rostlin

Termínem transformace je myšleno vnášení cizorodé DNA do buněčného jádra a její integrace do chromozomu. Bylo vyvinuto několik transformačních metod, které budou popsány v této kapitole. Nejpodrobněji bude popsán princip *Agrobacterium*-zprostředkované transformace, jelikož byla tato metoda využívána v experimentální části předkládané diplomové práce.

Pojem transgenní rostliny představuje rostliny s genomem pozměněným metodami genového inženýrství. Tyto techniky zahrnují přidání, odebrání, či umlčení konkrétního genu. Gen vložený do hostitelského genomu může být z jiného druhu, dokonce i říše. První transgenní rostlinou byl tabák, do jehož genomu byl vložen gen bakteriální rezistence vůči antibiotiku (de Framond *et al.*, 1983). Od té doby došlo k významnému vývoji molekulární biologie rostlin a technologií genového inženýrství. Mezi hlavní cíle produkce transgenních rostlin patří pěstování plodin s ideálními znaky. Transgenní rostliny však nemají využití pouze v zemědělství, ale rovněž jako jakési továrny pro produkci farmaceuticky významných proteinů. Příkladem je studie z roku 2012, kdy byl v rostlině *Centella asiatica* exprimován protein hemagglutinin-

neuraminidasa pocházející z viru způsobujícího Newcastleskou chorobu, což přispělo k vývoji vakcíny proti tomuto onemocnění. (Lai *et al.*, 2012). Níže bude popsáno několik vybraných metod transformace rostlin.

2.3.1 Nepřímé metody transformace

Metody nepřímého transferu genu zahrnují přenos exogenní DNA do rostlinného genomu prostřednictvím tzv. vektorů. Vektor slouží jako nástroj pro dopravení genu zájmu do cílové buňky. Expresní vektory obsahují několik klíčových částí. Musí být přítomen eukaryotický promotor, multiklonovací místo (MCS; je možné jej naštěpit specifickými restriktázami a do vzniklého místa vložit gen zájmu), segment DNA obsahující terminační a polyadenylační signál, eukaryotický selekční marker, počátek replikace funkční v eukaryotické buňce, počátek replikace funkční v *Escherichia coli* a selekční marker pro *E. coli*. Počátek replikace je sekvence bohatá na adenin a thymin, která iniciuje replikaci vektoru. Selekční markery slouží k ověření inserce vektoru do buňky. Běžně používanými vektory jsou Ti-plasmidy nebo rostlinné virové vektory (Low, 2018).

2.3.1.1 *Agrobacterium*-zprostředkovaná transformace

Agrobacterium tumefaciens je gram-negativní bakterie, která zapříčiňuje vznik nádorových onemocnění u rostlin, jež se projevují tvorbou nádorů v rostlinných pletivech. Tato bakterie je schopna přenášet geny do rostlin. *Agrobacterium*-zprostředkovaná transformace je nejpoužívanější metodou používanou k transformaci rostlin, jelikož vede ke stabilní expresi proteinů a je rovněž vysoce účinná. Tato bakterie umožňuje včlenění až 150 kb velkých úseků DNA do genomu rostliny (Hamilton *et al.*, 1996). Mechanismus virulence spočívá v integraci části její DNA (transferová DNA, T-DNA) do genomu hostitele (Chilton *et al.*, 1977). Důležitým předpokladem pro schopnost integrace vlastní DNA do hostitelského genomu je přítomnost Ti plasmidu (tumor-inducing plasmid; Gelvin, 2003). Ti plasmid obsahuje 3 základní části: T-DNA, region virulence a region katabolismu opinů. T-DNA je ohraničena z obou stran sekvencemi označovanými jako “left border” a “right border”. Nacházejí se zde také geny pro biosyntézu opinů a fytohormonů. V oblasti virulence jsou kódovány *vir* geny, které mají důležitou úlohu při transferu T-DNA do hostitelské buňky. Onkogeny mimo oblast T-DNA způsobují tvorbu nádorů nekontrolovatelným dělením rostlinných buněk. Ti plasmid obsahuje rovněž počátek replikace umožňující jeho stabilní udržení v bakterii.

Agrobacterium tumefaciens, jež se využívají k transformaci, jsou modifikovány. Neobsahují geny způsobující nádory a jsou také zbaveny genů opinové syntézy. Naopak jsou přidány reportérové geny společně s požadovanými geny a selekčními markery.

Transformace zprostředkovaná *Agrobacteriem* nevyžaduje explantátové kultury, ale provádí se na vyvinuté rostlině. Jedná se buď o agroinokulaci, nebo agroinfiltraci. V případě agroinokulace je bakteriální suspenze obsahující gen zájmu inokulována na povrch rostliny například párátkem, nebo přímým ponořením celých orgánů (metoda floral dip). Agroinfiltrace, jež byla prováděna v rámci experimentální části této diplomové práce, využívá injekční stříkačku, kterou se do spodní (abaxiální) strany vtláčí bakteriální suspenze do mezofylu.

Ačkoliv je transformace zprostředkovaná *Agrobacteriem* účinná u dvouděložných rostlin jako jsou brambory, tabák či rajčata, v případě jednoděložných plodin je účinnost velmi nízká, což je vysvětlováno slabou systémovou odpovědí na poranění rostliny (Potrykus, 1991).

2.3.1.2 Transformace zprostředkovaná rostlinnými viry

Viry jsou vnitrobuněční parazité, kteří k sebereplikaci využívají molekulární aparát svého hostitele. Pro potřeby genového inženýrství byly viry modifikovány a využívají se jako alternativní vektory pro transformaci rostlin. Mezi používané viry patří Virus kvěťkové mozaiky (*Cauliflower mosaic virus*, CaMV), Virus tabákové mozaiky (*Tobacco mosaic virus*, TMV) nebo Virus mozaiky vojtěšky (*Alfalfa mosaic virus*, AMV). Divoké typy těchto vektorů byly vylepšeny a modifikovány.

2.3.2 Přímé metody transformace

Pojem přímé metody transformace označuje veškeré metody, při kterých je exogenní DNA zavedena přímo do jádra rostlinné buňky. Základním požadavkem pro úspěšné vnesení DNA do buňky je narušení vnější membrány. Ačkoliv jsou metody přímého transferu jednoduché a účinné, genová exprese v transgenních rostlinách může být pouze transientní (Low, 2018).

2.3.2.1 Biolistická metoda

Biolistická metoda, též nazývána jako metoda genového děla, je nejpoužívanější metodou přímé transformace rostlin. Poprvé byla představena Johnem C. Sanfordem v roce 1990 (Sanford, 1990). Při této metodě jsou zlaté či wolframové částice pokryty požadovanou DNA a vstřeleny do buněk genovým dělem pod vysokým tlakem. Tyto rychle se pohybující částice projdou silnou buněčnou stěnou a přenesou tak do jádra DNA, kterou jsou obaleny. Následně se DNA oddělí od kovových částic a integruje se do chromozomu.

Tato metoda je účinná při transformaci jednoděložných i dvouděložných rostlin. Je rovněž méně toxická než *Agrobacterium*-zprostředkovaná transformace a je aplikovatelná na téměř veškeré typy rostlinných buněk (Lai *et al.*, 2011). Hlavní nevýhoda biolistické metody tkví v nutnosti použití speciálních nákladných nástrojů a v efektivitě doručení DNA fragmentů do jádra namísto jiných organel (Furth, 1997). Musí být rovněž brán ohled na rovnováhu mezi velikostí a počtem kovových částic. Pokud je množství DNA příliš malé, výsledkem může být nízká frekvence transformace. Naopak příliš mnoho DNA může mít za následek velké množství kopií a nežádoucí přestavby transgenu.

2.3.2.2 Elektroporace

Další metodou přímého genového přenosu je elektroporace, což je metoda využívající elektrické impulsy. Nejdříve jsou rostlinné buňky inkubovány s roztokem pufrů obsahujícím cizí DNA. Následně jsou na směs aplikovány elektrické impulsy o vysokém napětí, které způsobí vznik dočasných pórů v cytoplasmatické membráně (Fromm *et al.*, 1985). Skrz tyto póry je DNA umožněno projít do buněk. Jde o rychlou a jednoduchou metodu, kterou lze aplikovat na protoplasty, které nemají buněčnou stěnu, nebo intaktní buňky (Rakoczy-Trojanovska, 2002).

2.3.2.3 Transformace pomocí silikon-karbidových vláken

Tato technika je jednou z nejjednodušších metod transformace rostlin. Silikon-karbidová vlákna (jsou přidána k suspenzi obsahující rostlinné pletivo (nezralá embrya, kalusy, shluky buněk) a plasmidovou DNA. Směs je následně vortexována. Vlákna pronikají buněčnou stěnou a umožní tak vstup DNA do buňky (Kaeppler *et al.*, 1990).

Účinnost této metody závisí na velikosti vláken (délka 10-80 μm , průměr 0,6 μm), parametrech vortexování, použitém rostlinném materiálu a tloušťce buněčné stěny. Jedná se o rychlou, jednoduchou a levnou metodu využitelnou pro různorodý rostlinný materiál. Nevýhoda spočívá v nízké efektivitě transformace a také nezanedbatelném poškození buněk, což negativně ovlivňuje regeneraci pletiva v celou rostlinu (Rakoczy-Trojanovska, 2002).

2.4 Funkční genomika

V dnešní době jsou již známy informace o celých genomech modelových organismů, nicméně funkce jednotlivých genů jsou stále předmětem výzkumu. Funkční genomika je obor molekulární biologie, který studuje funkci genů a jejich interakcí. Jedním z přístupů je porovnání nukleotidové sekvence se sekvencemi o známé funkci a určení pravděpodobné funkce genu pomocí bioinformatických nástrojů – tzv. *in silico*. Tyto simulace ale mnohdy nejsou dostačující. Pro takové případy existují další přístupy funkční genomiky, které zahrnují studium konkrétních organismů, které buďto v daném genu nesou mutaci, nebo u nich byla ovlivněna exprese konkrétního genu. Mezi tyto změny řadíme inaktivaci (knock-out), přidání (knock-in), utlumení (knock-down), nebo nadexpresi genu. V této kapitole budou popsány nejdůležitější metody funkční genomiky.

2.4.1 RNA interference

RNA-indukované umlčení genu (RNAi) bylo poprvé pozorováno při studiu indukované nadexpresi enzymu chalkon synthasy (CHS) v petunii (Napoli *et al.*, 1990), kdy došlo k neočekávané blokaci syntézy antokyanů a následnému vzniku bílých či vzorovaných květů. RNA interference je přirozený proces, který probíhá v buněčné cytoplasmě jako reakce na přítomnost virů a transposonů. Základním předpokladem je přítomnost dlouhých dvouřetězcových molekul RNA (double-stranded RNA, dsRNA). Buňka tyto dsRNA vyhodnotí jako cizorodé a spustí obranné mechanismy, které je rozštěpí a vzniknou dvouřetězcové úseky malých interferujících RNA (siRNA) dlouhé 21-23 nukleotidů s charakteristickými přesahy o délce 2 nukleotidů na 3' konci obou řetězců (Zamore *et al.*, 2000). Enzym, který štěpí dsRNA, se nazývá Dicer, a jedná se o endoribonukleasu III. Duplexy vzniklých siRNA se enzymaticky rozvolní a jeden z řetězců (antisense) se stává součástí komplexu zvaného RISC (RNA-induced silencing complex), zatímco druhé (sense) vlákno je degradováno buněčnými mechanismy v cytoplasmě. Komplex siRNA-RISC se poté páruje s komplementární sekvencí mRNA

a iniciuje endonukleolytické štěpení proteinem Argonaut (AGO; katalytická složka RISC), čím zabrání translaci cílového transkriptu.

Jak bylo zmíněno výše, k využití RNA interference je nutná přítomnost dsRNA, která celý proces spustí. Existuje mnoho způsobů, jak tuto molekulu do buňky dopravit, včetně využití rostlinných virů nebo přepisu invertovaných repetitivních sekvencí DNA. Tato schopnost virů nést a indukovat RNAi proti cizím sekvencím byla využita v technologii označované jako virem indukované umlčení genu (virus-induced gene silencing; VIGS), jež bude popsána v následující části.

2.4.2 Virem indukované umlčení genu (VIGS)

VIGS je proces využívající RNA viry jako vektory pro doručení dsRNA do buňky a jejím následném umlčení přirozeným procesem RNA interference. Prvním krokem této metody je vložení úseku hostitelské DNA do genomu viru. Při replikaci viru dojde přirozeně ke vzniku dsRNA, která je štěpena enzymem Dicer, jak je zmíněno v kapitole RNA interference. Nakonec tedy dojde ke štěpení virové RNA. Protože je v RNA viru obsažen rovněž námi vložený fragment hostitelského genu, komplex siRNA-RISC se zaměří na veškeré komplementární mRNA v celé buňce. Následkem je umlčení projevu konkrétního genu a znemožnění translace (Lu *et al.*, 2003).

2.4.3 Virem zprostředkovaná nadexprese (VOX)

VOX slouží k silné nadexpresi genu zájmu, aby mohl být studován vliv následně vzniklého proteinu na vlastnosti rostliny. Tato metoda je běžně využívána pro studium genů rezistence. Do virového vektoru je vložen gen zájmu a tímto transgenním virem je poté infikována hostitelská rostlina. Jak se virus šíří rostlinou, dochází k silné expresi genu zájmu. Hlavní problém VOX spočívá v relativně malé kapacitě virových vektorů. Tato překážka byla v případě *Barley stripe mosaic virus* (virus proužkovitosti ječmene, BSMV) překonána odstraněním několika genů a vytvořením restričního místa pro enzym *ApaI* (Cheuk a Houde, 2018). Jelikož byl v experimentální části této diplomové práce používán výše zmíněný BSMV, bude mu věnována další kapitola.

2.5 Rostlinné viry jako expresní vektory

Jak bylo zmíněno v předchozích kapitolách, transgenní rostliny představují důležitý nástroj pro studium funkce jednotlivých genů jejich nadexpresí nebo umlčováním. Získané informace jsou poté využívány ve šlechtitelských programech. Transformace pomocí *Agrobacterium tumefaciens* nebo biolistické metody jsou stále hlavními přístupy

vnášení exogenní DNA do genomu několika plodin (Vasil *et al.*, 1992; Cheng *et al.*, 1997). Hlavními nevýhodami těchto metod jsou proměnlivé účinnosti transformace v závislosti na rostlinném druhu nebo nutnost regenerace celé rostliny z transformovaného pletiva (Halpin, 2005). Rovněž je nutné zpětné křížené či genotypizace pro získání požadovaných mutantů. Tyto kroky jsou namáhavé a také drahé, a to zejména v případě jednoděložných plodin. V roce 2016 byla vytvořena první pšenice s CRISPR-Cas9 pomocí biolistické metody. Z 1600 bombardovaných nezralých embryí bylo identifikováno pouze 80 mutantů. Tento výsledek je tedy jasným důkazem, že pro funkční charakterizaci genů by bylo vyžadováno mnoho práce a času (Zhang *et al.*, 2016). Ideálním řešením pro studium funkce genů je vývoj rychlého a spolehlivého systému, při kterém nebude nutná regenerace rostliny z transformovaného materiálu.

Rostlinné viry jsou považovány za vhodné nástroje k expresi heterologních proteinů v krátkém čase (Hefferon, 2014). Jak název napovídá, jedná se o viry, jež napadají rostliny. Jako všechny ostatní viry se vyznačují tím, že jsou to intracelulární parazité, kteří ke své replikaci potřebují hostitelskou buňku. Velikost jejich těla je 20 až 500 nm.

Většina patří do skupiny tzv. RNA virů, jejich genom je tedy tvořen jednořetězcovou RNA (ssRNA). Některé genomy virů jsou však dvouřetězcové RNA (dsRNA), ssDNA nebo dsDNA. Vůbec prvním objeveným virem byl virus tabákové mozaiky (*Tobacco mosaic virus*, TMV). V roce 1886 německý chemik Adolf Mayer popsal “mozaikovou chorobu tabáku”, jež může být přenesena z rostliny na rostlinu (Mayer, 1886). Roku 1892 ruský botanik Dmitri Ivanovskij zjistil, že i po přefiltrování šťávy z napadených listů tabáku nebyl patogen odstraněn a šťáva způsobila na listech opětovné příznaky. Použil k tomu jemný porcelánový filtr Chamberland, který se v té době běžně využíval k odstranění bakterií. Byl však stále přesvědčen, že se jedná o velmi drobný druh bakterie (Iwanowski, 1892). V roce 1898 byl původce tohoto onemocnění nizozemským mikrobiologem Martinem Beijerinckem označen jako virus (Beijerinck, 1898). V té době byl virus chápán jako jakási substance, nikoliv jako organismus.

Na viry je obecně pohlíženo jako na patogeny způsobující ohromné zemědělské ztráty. K dosažení efektivní editace genomu za účelem zlepšování vlastností plodin je nutné doručení konstruktů (v případě metody CRISPR/Cas9 se jedná o doručení Cas9 endonukleasy a příslušné gRNA) a jeho následná exprese v cílových buňkách. Mezi

in planta techniky dodání těchto komponent patří transformace zprostředkovaná *Agrobacteriem* nebo biolistická metoda, jež by měly způsobit expresi ve všech buňkách transgenní rostliny včetně zárodečné linie, čímž je umožněn přenos cílených modifikací do další generace. Ačkoliv mohou tyto přístupy vést k účinné expresi genetického materiálu potřebného pro editaci genomu, produkce transgenních linií je časově i finančně náročná. Pro každou novou modifikaci jsou zapotřebí další transformace a pletivové kultury (Mahas *et al.*, 2019).

Hlavním důvodem, proč jsou virové vektory používány v biotechnologiích, je jejich schopnost replikace a produkce rekombinantních proteinů v širokém spektru hostitelů (Scholthof *et al.*, 1996). Prostřednictvím virových vektorů můžeme do buňky dopravit materiál pro editaci genomu a tím ji modifikovat, přičemž nedojde k začlenění rekombinantního genetického materiálu (Scholthof *et al.*, 1996).

V případě dvouděložných rostlin bylo vyvinuto několik rostlinných virů schopných exprese heterologních genů. Například *Tobacco mosaic virus*, *Potato virus X* nebo *Tobacco rattle virus* (Chapman *et al.*, 1992; Baulcombe *et al.*, 1995; Jia *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2003; Hefferon, 2014). Naproti tomu vývoj vhodných virových vektorů rekalcitrantních jednoděložných rostlin zaostává. V posledních letech byl pro tento účel modifikován *Barley stripe mosaic virus* (Yuan *et al.*, 2011), který umožňuje studium funkce genů metodou VIGS. Níže bude představen právě *Barley stripe mosaic virus*, který je klíčový pro experimentální část této diplomové práce.

2.5.1 *Barley stripe mosaic virus*

Barley stripe mosaic virus (BSMV) patří do čeledi *Virgaviridae*, konkrétněji jej řadíme do rodu *Hordeivirus*. Mezi jeho přirozené hostitele patří pšenice, ječmen a oves, je nicméně schopen infikovat velké množství jednoděložných i dvouděložných plodin pomocí mechanické inokulace (Bragg *et al.*, 2008). Jeho genom je složen ze tří pozitivních vláken RNA (ss(+)RNA), označovaných jako RNA α , RNA β a RNA γ (Jackson *et al.*, 1989). Všechny genomické RNA mají na 5' konci 7-methylguanositovou čepičku a na 3' konci t-RNA sekvenci.

Podjednotka RNA α kóduje tzv. α protein, jež obsahuje důležité methyltransferasové a helikasové domény. Je tak tedy zodpovědný za přidávání 7-methylguanositové čepičky na 5' konec virální RNA a rovněž za odvíjení duplexů

během replikace a transkripce (Koonin a Dolja, 1993). RNA β kóduje coat protein (CP; zodpovědný za tvorbu virových částic) a proteiny nezbytné pro mezibuněčný i vnitrobuněčný pohyb, tedy šíření virové infekce. Tyto proteiny jsou označovány jako triple gene block (TGB1, TGB2 a TGB3; Jackson *et al.*, 2009). RNA γ je bicistronní, kóduje důležitý komponent RNA polymerasy, označovaný jako protein γ _a, a rovněž cystein-rich γ _b protein, který je zapojen do patogenity viru, pohybu na delší vzdálenost a potlačení obranyschopnosti hostitele (Donald a Jackson, 1994; Bragg a Jackson, 2004; Lee *et al.*, 2012).

2.5.1.1 BSMV jako vektor pro VIGS

Barley stripe mosaic virus byl modifikován jako vhodný vektor pro VIGS za účelem studia genů ječmene a pšenice. Tyto studie zahrnovaly vložení části genu zájmu do podjednotky RNA γ (upstream nebo downstream od genu γ _b). Následně byla studována změna fenotypu rostliny, či vliv genu na morfogenezi a odpověď na biotický stres (Cakir *et al.*, 2010). Pomocí VIGS byla prokázána důležitost proteinu HSP90 v dráze obranných reakcí vůči *Blumeria graminis* (padlí travní). Umlčení genu *hsp90* vedlo ke zvýšenému růstu houbové hyfy, jelikož tento gen je součástí signální kaskády genu rezistence vůči *B. graminis* – *Mla13* (Hein *et al.*, 2005).

2.5.1.2 Využití BSMV v rámci diplomové práce

V rámci předkládané diplomové práce byla využívána modifikace viru BSMV. Jedná se o konstrukt, v němž byla RNA γ rozdělena na dvě části, tedy RNA γ ₁ a RNA γ ₂. Příslušný konstrukt byl vytvořen odstraněním několika genů a vytvořením restriční místa pro enzym *ApaI*. V původním tříkomponentovém systému se jednalo o kapacitu zhruba 400 bp. Modifikace BSMV vedla k výraznému navýšení funkční kapacity viru, konkrétně na 2500 bp (RNA γ ₁) a 800 bp (RNA γ ₂; Cheuk a Houde, 2018).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použitý materiál a přístroje

3.1.1 Biologický materiál

3.1.1.1 Rostlinný materiál

Semena *Nicotiana benthamiana* byla poskytnuta Ing. Beátou Petrovskou, Ph.D. (ÚEB, Olomouc).

Pšeničný kultivar GZ1 byl získán v rámci sběrové expedice v lokalitě Sobotište, Myjava, Slovenská republika. Vzorek nám byl poskytnut Ing. Ivanem Masárem. Kultivar DIM-25 byl získán z Genové banky ARS GRIN, Beltsville, USA (kód: PI 94633). Ozimá linie Eichenbarlebener (EBL) byla získána z Genové banky Piešťany, Slovenská republika. Pšeničná linie TCL-9199 Rhino a kultivary ječmene (Timori, BR-5783, Lumar, HE-2716, Algerian 3) byly získány z Genové banky Zemědělského výzkumného ústavu v Kroměříži.

3.1.1.2 Bakteriální materiál

Escherichia coli DH5 α (Invitrogene)

Agrobacterium tumefaciens EHA105 (Addgene)

3.1.2 Chemikálie

Primery pro PCR (Eurofins Genomics, ČR), *Taq* DNA polymerasa (Finzyme, Finsko), dNTPs (Sigma-Aldrich, USA), 3-methoxyloxypropyl trimethoxysilan (Silan; Serva, Německo), Ethanol (96%, 70%; Lach-ner, ČR), 40% roztok akrylamid/bis-akrylamid, 19:1 (Bio-Rad, USA), N,N,N',N'-tetramethylethylenediamin (TEMED; Bio-Rad, USA), persulfát amonný (APS; Sigma-Aldrich, USA), Ethidium bromid (Top Bio, ČR), Marker molekulové hmotnosti (Gene Ruler 100 bp DNA Ladder; Thermo Fisher Scientific; USA), Marker molekulové hmotnosti (Gene Ruler 100 bp DNA Ladder Plus; Thermo Fisher Scientific, USA), Marker molekulové hmotnosti (Gene Ruler 1 kb DNA Ladder Plus; Thermo Fisher Scientific, USA), *Apa*I 10 U/ μ l (Thermo Fisher Scientific, USA), QubitTM RNA BR Assay Kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA), T4 DNA Ligasa (Promega, USA), Glycerol, SOC médium (Thermo Fisher Scientific, USA), Kanamycin (Serva, Německo), Rifampicin (Serva, Německo), Agarosa (VWR, USA), Ribonukleasa A (Sigma-Aldrich, USA), Isopropanol (Sigma-Aldrich, USA), Fenol,

Chloroform:isoamylalkohol, 3M NaAc (pH = 5,5), 2-(N-morpholino)ethansulfonová kyselina (MES; Sigma-Aldrich, USA), 3',5'-Dimethoxy-4'-hydroxyacetofenon (Acetosyringon; Sigma-Aldrich, USA), MgCl₂ x 6H₂O (Lach-Ner, ČR, Hydrogenfosforečnan sodný (Sigma-Aldrich, USA), Dihydrogenfosforečnan sodný (Sigma-Aldrich, USA).

3.1.3 Roztoky

10× pufr pro PCR (s Mg²⁺)

100 mM Tris-HCl, pH = 8,2 (Sigma-Aldrich, USA)

500 mM KCl (Lach-Ner, ČR)

15 mM MgCl₂ x 6H₂O (Lach-Ner, ČR)

1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, USA)

5× Cresol red

0,01% o-cresolsulfoneftalein (Sigma-Aldrich, USA)

1,5% sacharosa (Lach-Ner, ČR)

5× TBE pufr:

450 mM Tris (Sigma-Aldrich, USA)

450 mM kyselina boritá (Lach-Ner; ČR)

10 mM EDTA, pH = 8,0 (Sigma-Aldrich, USA)

GET pufr

50mM glukosa

10mM EDTA (Sigma-Aldrich, USA)

25 mM Tris-HCl, pH = 8 (Sigma-Aldrich, USA)

TE pufr

10 mM Tris

1mM EDTA, pH = 8 (Sigma-Aldrich, USA)

Alkalický SDS

0,2 M NaOH

1% SDS v/v

ddH₂O

Neutralizační roztok

KAc 5M 60 ml / 100ml

ledová CH₃COOH 11,5 ml / 100 ml

ddH₂O 28,5 ml

pH = 4,8-5,3

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

3.1.4 Laboratorní vybavení a přístroje

Horizontální laminární box (Jouan; Thermo Fisher Scientific, USA); Mrazicí box (-20°C; Nord Line, ČR); Termocyklér (C1000 Touch™, Bio-Rad, USA); Zdroj stejnosměrného napětí (MP-500V, Major Science, USA); Aparatura pro vertikální gelovou elektroforézu (C-DASG-400-50, C.B.S. Scientific, USA); Dokumentační zařízení Ingenius (Syngene, VB); Fluorometr Qubit (Thermo Fisher Scientific, 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, USA); Jednopaprskový spektrofotometr (Ultrospec 10, AP Czech); Sálková centrifuga Jouan C4i (Thermo Fisher Scientific, USA); Elektroporátor (KRD Technologies, ČR); Mikrovlnná trouba (KOR-6C2B; DAEWOO, Korea); Aparatura pro horizontální gelovou elektroforézu Owl A6 (Thermo Fisher Scientific, USA); Zdroj stejnosměrného napětí EC 1000 XI power supply (Thermo Fisher Scientific, USA); Stolní centrifuga (5415 Eppendorf); Konfokální mikroskop Leica TCS SP8 STED 3X (Leica

Microsystems, Německo); Laboratorní pH metr 766 (Knick, Německo); Fytotron (Weiss Gallenkamp); Magnetická míchačka IKA RCT Basic (IKAMAG™, Německo); Digitální předvážky Vibra AJ-820CE (Shinko Denshi; Tokio, Japonsko); Třepačka s houpavým pohybem (Heidolph Duomax 1030).

3.2 Metody

3.2.1 Klonování genu *iLOV* do podjednotek viru BSMV

Účel této práce spočíval v optimalizaci metod infekce jednoděložných plodin virem BSMV. Aby bylo možné zjistit, zda k virové infekci došlo, bylo nutné využít reportérový gen pro snadnou vizualizaci pomocí fluorescenčního mikroskopu. Virus BSMV má omezenou kapacitu přenosu cizorodé DNA a běžně využívaný reportérový gen *GFP* (o velikosti ~ 720 bp) se ukázal jako relativně málo stabilní v UV světle. Z tohoto důvodu bylo přistoupeno k použití menšího a stabilnějšího reportéru *iLOV* (~ 336 bp). Použití menšího a stabilnějšího reportérového genu slibuje zvýšení možností a efektivity použití BSMV pro manipulaci s rostlinnými genomy (např. VIGS – k validaci kandidátních genů).

3.2.1.1 PCR amplifikace reportérového genu *iLOV* z vektoru pGEX

Pro získání genu *iLOV* byla využita metoda PCR, díky které byl amplifikován úsek plasmidu kódující tento gen. Pro metodu PCR bylo nutné navrhnout vhodné primery. Fluorescenční doména *iLOV* (Chapman *et al.*, 2008) byla získána z Addgene (www.addgene.org) ve formě plasmidu pGEX_*iLov*. Primery byly navrženy tak, aby amplifikovaly pouze *iLOV* doménu a byly prodlouženy o rozpoznávací sekvenci enzymu *ApaI* a prodlouženy o tři náhodné nukleotidy pro zajištění úplného štěpení. Tato restriční endonukleasa specificky štěpí sekvenci GGGCC*C a je již přítomna v γ podjednotkách BSMV. Dále byl na začátek *iLOV* domény přidán triplet ATG pro zajištění efektivní translace v rostlinné buňce. Sekvence primerů jsou uvedeny v Tab. 1. PCR reakce byla namíchána dle Tab. 2. Amplifikace byla provedena v termocykléru, jehož podmínky byly nastaveny dle Tab. 3. Po ukončení reakce byla destička vyjmuta z termocykléru, popsána a uložena do lednice.

Tab. 1 Sekvence primerů navržených pro PCR amplifikaci genu *iLOV* z vektoru pGEX_*iLOV*. Podtržení znázorňuje sekvenci rozpoznávanou enzymem *Apa*I.

Forward primer (FP)	ACTGGG <u>CCCC</u> CCATGGTACCATGATAGAGAAGAATTTCGT CATCACTG
Reverse primer (RP)	ACTGGG <u>CCCT</u> TATACATGATCACTTCCATCGAG

Tab. 2 Složení PCR reakční směsi.

Reagencie	Koncentrace (ve 20μl reakci)
<i>Taq</i> DNA polymerasa	0,4 U
Cresol Red	1X
Reakční pufr (Mg ²⁺)	1X
Forward primer (10μM)	1 μM
Reverse primer (10μM)	1 μM
dNTPs	200 μM
ddH ₂ O	Doplnit na 20 μl
DNA (pGEX_ <i>iLOV</i> ; 1 ng/μl)	1 μl

Tab. 3 Nastavení termocykléru.

Fáze		Teplota (°C)	Doba trvání	Počet cyklů
Denaturace		95	5 min	1
Syntéza	Denaturace	95	30 s	30
	Nasedání primerů	55	30 s	
	Polymerace	72	30 s	
Dosyntetizování		72	10 min	1
Udržování		12	∞	1

3.2.1.2 Polyakrylamidová elektroforéza

Pro ověření amplifikace úseku DNA byla využita polyakrylamidová elektroforéza. Byl připraven 4% gel a k barvení DNA byl využit ethidium bromid (0,01 %).

Nejprve bylo nutné jedno sklo aparatury silanizovat, a to z důvodu lepší přilnavosti gelu na povrch. Silanizace se provádí zpravidla po čtyřech použitích skla.

- Tenčí UV transparentní sklo aparatury pro elektroforézu bylo očištěno 96% ethanolem.
- Do kyselého ethanolu byly napipetovány 3 μ l silanu, roztok byl vylit na očištěné sklo a pomocí buničiny rozetřen do sucha po celém povrchu. Veškerá práce se silanem probíhala v digestoři.

Nyní bylo sklo připraveno k sestavení aparatury.

- Na tenčí sklo byla nejprve nasazena manžeta a položeny spacery, poté bylo překryto větším sklem. Následně byla obě skla upevněna svorkami.
- Pomocí ddH₂O byla ověřena těsnost aparatury.
- K přípravě 4% gelu bylo použito 150 ml 4 % směsi mono a bis akrylamidu (19:1) v 0,5 x TBE pufru s přídavkem 110 μ l TEMED a 1ml 10% persulfátu amonného.

- Směs byla důkladně promíchána a nalita mezi skla. Poté byl umístěn hřebínek a gel byl ponechán cca 45 min k polymeraci.
- Po polymeraci byl gel umístěn do elektroforetické aparatury, jejíž spodní nádoba byla naplněna 1L 0,5X TBE pufru s přídavkem 0,01% ethidium bromidu.
- Elektroforetická aparatura byla připojena ke zdroji elektrického napětí a byl spuštěn pre-run (napětí: 300 V, čas: 60 min). Jakmile počet miliampérů klesl na 70, aparatura byla připravena k použití.

Nanesení vzorků na gel:

- Do první jamky byly naneseny 2 μ l standardu molekulové hmotnosti (GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder).
- Do následujících jamek byly naneseny 2 μ l vzorku.
- Elektroforetická aparatura byla připojena ke zdroji elektrického napětí. Byly nastaveny parametry separace na 350 V, 60 min.
- Pro vizualizaci byl gel umístěn do dokumentačního zařízení a ozářen ultrafialovým zářením. Pomocí programu Genesnap (Syngene, VB) byly zhotoveny elektroforetogramy.

3.2.1.3 Restrikční štěpení a defosforylace virových podjednotek γ_1 a γ_2 a genu pro *iLOV*

Pro zvýšení úspěšnosti ligace genu *iLOV* do vektoru bylo nutné virové podjednotky γ_1 a γ_2 a PCR amplifikovaný gen *iLOV* naštěpit restrikční endonukleasou *ApaI*. Restrikční reakce byla namíchána dle Tab. 4, v souladu s protokolem od výrobce. Reakce byla namíchána v PCR destičce a umístěna do termocykléru, jehož podmínky byly nastaveny na 30 °C. Štěpení probíhalo 2 hodiny. Poté bylo do reakce přidáno 5 μ l alkalické fosfatasy pro defosforylaci konců γ_1 a γ_2 podjednotek. Reakce probíhala další hodinu při 37 °C. Enzymy byly inaktivovány zahřátím směsi na 65 °C po dobu 30 min. Štěpený *iLOV* nebyl defosforylován. Úspěšnost štěpení byla následně ověřena pomocí polyakrylamidové gelové elektroforézy.

Tab. 4 Složení reakční směsi pro restriční štěpení genu *iLOV* a podjednotek γ_1 a γ_2 .

Reagencie	Objem		
	<i>iLOV</i>	γ_1	γ_2
DNA	10 μ l PCR produktu	2 μ l vektoru (1 ng/ μ l)	2 μ l vektoru (1 ng/ μ l)
<i>Apa</i> I (10 U/ μ l)	2 μ l (20 U)	4 μ l (40 U)	4 μ l (40 U)
10X Buffer B	2 μ l	5 μ l	5 μ l
ddH ₂ O	18 μ l	39 μ l	39 μ l

3.2.1.4 Fluorimetrické stanovení koncentrace DNA

Aby bylo možné provést ligaci genu zájmu do vektorů, bylo nutné určit koncentraci DNA jak ve štěpených vektorech (γ_1 , γ_2), tak koncentraci samotného štěpeného genu (*iLOV*). K tomu byl využit přístroj Qubit. Měření koncentrace DNA na tomto přístroji bylo provedeno následovně:

- Veškeré reagencie byly ekvilibrovány na laboratorní teplotu.
- Qubit mikrozkušavky byly označeny názvy příslušných vzorků a dvou standardů (S1, S2).
- Do mikrozkušavky bylo smícháno: 199 μ l BR pufru x počet vzorků vč. standardů, 1 μ l Qubit reagent x počet vzorků vč. standardů. Směs byla zvortexována.
- Pracovní roztok byl rozpipetován do Qubit mikrozkušavek (pro vzorky po 199 μ l, pro standardy po 190 μ l).
- Standardy S1 a S2 byly napipetovány do příslušných mikrozkušavek po 10 μ l, v případě DNA o neznámé koncentraci byl napipetován 1 μ l. Celkový objem ve všech Qubit mikrozkušavkách byl tedy 200 μ l.
- Všechny mikrozkušavky byly zvortexovány a ponechány ve tmě po dobu 2 min.
- Měření koncentrace DNA probíhalo v režimu Broad Range.
- Nejdříve byly změřeny koncentrace obou standardů, poté jednotlivých vzorků.

3.2.1.5 Ligace genu *iLOV* do virových podjednotek

Ligační směs byla namíchána v poměru látkového množství 1:3 (vektor:insert). Pro výpočet množství vektoru a insertu byl použit následující vzorec:

$$\text{množství insertu (ng)} = \frac{\text{množství vektoru (ng)} \times \text{velikost insertu (bp)}}{\text{velikost vektoru (bp)}}$$

Vypočtené množství insertu bylo následně vynásobeno číslem 3, aby bylo dosaženo požadovaného poměru. Složení ligační směsi je uvedeno v Tab. 5. Reakce probíhala 12 hodin při 15 °C.

Tab. 5 Složení ligační směsi.

Reagencie	Objem ve 20μl reakci
insert	x μl
vektor	y μl
T4 DNA ligasa (3 U/μl)	0,3 μl (~1 U)
10X Buffer	2 μl
ddH ₂ O	doplnit na objem 20 μl

3.2.1.6 Ověření úspěšnosti ligace pomocí PCR amplifikace

K ověření úspěšnosti ligace a přítomnosti genu *iLOV* ve virových podjednotkách byly navrženy primery na místa ohraničující restrikční místo *ApaI* ve vektorech. Jako kontroly byly použity 0,3 ng vektorů s γ_1 a γ_2 podjednotky. Sekvence primerů jsou uvedeny v Tab. 6. PCR reakce byla namíchána dle Tab. 7. Amplifikace byla provedena na termocykléru, jehož podmínky byly nastaveny dle Tab. 8. Produkty PCR byly analyzovány pomocí polyakrylamidové elektroforézy na 4,5% gelu.

Tab. 6 Sekvence primerů pro ověření úspěšnosti ligace genu *iLOV* do virových podjednotek.

$\gamma_1:iLOV$	FP	TGTGAAGGGAAATTTGTGGA
	RP	ACTTGCAAACACTCCCATCA
$\gamma_2:iLOV$	FP	AGCTTGAGCATTACCGTCGT
	RP	GCCATCATGCGAAGGTAAAT

Tab. 7 Složení PCR reakční směsi.

Reagencie	Koncentrace (ve 30 μ l reakci)
<i>Taq</i> DNA polymerasa	~ 0,6 U
Cresol Red	1X
Reakční pufr (Mg ²⁺)	1X
Forward primer (10 μ M)	1 μ M
Reverse primer (10 μ M)	1 μ M
dNTPs	200 μ M
ddH ₂ O	doplnit do 30 μ l
DNA	0,3 ng

Tab. 8 Nastavení termocykléru.

Fáze		Teplota (°C)	Doba trvání	Počet cyklů
Denaturace		95	10 min	1
Syntéza	Denaturace	95	30 s	30
	Nasedání primerů	55	30 s	
	Polymerace	72	1 min	
Dosyntetizování		72	10 min	1
Udržování		12	∞	1

3.2.2 Transformace *Escherichia coli* DH5α

Po úspěšné ligaci bylo možné integrovat modifikovaný vektor do buněk bakterie *Escherichia coli* (kmen DH5α). Pro transformaci byla zvolena metoda elektroporace.

3.2.2.1 Příprava elektrokompetentních buněk *Escherichia coli* DH5α

- První den byl na miskou s 2YT médiem proveden křížový roztěr buněk *Escherichia coli* DH5α. Miska byla vložena do termostatu a ponechána při 37 °C přes noc.
- Druhý den byla do 100 ml 2YT média inokulována 1 kolonie z Petriho misky s narostlými bakteriemi.
- Směs byla kultivována na třepačce při podmínkách 37 °C, 220 rpm, přes noc.
- Druhý den ráno byla suspenze přelita do 1 litru 2YT média a opět umístěna na třepačku (37 °C, 220 rpm).
- Pomocí spektrofotometru byla každou hodinu měřena optická hustota při 600 nm (OD₆₀₀). Jakmile hodnota přesáhla 0.2, měření probíhalo po 15 minutách.
- Jakmile bylo dosaženo optické hustoty 0.4 – 0.6, suspenze byla umístěna na led.
- Následně byla suspenze rozdělena do 4 vychlazených centrifugačních kyvet o objemu 250 ml.
- Kyvety byly umístěny do centrifugy. Centrifugace probíhala za podmínek 1000 g, 20 min, 4 °C.

- Supernatant byl odlit a buňky byly rozsuspendovány ve 40 ml chlazené ddH₂O. Suspenze byly přemístěny do centrifugačních kyvet o objemu 50 ml.
- Kyvety byly umístěny do centrifugy. Centrifugace probíhala za podmínek 2000 g, 10 min, 4 °C.
- Supernatant byl odlit a buňky byly rozsuspendovány ve 20 ml chlazené ddH₂O. Poté byly suspenze rozděleny do 2 kyvet.
- Následovala centrifugace za podmínek 2000 g, 5 min, 4 °C.
- Supernatant byl odlit a pelety byly rozsuspendovány ve 40 ml vychlazeného 10% glycerolu.
- Následovala centrifugace za podmínek 5000 g, 10 min, 4 °C.
- Po centrifugaci byl glycerol vylit a pelety byly rozsuspendovány v 500 µl vychlazeného 10% glycerolu.
- Buňky byly rozděleny do vychlazených mikrozkušavek (1.5 ml) po 50 µl a rychle zmrazeny ponořením do tekutého dusíku.
- Elektrokompetentní buňky byly uschovány do mrazicího boxu (-80 °C).

3.2.2.2 Elektroporace *Escherichia coli* DH5α

- K 50 µl elektrokompetentních buněk *Escherichia coli* DH5α byly přidány 3 µl ligační směsi a suspenze byla ponechána na ledu zhruba 3 min.
- Následně byla suspenze rozdělena do dvou vychlazených elektroporačních kyvet, které byly umístěny do elektroporátoru s ledem.
- Elektroporace byla provedena při napětí 330 V.
- Elektroporovaná suspenze byla odpipetována z kyvet a přenesena do 1500 µl SOC média.
- Zkušavka s médiem byla ponechána na třepačce při 37 °C, 220 rpm po dobu 90 min.
- Po uplynulém čase byl obsah zkušavky rozetřen na agarové misky s kanamycinem (1 µg/ml).
- Misky byly ponechány v termostatu při 37 °C přes noc.

3.2.2.3 Colony PCR pro ověření úspěšnosti transformace

Pro ověření, zda transformované bakterie obsahují plasmid s vloženým konstruktem, byla provedena colony PCR. Rovněž bylo nutné zjistit, zda je insert ve vektoru správně

orientován. Z tohoto důvodu bylo třeba vhodně zvolit primery tak, aby jeden primer (v tomto případě “forward primer”) obsahoval sekvenci komplementární k insertu, a druhý primer byl z okrajových částí vektorů ležících v blízkosti místa inzerce. Sekvence primerů jsou uvedeny v Tab. 9. PCR reakce byla namíchána dle Tab. 10. Amplifikace byla provedena v termocykléru, jehož podmínky byly nastaveny dle Tab. 11. Produkty PCR byly analyzovány pomocí gelové agarosové elektroforézy.

Tab. 9 Sekvence primerů pro colony PCR.

$\gamma_1:iLOV$	FP	TACTCCACCTGCAACCTGTG
	RP	ACTTGCAAACACTCCCATCA
$\gamma_2:iLOV$	FP	TACTCCACCTGCAACCTGTG
	RP	GCCATCATGCGAAGGTAAAT

Tab. 10 Složení PCR reakční směsi.

Reagencie	Objem ve 20 μ l reakci
<i>Taq</i> DNA polymerasa	0,4 U
Cresol Red	1X
Reakční pufr (Mg ²⁺)	1X
Forward primer (10 μ M)	1 μ M
Reverse primer (10 μ M)	1 μ M
dNTPs	200 μ M
ddH ₂ O	Doplnit na 20 μ l
DNA	kolonie na špičku pipety

Tab. 11 Nastavení termocykléru.

Fáze		Teplota (°C)	Doba trvání	Počet cyklů
Denaturace		95	10 min	1
Syntéza	Denaturace	95	30 s	30
	Nasedání primerů	55	30 s	
	Polymerace	72	1 min	
Dosyntetizování		72	10 min	1
Udržování		12	∞	1

3.2.2.4 Agarosová gelová elektroforéza PCR produktů

Pro vizualizaci produktů colony PCR byla zvolena metoda agarosové gelové elektroforézy na 1,2% gelu. DNA fragmenty byly obarveny ethidium bromidem a vizualizovány dokumentačním zařízením.

- V Erlenmayerově baňce byl připraven 1,2% roztok agarosy v 0,5X TBE pufru a rozvařen v mikrovlnné troubě.
- Rozvařený gel byl za stálého míchání ochlazen zhruba na 50 °C pod tekoucí vodou.
- Ochlazený gel byl přelit do elektroforetické komůrky, byly vloženy hřebínky.
- Po zhruba 30 min tuhnutí gelu při laboratorní teplotě byly hřebínky vyjmuty a do komůrky byl nalit 0,5X TBE pufr tak, aby jeho hladina sahala minimálně 3 mm nad gel.

Nanesení vzorků na gel:

- Do první jamky bylo naneseno 5 µl standardu molekulové hmotnosti (GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder).
- Do následujících jamek byly naneseny 3 µl vzorku.
- DNA fragmenty byly děleny v elektrickém poli (3-5 V/cm).

- DNA byla barvena v roztoku ethidium bromidu (0,5 mg/ml) po dobu 15 min.
- Rozdělené DNA fragmenty byly vizualizovány dokumentačním zařízením.

3.2.2.5 Sekvence plasmidů obsahujících požadovaný insert

Pro zjištění, které bakteriální klony nesou gen zájmu bez nežádoucích mutací, bylo přistoupeno k sekvenování plasmidové DNA. Sekvence byla prováděna Mgr. Lucií Bílkovou.

3.2.2.6 Vyhodnocení sekvenačních dat

K vyhodnocení dat ze sekvenace byl využit software MEGA-X (Pensylvánská státní univerzita, USA), pomocí kterého byly sekvence všech klonů porovnány s referenční sekvencí. Tímto způsobem byly vyselektovány klony obsahující přesnou sekvenci nukleotidů. Vybrané klony byly přepasážovány na nové agarové misky s kanamycinem a ponechány v termostatu při 37 °C přes noc.

3.2.2.7 Izolace a purifikace plasmidové DNA z *Escherichia coli*

Pro další postup bylo nezbytné izolovat bakteriální plasmid z narostlých kolonií *E. coli*. Izolace a následná purifikace probíhala následovně:

1. První den byly do 3 ml 2YT média s 3 µl kanamycinu (50 mg/ml) inokulovány bakterie. Očkem byla nabrána jedna kolonie, rozetřena o stěnu zkumavky a rozsuspendována v médiu.
2. Zkumavky byly ponechány přes noc na třepačce při 37 °C, 220 rpm.
3. Druhý den byl obsah zkumavek přemístěn do mikrozkušavek o objemu 1,5 ml a zcentrifugován. Podmínky centrifugace byly nastaveny na 2 800 g, 5 min, 4 °C.
4. Pelety byly rozsuspendovány ve 100 µl GET pufru s 1 µl RNasy (10 mg/ml).
5. Poté bylo přidáno 200 µl (2V GET) alkalického SDS. Mikrozkušavky byly ponechány 5 min na ledu.
6. Následně bylo přidáno 75 µl (3/4V GET) neutralizačního roztoku. Suspenze byla promíchána otáčením mikrozkušavky a ponechána 30 min na ledu.
7. Vzorky byly centrifugovány 10 000 g, 10 min, 4 °C. Supernatanty byly přepipetovány do čistých označených mikrozkušavek.
8. Bylo přidáno 225 µl isopropanolu a důsledně promíchány. Mikrozkušavky byly ponechány 30 min při laboratorní teplotě.
9. Následovala centrifugace v 10 000 g, 10 min, 4 °C.

10. Supernatanty byly odlity a k peletům bylo přidáno 300 μ l 76% ethanolu.
11. Následovala centrifugace při 10 000 g, 6 min, 4 °C. Ethanol byl vylit.
12. K peletům bylo přidáno 300 μ l 90% ethanolu.
13. Následovala centrifugace v 10 000 g, 6 min, 4 °C.
14. Z mikrozkuvek byla odpipetována veškerá tekutina a následně byly ponechány v laboratorní teplotě po dobu 10 min, aby došlo k úplnému vysušení. Vysušené pelety byly rozpuštěny ve 100 μ l TE pufru (pH = 8).
15. Poté bylo přidáno 50 μ l fenolu pH = 8.
16. Následně bylo do mikrozkuvek napipetováno 50 μ l směsi chloroform:isoamylalkohol (24:1). Mikrozkuvky byly protřepány.
17. Následovala centrifugace v 17 000 g, 2 min, 4 °C.
18. Horní (vodní) fáze byla přepipetována do čistých označených mikrozkuvek.
19. Kroky 16-18 byly provedeny celkem 3x.
20. Následně bylo přidáno 1/10V 3M NaAc (pH = 5,5) a roztok byl promíchán.
21. K roztoku bylo přidáno 0,6V z celkového objemu isopropanolu. Mikrozkuvky byly ponechány 5 min v laboratorní teplotě.
22. Následovala centrifugace v 17 000 g, 10 min, 4 °C.
23. Supernatanty byly odlity a k peletům bylo přidáno 300 μ l 76% ethanolu.
24. Následovala centrifugace při 10 000 g, 6 min, 4 °C. Ethanol byl vylit.
25. K peletům bylo přidáno 300 μ l 90% ethanolu.
26. Následovala centrifugace v 10 000 g, 6 min, 4 °C.
27. Z mikrozkuvek byla odpipetována veškerá tekutina a následně byly ponechány v laboratorní teplotě po dobu 10 min, aby došlo k úplnému vysušení. Vysušené pelety byly rozpuštěny ve 20 μ l ddH₂O.
28. Mikrozkuvky s izolovanou a purifikovanou plasmidovou DNA byly umístěny do -20 °C.

Po izolaci a purifikaci plasmidové DNA bylo nutné stanovit koncentraci, aby bylo možné její vhodné naředění pro další postup. K tomu byl využit přístroj Qubit. Postup použití tohoto přístroje je popsán v podkapitole 3.2.1.4.

3.2.3 Transformace *Agrobacterium tumefaciens* EHA105

Pro účely následné agroinfiltrace listů rostliny *Nicotiana benthamiana* bylo nutné transformovat bakterii *Agrobacterium tumefaciens*, kmen EHA105. Jako vhodná transformační metoda byla opět zvolena elektroporace. Příprava elektrokompetentních

buněk probíhala identicky, jako v případě *E. coli*, s tím rozdílem, že inkubace probíhala vždy při 28 °C a trvala dva dny.

3.2.3.1 Elektroporace *Agrobacterium tumefaciens* EHA105

- Nejdříve byla izolovaná plasmidová DNA naředěna na koncentraci 1 ng/μl.
- K 25 μl elektrokompetentních buněk *A. tumefaciens* byl přidán 1 μl plasmidové DNA a suspenze byla ponechána na ledu zhruba 3 min.
- Následně byla suspenze přepipetována do vychlazené elektroporační kyvety, která byla umístěna do elektroporátoru s ledem.
- Elektroporace byla provedena při napětí 330 V. Hodnota elektroporační konstanty se při správné transformaci pohybuje v rozmezí 1,95 až 2.
- Elektroporovaná suspenze byla odpipetována z kyvety a přenesena do 500 μl SOC média.
- Zkumavka s médiem byla ponechána na třepačce při 28 °C, 200 rpm po dobu 90 min.
- Po uplynulém čase byl obsah zkumavky rozetřen pomocí hokejky na agarové misky s kanamycinem (1 μg/ml) a rifampicinem (0,5 μg/ml).
- Misky byly ponechány v termostatu při 28 °C po dobu dvou dnů.
- Poté byla provedena colony PCR a agarosová gelová elektroforéza pro identifikaci pozitivních klonů. Výběr primerů, složení PCR reakční směsi i nastavení termocykléru bylo identické jako v případě *Escherichia coli*.

3.2.3.2 Tvorba bakteriálních konzerv *Agrobacterium tumefaciens* EHA105

Pro úsporu času byly vytvořeny tzv. konzervy pozitivních klonů *A. tumefaciens*, jež je možné použít pro další agroinfiltraci. Postup tvorby konzerv byl následující:

- První den byly pozitivní kolonie, které byly potvrzeny pomocí colony PCR, přepasážovány na nové agarové misky s kanamycinem (1 μg/ml) a rifampicinem (0,5 μg/ml). Misky byly ponechány v termostatu při 28 °C po dobu dvou dnů.
- Do 3 ml 2YT média byla přidána selekční antibiotika: kanamycin (1 μg/ml) a rifampicin (0,5 μg/ml).
- O stěnu zkumavky byla pomocí očka rozetřena vždy jedna narostlá kolonie.
- Suspenze byla umístěna na třepačku a ponechána dva dny při 28 °C, 200 rpm.

- Po dvou dnech byl 1 ml suspenze napipetován do šroubovacích mikrozkušavek o objemu 1,5 ml s přídavkem 150 μ l 100% glycerolu a důkladně promíchán.
- Konzervy byly uchovány v mrazícím boxu při -80 °C.

3.2.4 Agroinfiltrace listů *Nicotiana benthamiana*

Po ověření přítomnosti modifikované virové sekvence v bakteriálním plasmidu bylo nutné přenést tuto sekvenci do genomu dvouděložné rostliny. Jako vhodná rostlina pro vytvoření virových částic byl zvolen druh *Nicotiana benthamiana*. Jak bylo zmíněno výše, modifikovaný genom využívaného viru *Barley stripe mosaic virus* je složen ze čtyř podjednotek. Pro vytvoření virové částice je nutná přítomnost všech 4 podjednotek. Silný promotor 2x35S zajistí silnou expresi. BSMV má schopnost se v rostlině *N. benthamiana* množit.

Agrobacterium tumefaciens nesoucí podjednotky α , β , γ_1 byly připraveny ve spolupráci s Bc. Martinem Lukáčem v rámci jeho bakalářské práce. Ačkoliv byl reportérový gen *iLOV* úspěšně zaklonován do obou γ podjednotek, pro agroinfiltraci byla dále využívána pouze podjednotka $\gamma_2:iLOV$. Pro agroinfiltraci byla použita tato kombinace virových podjednotek: α , β , γ_1 , $\gamma_2:iLOV$.

3.2.4.1 Příprava materiálu pro agroinfiltraci *Nicotiana benthamiana*

Jak je uvedeno výše, pro agroinfiltraci byly zvoleny 4 různé podjednotky viru BSMV, konkrétně α , β , γ_1 a $\gamma_2:iLOV$. Postup byl následující:

- Nejprve bylo nutné nechat *A. tumefaciens* nesoucí příslušné plasmidy narůst v médiu. Do Erlenmayerovy baňky se 100 ml 2YT média a selekčními antibiotiky (kanamycin - 1 μ g/ml; rifampicin - 0,5 μ g/ml) bylo napipetováno 200 μ l z bakteriální konzervy příslušné *A. tumefaciens*.
- Označené baňky byly umístěny na třepačku a ponechány 2 dny při 28 °C, 200 rpm.
- Po dvou dnech byly suspenze přeneseny do centrifugačních kyvet a zcentrifugovány při 2800 g, 10 min, 4 °C.
- Pelety byly rozsuspendovány v agroinfiltračním médiu, které bylo připraveno dle Tab. 12.
- Jakmile bylo u všech bakteriálních suspenzí dosaženo $OD_{600} = 0.7$, byly smíchány stejné objemy příslušných podjednotek.

- Směs byla ponechána na třepačce po dobu 3–5 hodin při 200 rpm a 28 °C.

Tab. 12 Složení agroinfiltračního média ve vodě.

Látka	Koncentrace
1 M MES	10 mM
1 M MgCl ₂	10 mM
100 mM acetosyringon	100 μM

3.2.4.2 Agroinfiltrace

Pro tuto metodu byly využity rostliny *Nicotiana benthamiana*, staré přibližně 1 týden.

- Pomocí injekční stříkačky bez jehly byly infiltrovány listy z abaxiální strany. Každý list byl infiltrován na 3–5 místech. Oblasti agroinfiltrace byly označeny fixem.
- Rostliny byly překryty neprůsvitným sáčkem a ponechány přes noc při laboratorní teplotě.
- Druhý den byly umístěny do fytotronu (20000 lux, den: 16 hodin/24 °C; noc: 8 hodin/16 °C; vlhkost: 60 %).
- Po 7 dnech bylo možné pomocí fluorescenční mikroskopie ověřit, zda došlo k přenosu viru do rostliny.

3.2.4.3 Fluorescenční mikroskopie *N. benthamiana*

Pro potvrzení přítomnosti virových částic v listech *N. benthamiana* byla zvolena metoda fluorescenční mikroskopie, jež bylo možné provést díky přítomnosti reportérového genu (*iLOV*) na γ_2 podjednotce BSMV. Mikroskopie probíhala ve spolupráci s Mgr. Alžbětou Němečkovou. Postup byl následující:

- Pomocí sterilního skalpelu byly z agroinfiltrovaných listů vyříznuty části o rozměrech cca 1x4 mm.
- Stejně velké části byly vyříznuty rovněž z kontrolních rostlin.
- Vyříznuté části byly umístěny na označené podložní sklo s kapkou vody.
- Preparáty byly překryty krycím sklem.

- Preparáty byly pozorovány pomocí fluorescenčního konfokálního mikroskopu. Pro detekci *iLOV* byl zvolen laser o vlnové délce 488 nm s odpovídajícím emisním filtrem pro zelenou barvu, pro detekci autofluorescence byl zvolen laser o vlnové délce 546 nm s odpovídajícím emisním filtrem pro červenou barvu.

3.2.4.4 Příprava virového homogenátu z listů *N. benthamiana*

Po ověření úspěšnosti transformace *N. benthamiana* byly infiltrované listy sebrány, aby mohl být vytvořen tzv. homogenát pro následnou infekci jednoděložných rostlin (pšenice, ječmen). Postup byl následující:

- Pomocí sterilního skalpelu byly vyříznuty infiltrované části listů.
- Listy byly zality fosfátovým pufrům (0,5 g listu/1 ml pufru), který byl připraven podle Tab. 13.
- V ledově vychlazené třecí misce byla pomocí tloučku směs zhomogenizována.
- Hotový homogenát byl po menších objemech uložen v mrazícím boxu při -20 °C.

Tab. 13 Složení fosfátového pufru.

Látka	Koncentrace [M]	Objem [ml]
Na ₂ HPO ₄	0,1	100
NaH ₂ PO ₄	0,1	~ 37 (pro dosažení pH = 7,2)

3.2.5 Infekce *Triticum sp.* a *Hordeum sp.*

Pro infekci jednoděložných plodin byly zvoleny 2 rozličné metody. První metodou byla abraze listů, druhá spočívala v imbibici semen. Byly infikovány různé kultivary jednotlivých plodin za účelem zjištění infikovatelnosti těchto kultivarů virem BSMV. Důvodem zjišťování infikovatelnosti výše zmíněným virem je v případě pšenice následná validace genu rezistence k *Blumeria graminis* (padlí travní) metodou VIGS (virem indukované umlčení genu), v případě ječmene testování funkce genů *Mla* (geny rezistence k *B. graminis*) a *AVR A1* genů z *B. graminis*.

3.2.5.1 Abraze listů *Triticum* sp. a *Hordeum* sp.

Jedná se o metodu mechanického narušení listového povrchu, což umožní snadnější vniknutí virových částic do rostliny. Metoda byla provedena podle následujícího postupu:

- Do označených Petriho misek byla na mokrou buničinu umístěna semena. Misky byly uloženy do lednice, kde byly uchovávány ve tmě po dobu 3 dní.
- Poté byly misky přesunuty tmy při laboratorní teplotě, kde byly ponechány do dalšího dne.
- Následující den byla semena zasazena do substrátu, cca 1,5 cm pod povrch.
- Květináče se semeny byly umístěny do fytotronu (20000 lux, den: 16 hodin/24 °C; noc: 8 hodin/16 °C; vlhkost: 60 %).
- Jakmile rostliny dosáhly stádia 2. listu, mohla být provedena abraze.
- Vytvořený homogenát byl rozmrazen a smíchán s nadrceným silikagelem (5 mg silikagelu na 1 ml homogenátu; 0,5 % w/v).
- Na první list byla jemným třením ruky nanесena směs homogenátu a silikagelu. Místo abraze bylo označeno fixem.
- Rostliny byly přesunuty zpět do fytotronu.
- Po 7 dnech byla provedena fluorescenční mikroskopie.

3.2.5.2 Imbibice semen *Triticum* sp.

Imbibice neboli smáčení, spočívá v klíčení semen ve zředěném virovém homogenátu. Postup byl následující:

- Do označených Petriho misek byla na mokrou buničinu umístěna semena. Misky byly uloženy do lednice, kde byly uchovávány ve tmě po dobu 3 dní.
- Virový homogenát byl zředěn destilovanou vodou v poměru 1:100.
- Buničina byla odstraněna z misek. Semena byla zalita zředěným homogenátem do poloviny jejich výšky.
- Misky byly zabaleny do alobalu a umístěny na třepačku (2 rpm, laboratorní teplota), kde byly ponechány 2 dny.
- Následně byla semena zasazena do substrátu, cca 1,5 cm pod povrch.
- Květináče se semeny byly umístěny do fytotronu (20000 lux, den: 16 hodin/24 °C; noc: 8 hodin/16 °C; vlhkost: 60 %).

- Po 7 dnech byla provedena fluorescenční mikroskopie.

3.2.5.3 Fluorescenční mikroskopie *Triticum* sp. a *Hordeum* sp.

Nyní bylo nutné otestovat, zda v rostlinách došlo k expresi *iLOV*, a tedy infekci virem BSMV. Příprava preparátů a postup mikroskopování byl stejný, jako v případě *N. benthamiana* (viz kapitola 3.2.4.3).

4 VÝSLEDKY

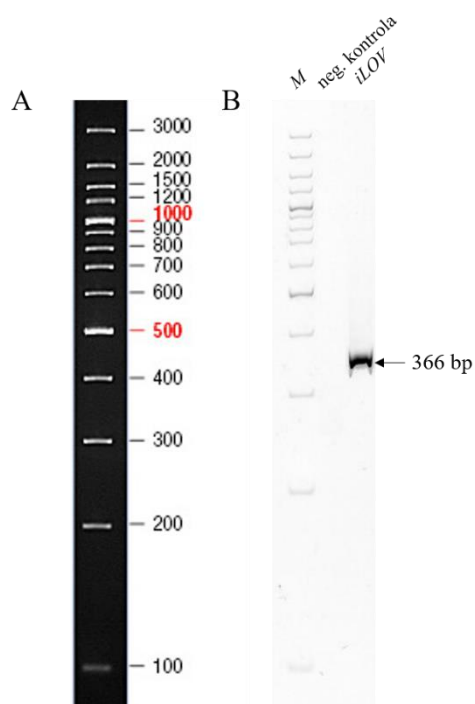
4.1 Klonování genu *iLOV* do podjednotek viru BSMV

4.1.1 Amplifikace genu *iLOV*

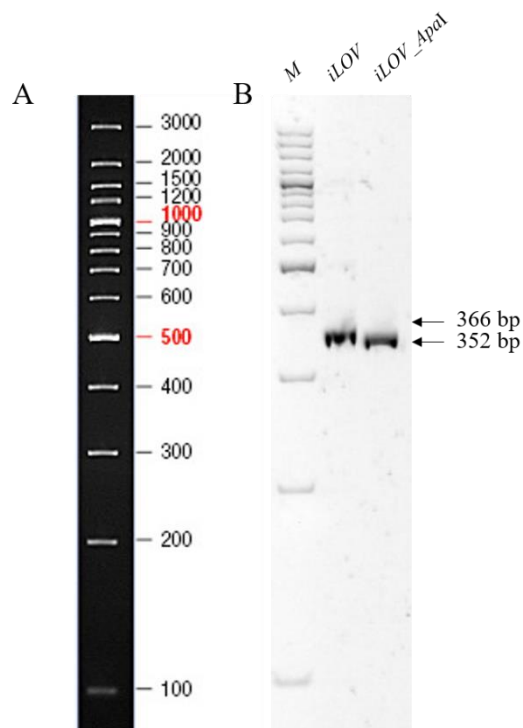
Prvním krokem předkládané diplomové práce byla amplifikace genu *iLOV* z vektoru pGEX_*iLOV*. Výsledek této amplifikace byl potvrzen pomocí gelové polyakrylamidové elektroforézy. Na Obr. 3 lze vidět, že vzniklý PCR produkt má požadovanou velikost, a sice 366 bp. Gen byl tedy úspěšně amplifikován.

4.1.2 Restrikční štěpení genu *iLOV*

Před ligací genu *iLOV* do virových podjednotek γ_1 a γ_2 bylo provedeno restrikční štěpení enzymem *ApaI*, který z PCR produktu odstraní 14 nukleotidů. Štěpení bylo opět ověřeno pomocí gelové polyakrylamidové elektroforézy. Obr. 4 znázorňuje úspěšné štěpení PCR produktu.



Obr. 3 PCR amplifikace genu *iLOV* z vektoru pGEX_*iLOV*. (A) Standard molekulové hmotnosti GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder. (B) Elektroforetogram PCR produktu.



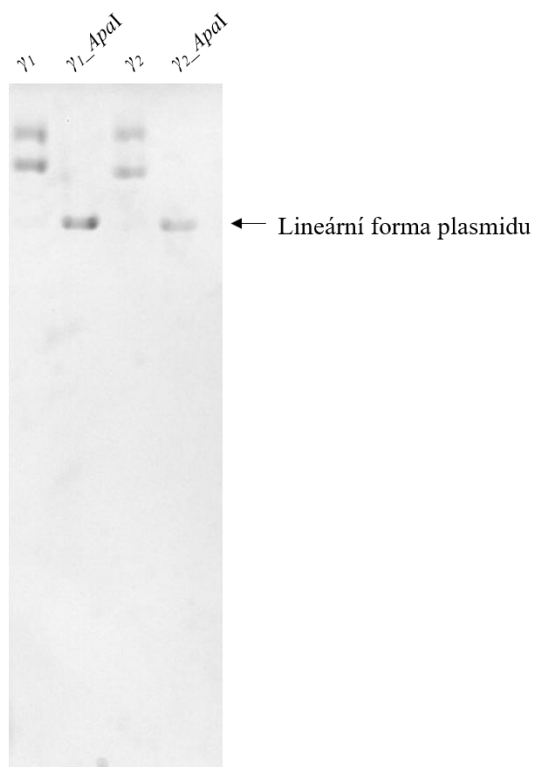
Obr. 4 Restrikční štěpení genu *iLOV* z vektoru pGEX_*iLOV* enzymem *ApaI*. (A) Standard molekulové hmotnosti GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder. (B) Elektroforetogram (neštěpený, štěpený).

4.1.3 Restrikční štěpení a defosforylace virových podjednotek γ_1 a γ_2

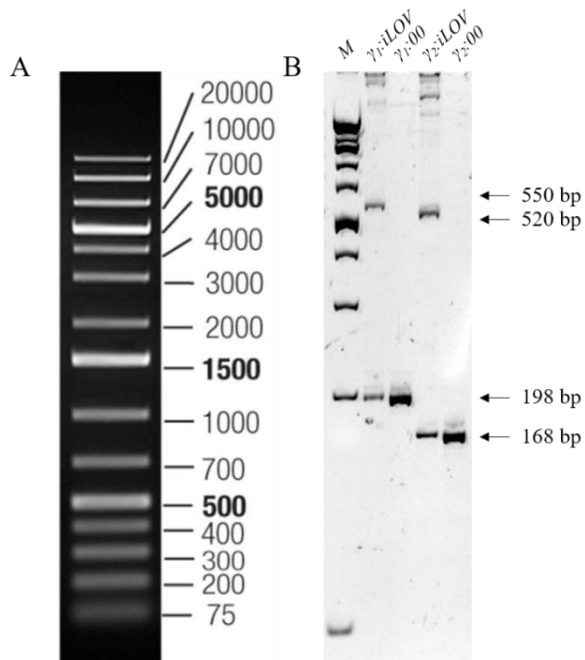
Rovněž podjednotky viru BSMV byly štěpeny enzymem *ApaI*. Do reakce byla přidána také alkalická fosfatasa, která způsobila defosforylaci konců, aby nedošlo ke znovu-spojení vektoru. Obr. 5 znázorňuje úspěšné naštěpení obou podjednotek (γ_1 a γ_2). V případě neštěpeného plasmidu můžeme vidět jeho superspiralizovanou a relaxovanou formu.

4.1.4 Ligace genu *iLOV* do virových podjednotek

Před transformací vytvořeného konstruktů do *Escherichia coli* byla provedena PCR amplifikace pro ověření úspěšnosti ligace. Na Obr. 6 je znázorněno, že ligace proběhla úspěšně, ačkoliv bylo ve směsích obsaženo také nemalé množství prázdných vektorů.



Obr. 5 Restrikční štěpení podjednotek viru BSMV enzymem *ApaI*. Elektroforetogram. Štěpený plasmid se pohybuje gelem nejrychleji, proto je na obrázku nejniž.

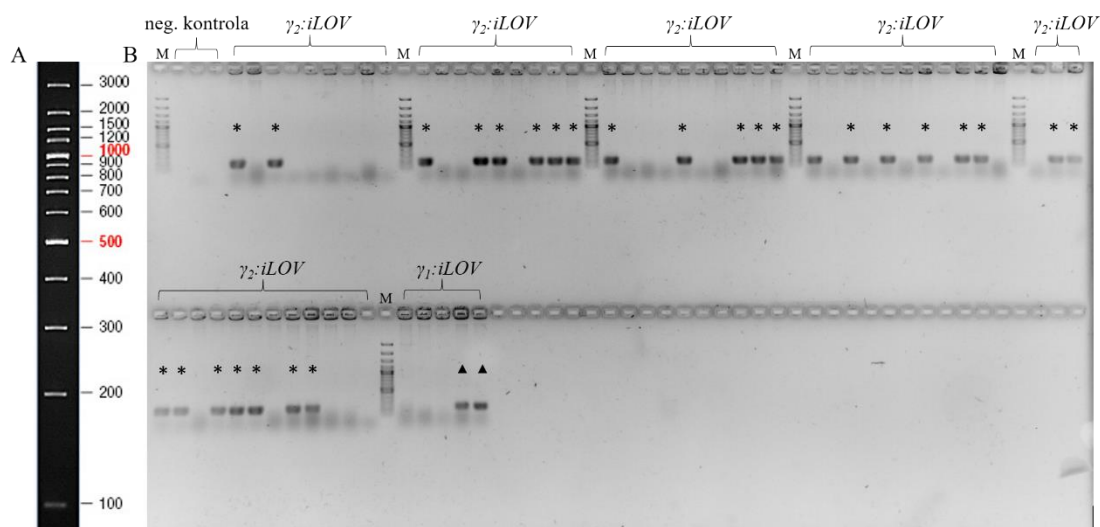


Obr. 6 Ověření ligace genu *iLOV* do podjednotek viru BSMV (A) Standard molekulové hmotnosti GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder. (B) Elektroforetogram. Podjednotky γ_1 a γ_2 s vloženým genem *iLOV* mají velikost 550 bp, resp. 520 bp. Prázdný vektor γ_1 má velikost 198 bp, prázdný vektor γ_2 má velikost 168 bp.

4.2 Transformace *Escherichia coli* DH5 α

4.2.1 Ověření úspěšnosti elektroporace pomocí colony PCR

Přítomnost vytvořeného konstruktu v bakteriálním plasmidu byla ověřena pomocí colony PCR. Primery byly zvoleny tak, aby bylo rovněž možné určit, které kolonie obsahují konstrukty se správnou orientací insertu *iLOV* (pouze v případě správně orientovaného insertu došlo k amplifikaci a následné vizualizaci produktů, Obr. 7).



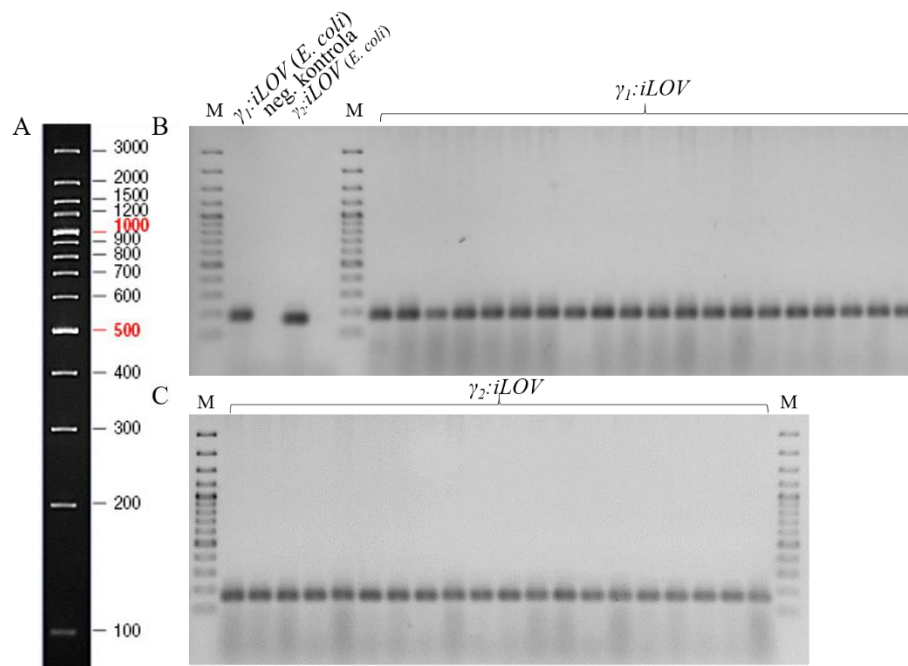
Obr. 7 Colony PCR *Escherichia coli* DH5 α . (A) Standard molekulové hmotnosti GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder. (B) Elektroforetogram. Symbolem * jsou označeny klony se správnou orientací insertu *iLOV* v podjednotce γ_2 . Symbolem ▲ jsou označeny klony se správnou orientací insertu *iLOV* v podjednotce γ_1 .

4.2.2 Vyhodnocení sekvenačních dat

Kolonie *E. coli*, které byly prostřednictvím colony PCR identifikovány jako pozitivní, tj. obsahující dané konstrukty, byly sekvenovány, aby byly vyselektovány pouze klony bez nežádoucích mutací v sekvenci nukleotidů. Sekvence byla prováděna Mgr. Lucií Bílkovou. Obdržené výsledky sekvenace byly dále analyzovány pomocí softwaru MEGA-X. Byl proveden alignment všech sekvencí a byly vyselektovány pouze sekvence se 100% shodou s referenční sekvencí.

4.3 Transformace *Agrobacterium tumefaciens* EHA105

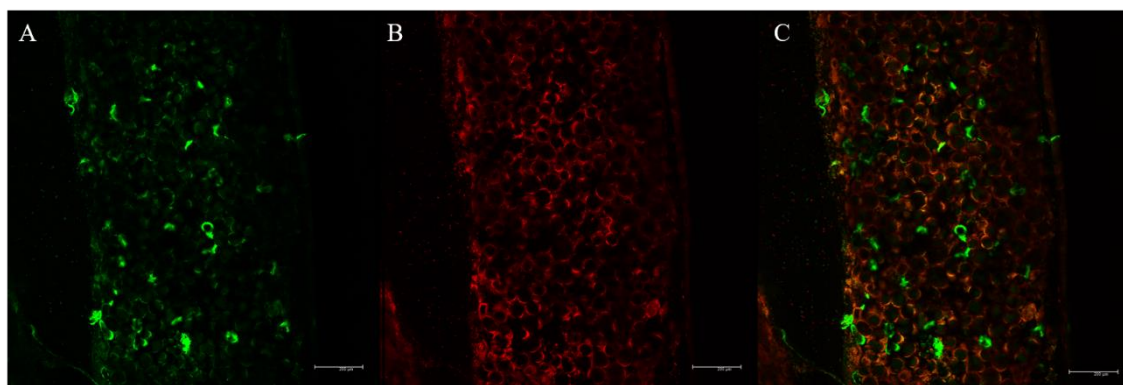
Přítomnost vyzolovaného bakteriálního plasmidu v koloniích *A. tumefaciens* byla potvrzena pomocí colony PCR. Na Obr. 8 jsou znázorněny vybrané klony bakterie *A. tumefaciens* nesoucí modifikované podjednotky viru BSMV, a sice $\gamma_1:iLOV$ a $\gamma_2:iLOV$.



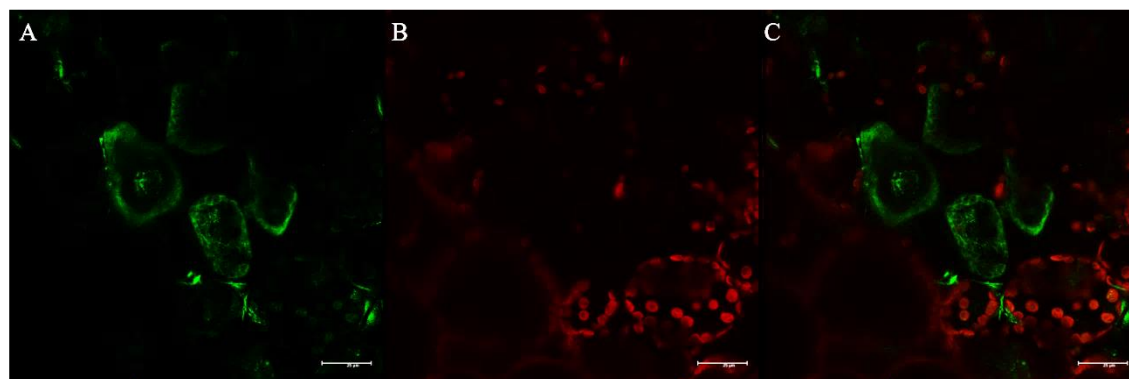
Obr. 8 Colony PCR *Agrobacterium tumefaciens* EHA105. (A) Standard molekulové hmotnosti GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder. (B) Elektroforetogram klonů nesoucích modifikovanou podjednotku $\gamma_1:iLOV$. (C) Elektroforetogram klonů nesoucích modifikovanou podjednotku $\gamma_2:iLOV$.

4.4 Agroinfiltrace listů *Nicotiana benthamiana*

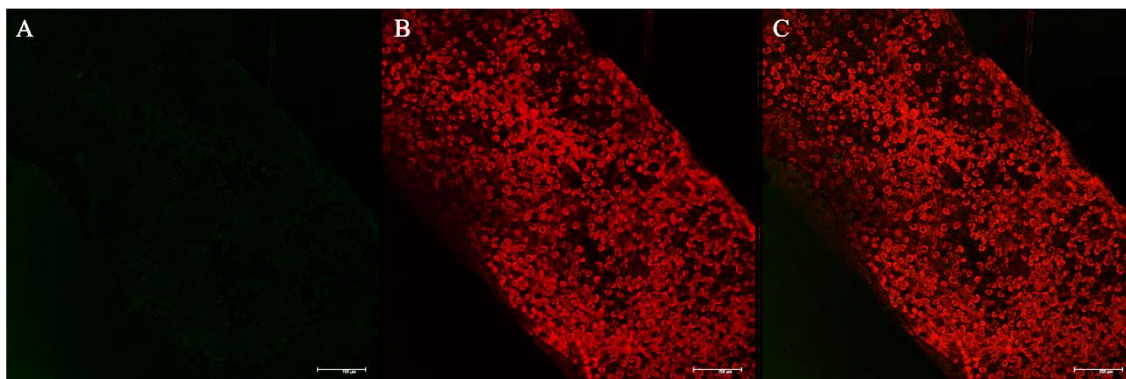
Pomocí fluorescenční mikroskopie byla ověřena přítomnost viru BSMV v listech *Nicotiana benthamiana*. Díky použití reportérového genu *iLOV* a vhodného laseru (488 nm) a odpovídajícím emisním filtrem pro zelenou barvu byla identifikována přítomnost celého viru v rostlině. Laser o vlnové délce 546 nm s odpovídajícím emisním filtrem pro červenou barvu byl použit pro vyloučení případné autofluorescence (způsobené například poraněním listu při agroinfiltraci). Výsledky mikroskopování *N. benthamiana* jsou zobrazeny na Obr. 9-11. Na Obr. 9A a 9C lze pozorovat pozitivní zelený signál, který indikuje přítomnost *iLOV* (a tím i přítomnost celého viru). Obr. 10 znázorňuje listy tabáku při větším zvětšení. Rovněž můžeme pozorovat pozitivní fluorescenci. Na Obr. 11, který znázorňuje negativní kontrolu (listy bez ošetření), naopak zelený signál pozorovat nelze.



Obr. 9 Listy *Nicotiana benthamiana* ošetřené *A. tumefaciens* nesoucí $\gamma_2:iLOV$. (A) Pozitivní zelený signál indikuje přítomnost reportérového genu *iLOV* (laser: 488 nm). (B) Pozitivní červený signál pro zobrazení autofluorescence (laser: 546 nm). (C) Překryv obou signálů. Měřítko: 200 μm ; zvětšení objektivu: 10x.



Obr. 10 Agroinfiltrované listy *Nicotiana benthamiana* (detail). (A) Pozitivní zelený signál indikuje přítomnost reportérového genu *iLOV* (laser: 488 nm). (B) Pozitivní červený signál pro zobrazení autofluorescence (laser: 546 nm). (C) Překryv obou signálů. Měřítko: 25 μm ; zvětšení objektivu: 63x (imerzní olej).



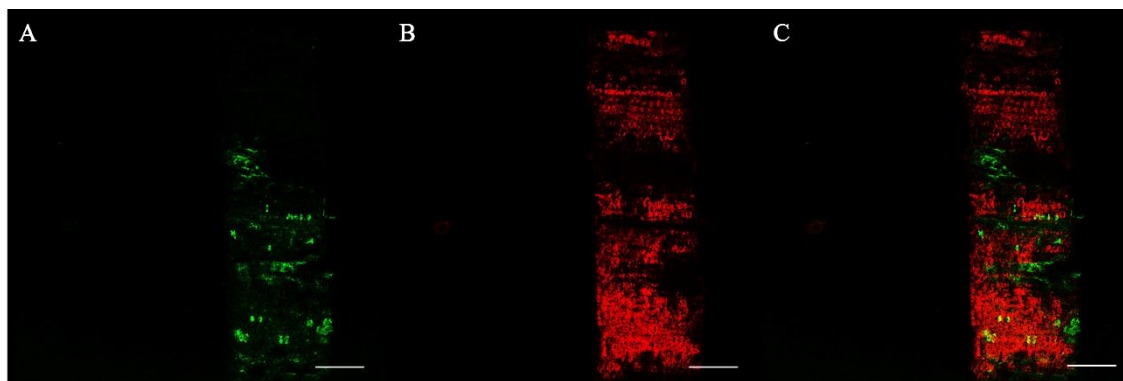
Obr. 11 Listy *Nicotiana benthamiana* bez ošetření (negativní kontrola). (A) Absence zeleného signálu indikuje nepřítomnost reportérového genu *iLOV*. (B) Pozitivní červený signál pro zobrazení autofluorescence (laser: 546 nm). (C) Překryv obou signálů. Měřítko: 200 μ m; zvětšení objektivu: 10x.

4.5 Infekce *Triticum sp.* a *Hordeum sp.*

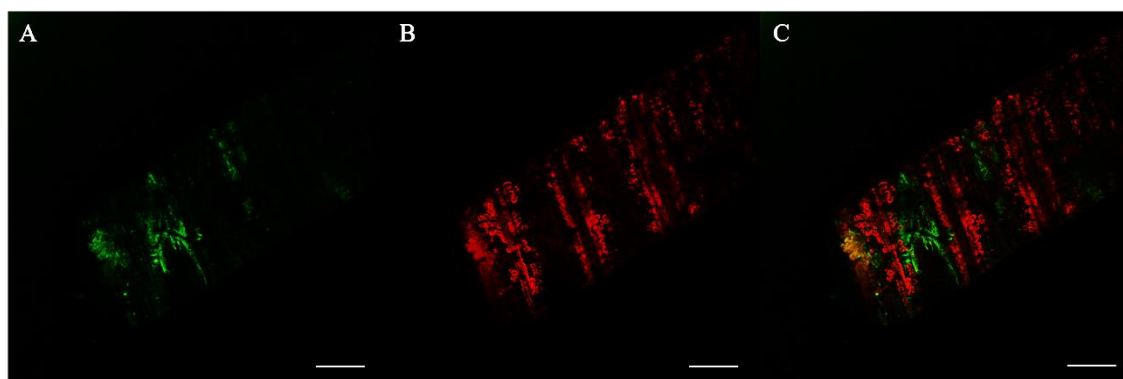
K infekci jednoděložných plodin byly zvoleny dvě metody – abraze listů a imbibice semen. Při obou metodách byl využíván vytvořený virový homogenát. Pomocí fluorescenční mikroskopie, která umožnila detekovat přítomnost viru díky reportéru *iLOV*, bylo zjištěno, které z použitých kultivarů pšenice a ječmene jsou infikovatelné virem BSMV. Při mikroskopování byly použity stejné lasery, jako v případě mikroskopie *N. benthamiana* – 488 nm pro detekci *iLOV*, 546 nm pro detekci autofluorescence. Na obrázcích 12–27 jsou znázorněny výsledky fluorescenční mikroskopie.

4.5.1 Abraze listů *Triticum sp.* a *Hordeum sp.*

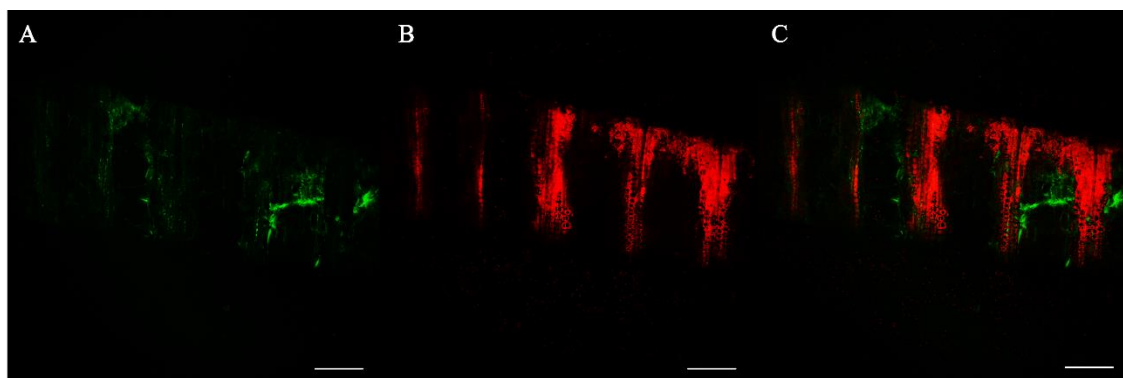
K této metodě infekce byly zvoleny rozličné kultivary pšenice a ječmene. Na obrázcích 12-14 jsou zobrazeny pšeničné kultivary, na obrázcích 15-21 jsou zobrazeny kultivary ječmene. Na Obr. 12 je znázorněn kultivar EBL. Jedná se o *Triticum turgidum*, poddruh *diccicum*. Jelikož můžeme pozorovat pozitivní zelený signál, tento kultivar byl vyhodnocen jako senzitivní k viru BSMV. Dalším testovaným kultivarem byl DIM-25 (*Triticum durum*), který je zobrazen na Obr. 13. Tento kultivar byl také vyhodnocen jako senzitivní. Rovněž kultivar GZ1 (*Triticum turgidum*, poddruh *diccicum*), který je zobrazen na Obr. 14, vykazoval fluorescenci, tedy náchylnost k virové infekci.



Obr. 12 EBL (*Triticum turgidum*, poddruh *diccicum*). (A) Pozitivní zelený signál indikuje přítomnost reportérového genu *iLOV* (laser: 488 nm). (B) Pozitivní červený signál pro zobrazení autofluorescence (laser: 546 nm). (C) Překryv obou signálů. Měřítko: 250 μm ; zvětšení objektivu: 10x.

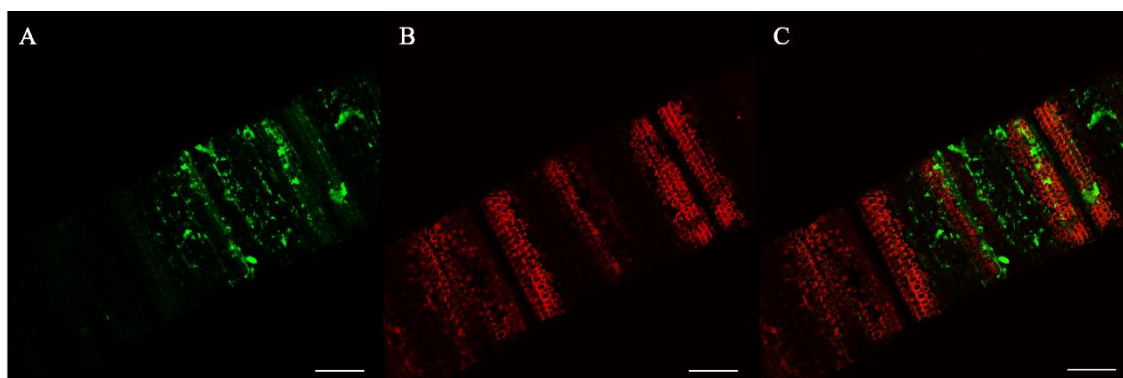


Obr. 13 DIM-25 (*Triticum durum*). (A) Pozitivní zelený signál indikuje přítomnost reportérového genu *iLOV* (laser: 488 nm). (B) Pozitivní červený signál pro zobrazení autofluorescence (laser: 546 nm). (C) Překryv obou signálů. Měřítko: 250 μm ; zvětšení objektivu: 10x.

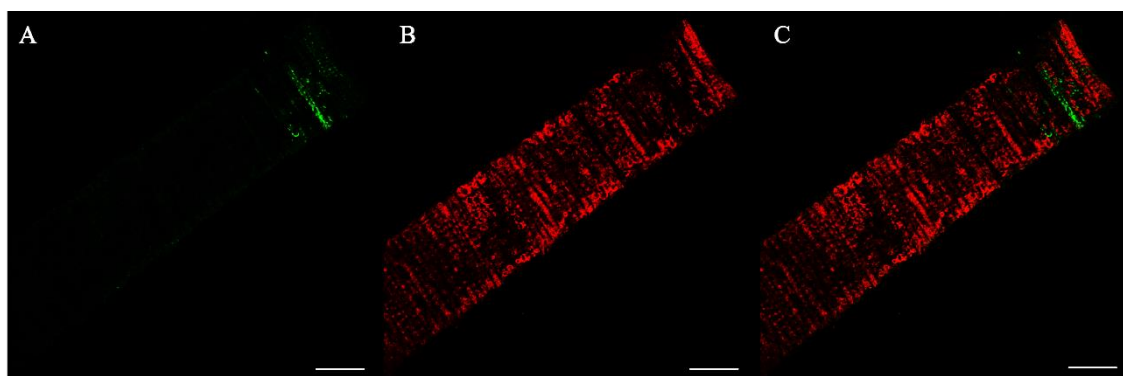


Obr. 14 GZ1 (*Triticum turgidum*, poddruh *diccicum*). (A) Pozitivní zelený signál indikuje přítomnost reportérového genu *iLOV* (laser: 488 nm). (B) Pozitivní červený signál pro zobrazení autofluorescence (laser: 546 nm). (C) Překryv obou signálů. Měřítko: 150 μm ; zvětšení objektivu: 10x.

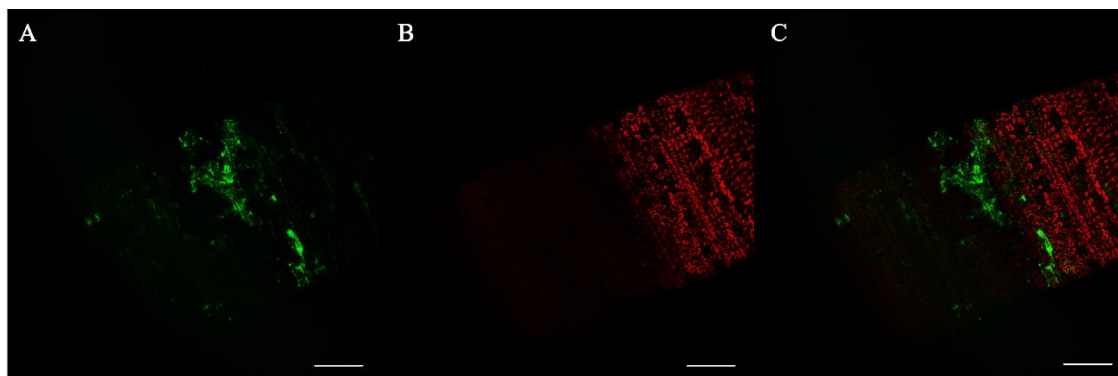
Dále bylo metodou abraze listů testováno 5 ječmenných kultivarů nesoucích geny *Mla* (geny rezistence k *Blumeria graminis*, tj. padlí travní). Kultivary označované jako Timori a BR-5783 byly vyhodnoceny jako senzitivní. Pozitivní signál se rovněž vyskytoval rovněž více než 1 cm vedle místa abraze, což by mohlo znamenat, že se virus rostlinou šířil. Na Obr. 15 a 16 lze pozorovat kultivar Timori, přičemž Obr. 15 znázorňuje oblast abraze listu, na Obr. 16 je oblast listu vzdálená 1 cm od místa abraze. Obr. 17 a 18 zobrazují kultivar BR5783. Obr. 17 znázorňuje oblast abraze listu, na Obr. 18 je oblast listu vzdálená 1 cm od místa abraze. Na Obr. 19 je ječmenný kultivar Lumar, který rovněž vykazuje pozitivitu, stejně jako kultivar HE2716 na Obr. 20. Naproti tomu poslední testovaný kultivar ječmene, Algerian 3, byl vyhodnocen jako neinfikovatelný virem BSMV (znázorněno na Obr. 21). Pro úplnost byla nasnímána také negativní kontrola, tedy list bez ošetření virem. Negativní kontrola (listy bez ošetření BSMV) je zobrazena na Obr. 22.



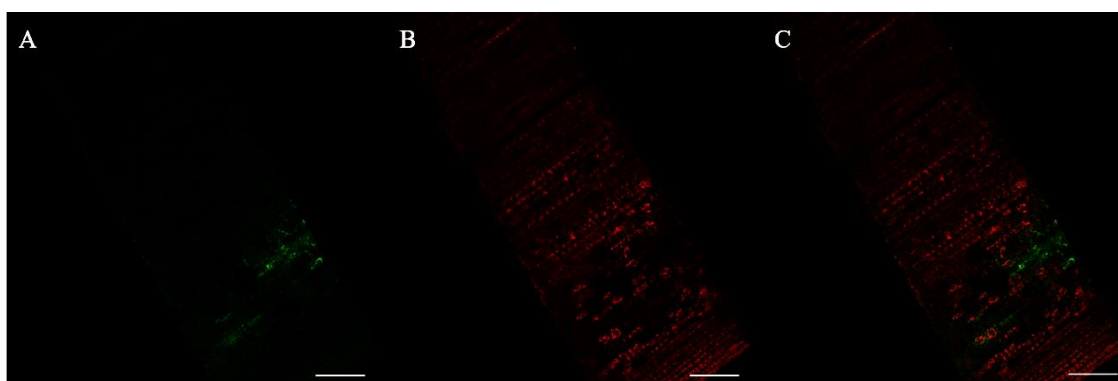
Obr. 15 Timori (*Hordeum* sp.). (A) Pozitivní zelený signál indikuje přítomnost reportérového genu *iLOV* (laser: 488 nm). (B) Pozitivní červený signál pro zobrazení autofluorescence (laser: 546 nm). (C) Překryv obou signálů. Měřítko: 150 μ m; zvětšení objektivu: 10x.



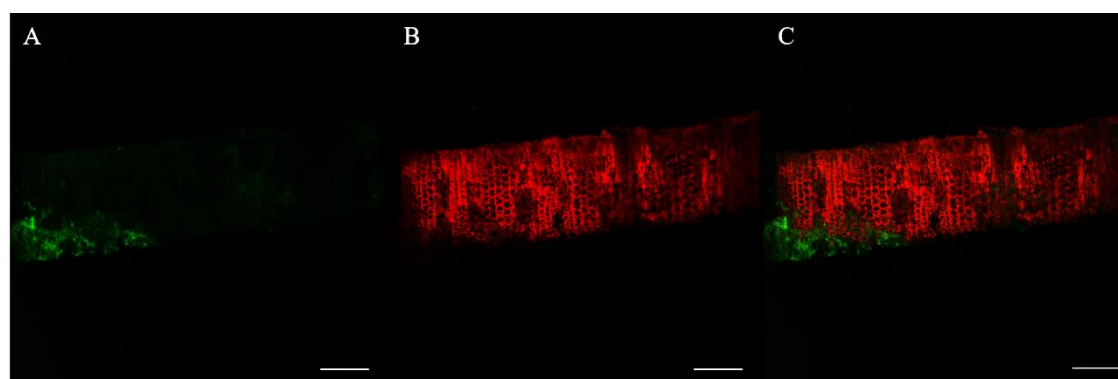
Obr. 16 Timori (*Hordeum* sp.), pozorování listu 1 cm od místa abraze. (A) Pozitivní zelený signál v horní části obrázku indikuje přítomnost reportérového genu *iLOV* (laser: 488 nm), tedy šíření viru rostlinou. (B) Pozitivní červený signál pro zobrazení autofluorescence (laser: 546 nm). (C) Překryv obou signálů. Měřítko: 250 μ m; zvětšení objektivu: 10x.



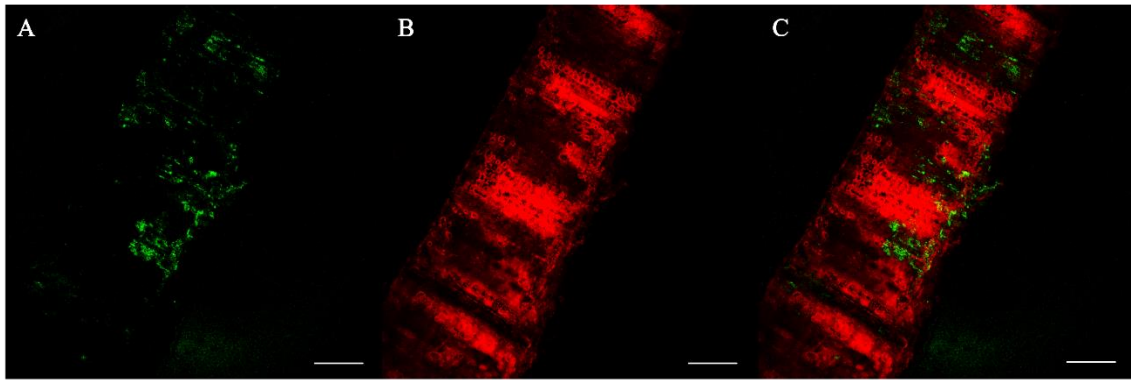
Obr. 17 BR-5783 (*Hordeum* sp.). (A) Pozitivní zelený signál indikuje přítomnost reportérového genu *iLOV* (laser: 488 nm). (B) Pozitivní červený signál pro zobrazení autofluorescence (laser: 546 nm). (C) Překryv obou signálů. Měřítko: 150 μ m; zvětšení objektivu: 10x.



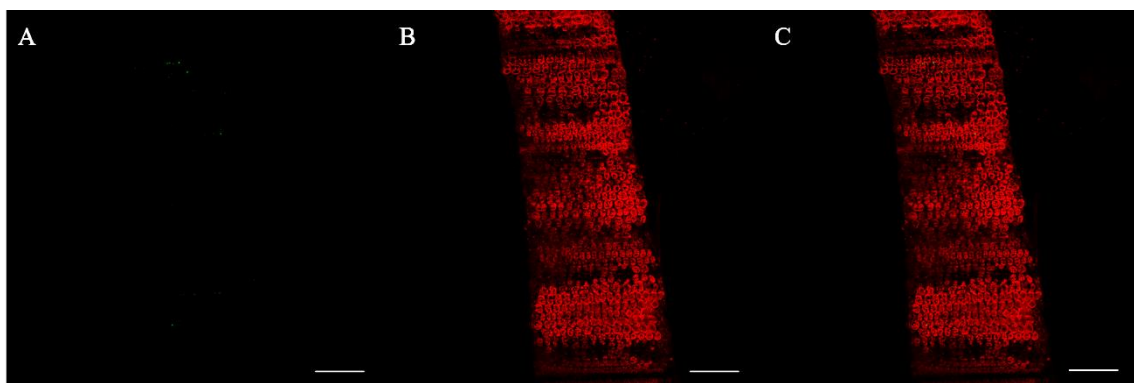
Obr. 18 BR-5783 (*Hordeum* sp.), pozorování listu 1 cm od místa abraze. (A) Pozitivní zelený signál v dolní části obrázku indikuje přítomnost reportérového genu *iLOV* (laser: 488 nm), tedy šíření viru rostlinou. (B) Pozitivní červený signál pro zobrazení autofluorescence (laser: 546 nm). (C) Překryv obou signálů. Měřítko: 150 μ m; zvětšení objektivu: 10x.



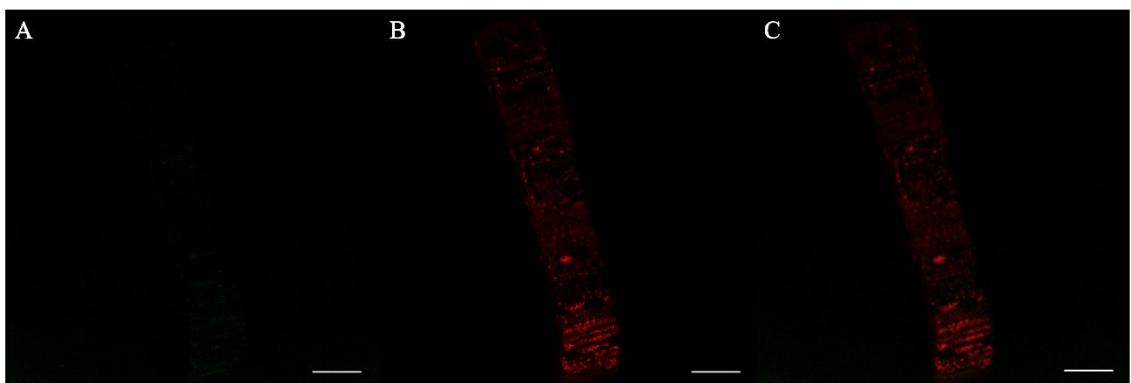
Obr. 19 Lumar (*Hordeum* sp.). (A) Pozitivní zelený signál indikuje přítomnost reportérového genu *iLOV* (laser: 488 nm). (B) Pozitivní červený signál pro zobrazení autofluorescence (laser: 546 nm). (C) Překryv obou signálů. Měřítko: 250 μ m; zvětšení objektivu: 10x.



Obr. 20 HE-2716 (*Hordeum* sp.). (A) Pozitivní zelený signál indikuje přítomnost reportérového genu *iLOV* (laser: 488 nm). (B) Pozitivní červený signál pro zobrazení autofluorescence (laser: 546 nm). (C) Překryv obou signálů. Měřítko: 250 μ m; zvětšení objektivu: 10x.



Obr. 21 Algerian 3 (*Hordeum* sp.). (A) Negativní zelený signál indikuje absenci reportérového genu *iLOV*, tedy neinfikovatelnost tohoto kultivaru virem BSMV (laser: 488 nm). (B) Pozitivní červený signál pro zobrazení autofluorescence (laser: 546 nm). (C) Překryv obou signálů. Měřítko: 250 μ m; zvětšení objektivu: 10x.

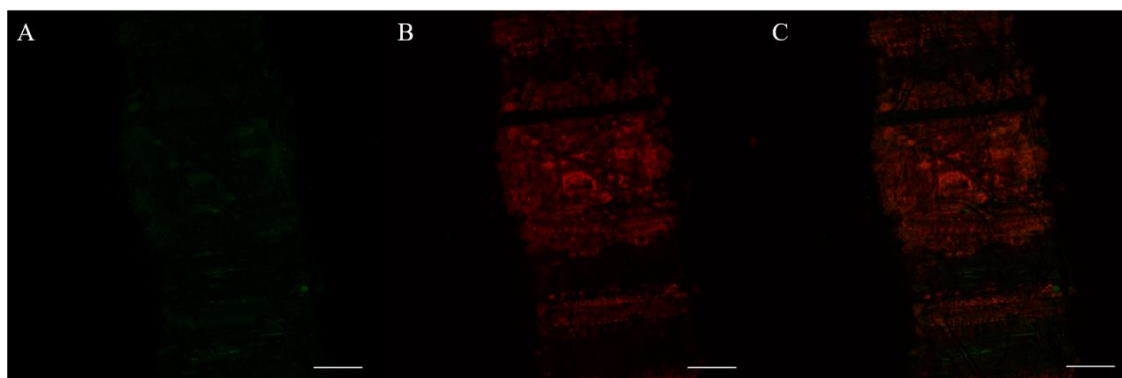


Obr. 22 Negativní kontrola (listy bez ošetření virem BSMV). (A) Absence zeleného signálu indikuje nepřítomnost reportérového genu *iLOV*. (B) Pozitivní červený signál pro zobrazení autofluorescence (laser: 546 nm). (C) Překryv obou signálů. Měřítko: 250 μ m; zvětšení objektivu: 10x.

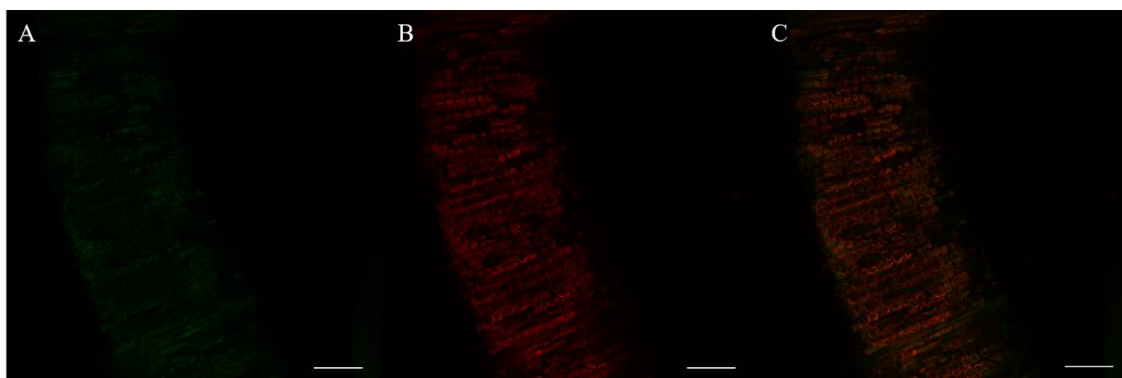
4.5.2 Imbibice semen *Triticum* sp.

Pro tuto metodu infekce byly zvoleny pouze pšeničné kultivary. Testování ječmenných kultivarů nebylo realizováno z důvodu slabé klíčivosti a pandemické situace ve světě.

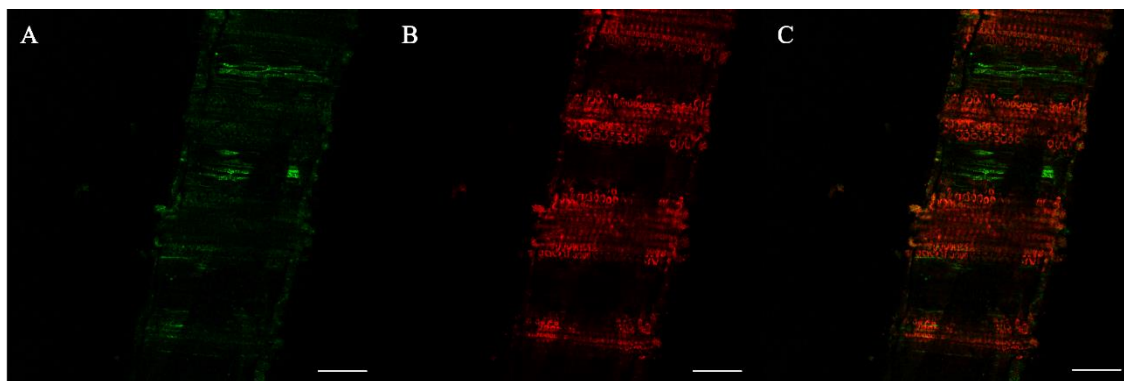
Na Obr. 23 je zobrazen kultivar DIM-25 (*Triticum durum*), a na Obr. 24 je zobrazen kultivar EBL (*Triticum turgidum*, poddruh *diccicum*). Oba kultivary nebyly infikované virem BSMV, jelikož nevykazovaly pozitivní zelený signál. Naproti tomu u kultivarů TCL-9199 Rhino a GZ1, jež jsou zobrazeny na Obr. 25, resp. 26, se objevil slabší zelený signál. Na Obr. 27 je znázorněna negativní kontrola. Pro přehlednost jsou jednotlivé testované kultivary uvedeny v Tab. 14.



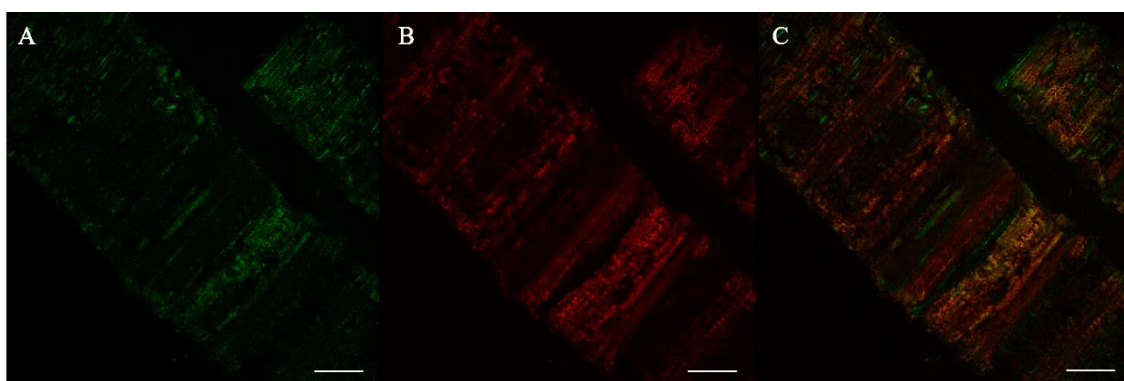
Obr. 23 DIM-25 (*Triticum durum*). (A) Negativní zelený signál indikuje absenci reportérového genu *iLOV* (laser: 488 nm). (B) Pozitivní červený signál pro zobrazení autofluorescence (laser: 546 nm). (C) Překryv obou signálů. Měřítko: 150 μm ; zvětšení objektivu: 10x.



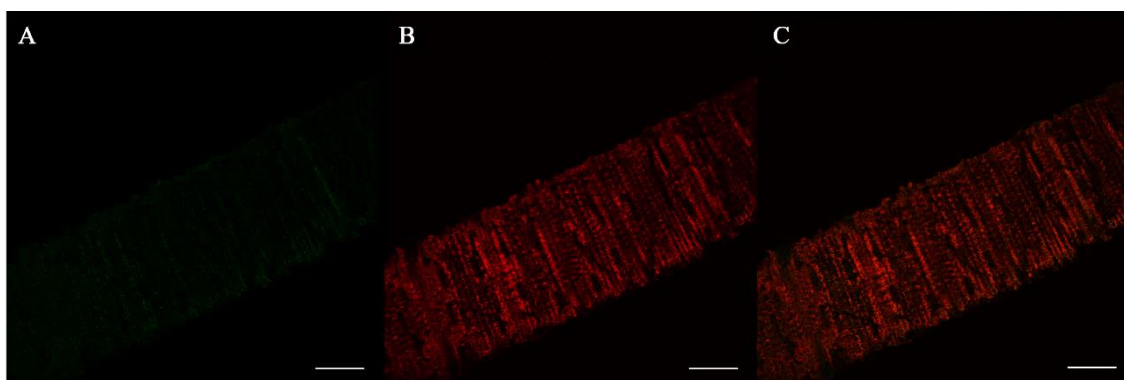
Obr. 24 EBL (*Triticum turgidum*, poddruh *diccicum*). (A) Negativní zelený signál indikuje absenci reportérového genu *iLOV* (laser: 488 nm). (B) Pozitivní červený signál pro zobrazení autofluorescence (laser: 546 nm). (C) Překryv obou signálů. Měřítko: 250 μm ; zvětšení objektivu: 10x.



Obr. 25 TCL-9199 Rhino. (A) Pozitivní zelený signál indikuje přítomnost reportérového genu *iLOV* (laser: 488 nm). (B) Pozitivní červený signál pro zobrazení autofluorescence (laser: 546 nm). (C) Překryv obou signálů. Měřítko: 200 μm ; zvětšení objektivu: 10x.



Obr. 26 GZ1 (*Triticum turgidum*, poddruh *diccocum*). Pozitivní zelený signál indikuje přítomnost reportérového genu *iLOV* (laser: 488 nm). (B) Pozitivní červený signál pro zobrazení autofluorescence (laser: 546 nm). (C) Překryv obou signálů. Měřítko: 200 μm ; zvětšení objektivu: 10x.



Obr. 27 Negativní kontrola (listy bez ošetření virem BSMV). (A) Absence zeleného signálu indikuje nepřítomnost reportérového genu *iLOV*. (B) Pozitivní červený signál pro zobrazení autofluorescence (laser: 546 nm). (C) Překryv obou signálů. Měřítko: 200 μm ; zvětšení objektivu: 10x.

Tab. 14 Infikovatelnost kultivarů pšenice a ječmene virem BSMV.

Rostlinný druh	Kultivar	Infikovatelnost	
		Abraze listů	Imbibice semen
Pšenice	DIM 25-5	ano	ne
	EBL	ano	ne
	GZ1	ano	ano
	TCL-9199 Rhino	prozatím netestováno	ano
Ječmen	Timori	ano (i šíření viru)	prozatím netestováno
	BR-5783	ano (i šíření viru)	prozatím netestováno
	Lumar	ano	prozatím netestováno
	HE-2716	ano	prozatím netestováno
	Algerian 3	ne	prozatím netestováno

5 DISKUZE

Jedním z cílů této diplomové práce bylo navýšení funkční kapacity viru *Barley stripe mosaic virus* použitím reportérového genu *iLOV*, který má zhruba poloviční velikost proti běžně využívanému reportérovému genu *GFP*. Reportér *iLOV* byl naklonován do dvou podjednotek virového genomu, a sice γ_1 a γ_2 . Prostřednictvím elektroporační metody byla modifikovaná DNA přenesena do *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 pro účely následné agroinfiltrace *Nicotiana benthamiana*. K infekci jednoděložných plodin byly využity dvě metody, abraze listů a imbibice semen.

Využití BSMV jako vhodného nástroje pro VIGS bylo prokázáno v několika studiích, např. v Yuan *et al.* (2011) či Liang *et al.* (2015). Dosavadní systém se však potýkal s několika omezeními, jako například nerovnoměrnou distribucí umlčování genů.

Výsledky abraze listů dokazují, že se rostliny virem BSMV podařilo infikovat. Distribuce signálu je však velmi nerovnoměrná. Mnoho buněk nevykazuje žádnou fluorescence. Tento výsledek koresponduje s poznatky Cheuk a Houde (2018). Z tohoto lze odvodit, že se virové částice nacházely pouze v místech, kde došlo k mechanickému narušení povrchu listu silikagelem. V případě dvou testovaných kultivarů byla fluorescence zjištěna také mimo místo abraze. Tento výsledek by mohl potvrzovat šíření viru rostlinou.

Metoda imbibice semen byla v případě dvou pšeničných kultivarů úspěšná, ačkoliv intenzita fluorescence byla výrazně slabší než u abraze listů. V článku Cheuk a Houde (2018) bylo dosaženo mnohem silnějšího a uniformního fluorescenčního signálu při provádění imbibice semen. Stejně jako v této diplomové práci bylo mikroskopické pozorování prováděno po 7 dnech od infekce. Lze předpokládat, že pro infekci zde použitých kultivarů by bylo potřeba provést imbibici semen v méně naředěném virovém homogenátu. Tato optimalizace by měla vést k rovnoměrné expresi genů v různých typech pletiv již v první generaci. Rovněž je nutné otestovat větší množství kultivarů, což by bylo vzhledem k připravenému materiálu časově nenáročné. Jedná se o relativně snadnou, časově i finančně nenáročnou metodu v porovnání s produkcí transgenních rostlin. Tento nástroj může být v budoucnu využit pro studium funkce kandidátních genů.

6 ZÁVĚR

Tato diplomová práce se zabývala využitím viru *Barley stripe mosaic virus* jako potenciálně vhodného vektoru pro editaci genomu jednoděložných rostlin. V rámci teoretické části byly prostudovány a sepsány informace o pšenici, editaci genomu, možnostech tradičních i moderních způsobů transformace, alternativních přístupech využívajících viry jako VIGS a VOX, a v neposlední řadě o virech vhodných pro editaci genomu.

Experimentální část práce byla zaměřena na navýšení funkční kapacity viru *Barley stripe mosaic virus* použitím reportérového genu *iLOV*, který byl úspěšně naklonován do dvou podjednotek viru. Po vytvoření konstruktů byla provedena transformace *Escherichia coli* DH5 α . Pomocí colony PCR a sekvenace bylo zjištěno, které klony obsahují přesnou sekvenci nukleotidů a byla provedena izolace plasmidové DNA. Pro účely agroinfiltrace *Nicotiana benthamiana* byly plasmidem úspěšně transformovány buňky *Agrobacterium tumefaciens* EHA105. Vytvořenou suspenzí buněk *Agrobacterium* obsahující modifikované virové podjednotky byla provedena agroinfiltrace listů *N. benthamiana*. Po ověření úspěšnosti agroinfiltrace pomocí fluorescenčního mikroskopu byl z infiltrovaných listů vytvořen homogenát.

Dalším cílem práce bylo ověřit infikovatelnost vybraných kultivarů pšenice a ječmene. Pro infekci byly zvoleny dvě rozličné metody – abraze listů a imbibice semen. Úspěšnost infekce jednotlivých kultivarů byla ověřena pomocí fluorescenční mikroskopie. Z celkem 8 kultivarů infikovaných metodou abraze listů bylo 7 vyhodnoceno jako pozitivní (tedy infikovatelné virem BSMV). V případě 2 kultivarů lze hovořit rovněž o šíření viru rostlinou. Metodou imbibice semen byly infikovány 4 kultivary, z nichž u 2 byla potvrzena infikovatelnost virem BSMV.

Důvodem zjišťování infikovatelnosti výše zmíněným virem byla v případě pšenice následná validace genu rezistence k *Blumeria graminis* (padlí travní) metodou VIGS (virem indukované umlčení genu), v případě ječmene testování funkce genů *Mla* (geny rezistence k *B. graminis*) a *AVR A1* genů z *B. graminis*.

V rámci práce byl připraven dostatek materiálu pro další práci s virem BSMV. Byly vyhotoveny konzervy buněk *Escherichia coli* DH5 α a *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 nesoucích podjednotky γ_1 a γ_2 s reportérovým genem *iLOV*. Rovněž bylo

připraveno dostatečné množství virového homogenátu z listů *N. benthamiana*, který lze použít pro otestování nových kultivarů.

7 LITERATURA

- Appels R., Eversole K., Stein N., Feuillet C., Keller B., Rogers J., Pozniak C.J., Choulet F., Distelfeld A., Poland J., Ronen G., Sharpe A.G., Barad O., Baruch K., Keeble-Gagnère G., Mascher M., Ben-Zvi G., Josselin A.-A., Himmelbach A., Balfourier F., Gutierrez-Gonzalez J., Hayden M., Koh C., Muehlbauer G., Pasam R.K., Paux E., Rigault P., Tibbits J., Tiwari V., Spannagl M., Lang D., Gundlach H., Haberer G., Mayer K.F.X., Ormanbekova D., Prade V., Šimková H., Wicker T., Swarbreck D., Rimbart H., Felder M., Guilhot N., Kaithakottil G., Keilwagen J., Leroy P., Lux T., Twardziok S., Venturini L., Juhász A., Abrouk M., Fischer I., Uauy C., Borrill P., Ramirez-Gonzalez R.H., Arnaud D., Chalabi S., Chalhoub B., Cory A., Datla R., Davey M.W., Jacobs J., Robinson S.J., Steuernagel B., Ex F.V., Wulff B.B.H., Benhamed M., Bendahmane A., Concia L., Latrasse D., Bartoš J., Bellec A., Berges H., Doležel J., Frenkel Z., Gill B., Korol A., Letellier T., Olsen O.-A., Singh K., Valárik M., Vossen E.V.D., Vautrin S., Weining S., Fahima T., Glikson V., Raats D., Číhalíková J., Toegelová H., Vrána J., Sourdille P., Darrier B., Barabaschi D., Cattivelli L., Hernandez P., Galvez S., Budak H., Jones J.D.G., Witek K., Yu G., Small I., Melonek J., Zhou R., Belova T., Kanyuka K., King R., Nilsen K., Walkowiak S., Cuthbert R., Knox R., Wiebe K., Xiang D., Rohde A., Golds T., Čížková J., Akpinar B.A., Biyikliglu S., Gao L., N'Daiye A., Kubaláková M., Šafař J., Alfama F., Adam-Blondon A.-F., Flores R., Guerche C., Loaec M., Quesneville H., Condie J., Ens J., Maclachlan R., Tan Y., Alberti A., Aury J.-M., Barbe V., Couloux A., Cruaud C., Labadie K., Mangenot S., Wincker P., Kaur G., Luo M., Sehgal S., Chhuneja P., Gupta O.P., Jindal S., Kaur P., Malik P., Sharma P., Yadav B., Singh N.K., Khurana J.P., Chaudhary C., Khurana P., Kumar V., Mahato A., Mathur S., Sevanthi A., Sharma N., Tomar R.S., Holušová K., Plíhal O., Clark M.D., Heavens D., Kettleborough G., Wright J., Balcárková B., Hu Y., Salina E., Ravin N., Skryabin K., Beletsky A., Kadnikov V., Mardanov A., Nesterov M., Rakitin A., Sergeeva E., Handa H., Kanamori H., Katagiri S., Kobayashi F., Nasuda S., Tanaka T., Wu J., Cattonaro F., Jiumeng M., Kugler K., Pfeifer M., Sandve S., Xun X., Zhan B., Batley J., Bayer P.E., Edwards D., Hayashi S., Tulpová Z., Visendi P., Cui L., Du X., Feng K., Nie X., Tong W., Wang L. (2018): Shifting the limits in wheat research and breeding using a fully annotated reference genome. *Science* **361**.
- Alexandratos N., Bruinsma J. (2012): World agriculture towards 2030/2050: the 2012 revision. *ESA Working paper* **12**(3).
- Barrangou R. (2015): The roles of CRISPR-Cas systems in adaptive immunity and beyond. *Current Opinion in Immunology* **32**, 36-41.
- Baulcombe D.C., Chapman S., Santa-Cruz S. (1995): Jellyfish green fluorescent protein as a reporter for virus infections. *The Plant Journal* **7**, 1045-1053.
- Beijerinck M. W. (1898): Über ein Contagium vivum fluidum als Ursache der Fleckenkrankheit der Tabaksblätter. *Verhandelingen der Koninklijke akademie van Wetenschappen te Amsterdam* **65**, 1-22.
- Belfort M., Roberts R.J. (1997): Homing endonucleases: keeping the house in order. *Nucleic Acids Research* **25**, 3379-3388.
- Bhalla P.L. (2006): Genetic engineering of wheat-current challenges and opportunities. *Trends in Biotechnology* **24**, 305-311.
- Bibikova M., Carroll D., Segal D.J., Trautman J.K., Smith J., Kim Y.G., Chandrasegaran S. (2001): Stimulation of homologous recombination through targeted cleavage by chimeric nucleases. *Molecular and Cellular Biology* **21**, 289-297.
- Bitinaite J., Wah D. A., Aggarwal A. K., Schildkraut I. (1998): *FokI* dimerization is required for DNA cleavage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 10570-10575.
- Bogdanove A. J., Voytas D. F. (2011). TAL Effectors: Customizable Proteins for DNA Targeting. *Science* **333**(6051), 1843-1846.
- Boch J., Scholze H., Schornack S., Landgraf A., Hahn S., Kay S., Lahaye T., Nickstadt A., Bonas U. (2009) Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science* **326** 1509-1512.

- Boch J., Bonas U. (2010): *Xanthomonas* AvrBs3 family-type III effectors: discovery and function. *Annual Review of Phytopathology* **48**, 419-36.
- Bolotin A., Quinquis B., Sorokin A., Ehrlich S. (2005) Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology* **151**, 2551-2561.
- Bragg J.N., Jackson A.O. (2004): The C-terminal region of the *Barley stripe mosaic virus* gamma b protein participates in homologous interactions and is required for suppression of RNA silencing. *Molecular Plant Pathology* **5**(5), 465-481.
- Bragg J.N., Lim H.S., Jackson A.O. (2008): Hordeivirus. In: *Encyclopedia of Virology* (Mahy B.W.J., Regenmortel M.H.V.v. eds.), Oxford Academic Press, 459-467.
- Cakir C., Gillespie M.E., Scofield S.R. (2010): Rapid determination of gene function by virus-induced gene silencing in wheat and barley. *Crop Science* **50**, 77-84.
- Cermak T., Doyle E.L., Christian M., Wang L., Zhang Y., Schmidt C., Baller J.A., Somia N.V., Bogdanove A.J., and Voytas D.F. (2011): Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic Acids Research* **39**(12).
- Cooper R. (2015): Re-discovering ancient wheat varieties as functional foods. *Journal of traditional and complementary medicine* **5**(3), 138-143.
- Davies J. P., Kumar S., Sastry-Dent L. (2017): Use of Zinc-Finger Nucleases for Crop Improvement. *Gene Editing in Plants*, 47-63.
- de Framond A.J., Bevan M.W., Barton K.A., Flavell R., Chilton M.D. (1983): Mini-Ti plasmid and a chimeric gene construct: New approaches to plant gene vector construction. In: *Advances in Gene Technology: Molecular Genetics of Plants and Animals. Miami Winter Symp* (Downey K., Voellmy R.W., Ahmad F. eds.), Florida, Elsevier, 159-170.
- Donald R.G., Jackson A.O. (1994): The *Barley stripe mosaic virus* gamma b gene encodes a multifunctional cysteine-rich protein that affects pathogenesis. *The Plant Cell* **6**(11), 1593-1606.
- Dubcovsky J., Dvořák J. (2007): Genome plasticity a key factor in the success of polyploid wheat under domestication. *Science* **316**, 1862-1866.
- Dvořák J., McGuire P. E., Cassidy B. (1988): Apparent sources of the A genomes of wheats inferred from polymorphism in abundance and restriction fragment length of repeated 51 nucleotide sequences. *Genome* **30**(5), 680-689.
- Dvořák J., Zhang H. B. (1990): Variation in repeated nucleotide sequences sheds light on the phylogeny of the wheat B and G genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**, 9640-9644.
- Dvořák J., Terlizzi P. Zhang H. B., Resta P. (1993): The evolution of polyploid wheats: identification of the A genome donor species. *Genome* **36**(1), 21-31.
- Feldman M., Lupton F. G. H., Miller T. E. (1995): Wheat. In: *Evolution of Crop Plants* (Smartt J., Simmonds N. W. eds.), New York: Longman Scientific and Technical, 184-192.
- Feuillet C., Langridge P., Waugh R. (2007): Cereal breeding takes a walk on the wild side. *Trends in Genetics* **24**(1), 24-32.
- Fromm M., Taylor L.P., Walbot V. (1985): Expression of genes transferred into monocot and dicot plant cells by electroporation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **82**(17), 5824-5828.
- Furth P.A. (1997): Gene transfer by biolistic process. *Molecular Biotechnology* **7**(2), 139-143.
- Gelvin S.B. (2003): *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the “gene-jockeying” tool. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **67**, 16-37.
- Griffiths S., Sharp R., Foote T. N., Bertin I., Wanous M., Reader S., Colas I., Moore G. (2006): Molecular characterization of Ph1 as a major chromosome pairing locus in polyploid wheat. *Nature* **439**, 749-752.
- Halpin C. (2005): Gene stacking in transgenic plants: the challenge for 21st century plant biotechnology. *Plant Biotechnology Journal* **3**, 141-155.
- Hamilton C. M., Frary A., Lewis C., Tanksley S. D. (1996): Stable transfer of intact high molecular weight DNA into plant chromosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**(18): 9975-9979.

- Hefferon K. (2014): Plant virus expression vector development: new perspectives. *BioMed Research International* **3**.
- Hein I., Barciszewska-Pacak M., Hrubikova K., Williamson S., Dinesen M., Soenderby I.E., Sundar S., Jarmolowski A., Shirasu K., Lacomme C. (2005): Virus-induced gene silencing-based functional characterization of genes associated with powdery mildew resistance in barley. *Plant Physiology* **138**, 2155-2164.
- Heun M., Schafer-Pregl R., Klawan D., Castagna R., Accerbi M., Borghi B., Salamini F. (1997): Site of einkorn wheat domestication identified by DNA fingerprinting. *Science* **278**(5341), 1312-1314.
- Heyer W.D., Ehmsen K.T., Liu J. (2010): Regulation of homologous recombination in eukaryotes. *Annual Review of Genetics* **44**, 113-139.
- Chapman S., Kavanagh T., Baulcombe D. (1992): *Potato virus X* as a vector for gene expression in plants. *The Plant Journal* **2**, 549-557.
- Chapman S., Faulkner C., Kaiserli E., Garcia-Mata C., Savenkov E.I., Roberts A.G., Oparka K.J., 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.
- Cheuk A., Houde M. (2018): A new *Barley stripe mosaic virus* allows large protein overexpression for rapid function analysis. *Plant Physiology* **176**(3), 1919-1931.
- Cheng M., Fry J.E., Pang S., Zhou H., Hironaka C.M., Duncan D.R., Conner T.W., Wan Y. (1997): Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiology* **115**, 971-980.
- Chevalier B.S., Stoddard B.L. (2001): Homing endonucleases: Structural and functional insight into the catalysts of intron/intein mobility. *Nucleic Acids Research* **29**, 3757-3774.
- Chilton M.D., Drummond M.H., Merio D.J., Sciaky D., Montoya A.L., Gordon M.P., Nester E.W. (1977): Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. *Cell* **11**, 263-271.
- Choulet F., Wicker T., Rustenholz C., Paux E., Salse J., Leroy P., Schlub S., Le Paslier M. C., Magdelenat G., Gonthier C., Couloux A., Budak H., Breen J., Pumphrey M., Liu S., Kong X., Jia J., Gut M., Brunel D., Anderson J. A., Gill B. S., Appels R., Keller B., Feuillet C. (2010): Megabase level sequencing reveals contrasted 5S organization and evolution patterns of the wheat gene and transposable element spaces. *The Plant Cell* **22**(6), 1686-1701.
- Christian M., Cermak T., Doyle E. L., Schmidt C., Zhang F., Hummel A., Bogdanove A. J., Voytas, D.F. (2010): Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics* **186**, 757-761.
- Ishino Y., Shinagawa H., Makino K., Amemura M., Nakata A. (1987): Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of Bacteriology* **169**(12), 5429-5433.
- Iwanowski D. (1892): Über die Mosaikkrankheit der Tabakspflanze. *Bulletin Scientifique Publié Par l'Académie Impériale des Sciences de Saint-Petersbourg* **35**, 67-70.
- Jackson A., Hunter B., Gustafson G. (1989): Hordeivirus relationships and genome organization. *Annual Review of Phytopathology* **27**, 95-121.
- Jackson A.O., Lim H.S., Bragg J., Ganesan U., Lee M.Y. (2009): Hordeivirus replication, movement, and pathogenesis. *Annual Review of Phytopathology* **47**, 385-422.
- Jia H.G., Pang Y.Q., Fang R.X. (2003): Agroinoculation as a simple way to deliver a tobacco mosaic virus-based expression vector. *Acta Botanica Sinica* **45**, 770-773.
- Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M. (2012): A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* **337**, 816-821.
- Kaepler H., Somers D.A., Rines H.W., Cockburn A.F. (1990): Silicon carbide fiber-mediated DNA delivery into plant cells. *Plant Cell Reports* **9**, 415-418.
- Kellogg E. A. (2001): Evolutionary history of the grasses. *Plant Physiology* **125**, 1198-1205.
- Kim H., Kim J. (2014): A guide to genome engineering with programmable nucleases. *Nature Reviews Genetics* **15**, 321-334.

- Koonin E.V., Dolja V.V. (1993): Evolution and taxonomy of positive-strand RNA viruses: implications of comparative analysis of amino acid sequences. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **28**(5), 375-430.
- Lai K.S., Abdullah P., Yusoff K., Mahmood M. (2011): An efficient protocol for particle bombardment-mediated transformation of *Centella asiatica* callus. *Acta Physiologiae Plantarum* **33**(6), 2547-2552.
- Lai K.S., Yusoff K., Mahmood M. (2012): Heterologous expression of hemagglutinin-neuraminidase protein from Newcastle disease virus strain AF2240 in *Centella asiatica*. *Acta Biologica Cracoviensia/Series Botanica* **54**(1), 142-147.
- Lee W.S., Hammond-Kosack K.E., 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.
- Li T., Huang S., Jiang W. Z., Wright D., Spalding M. H., Weeks D.P., Yang B. (2011): TAL nucleases (TALNs): hybrid proteins composed of TAL effectors and FokI DNA cleavage domain. *Nucleic Acids Research* **39**, 359-372.
- Li J.R., Ye X.G., An B.Y., Du L.P., Xu H.J. (2012): Genetic transformation of wheat: current status and future prospects. *Plant Biotechnology* **6**, 183-193.
- Li T., Liu B., Spalding M.H., Weeks D.P., Yang B. (2012): High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice. *Nature Biotechnology* **30**(5), 390-392.
- Liang J., Chen X., Zhao H., Yu S., Long H., Deng G., Pan Z., Yu M. (2015): The impacts of BSMV on vegetative growth and water status in hulless barley (*Hordeum vulgare* var. nudum) in VIGS study. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* **84**, 43-51.
- Lieber M. R. (2010): The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annual Review of Biochemistry* **79**, 181-211.
- Low L.Y., Yang S.K., Kok D.X.A., Ong-Abdullah J., Tan N.P., Lai K.S. (2018): Transgenic plants: gene constructs, vector and transformation method. *New visions in plant science*, 43-62.
- Lu R., Martin-Hernandez A.M., Peart J.R., Malcuit I., Baulcombe D.C. (2003): Virus-induced gene silencing in plants. *Methods* **30**, 296-303.
- Luo M.C., Yang Z.L., You F.M., Kawahara T., Waines J.G., Dvorak J. (2007): The structure of wild and domesticated emmer wheat population, gene flow between them, and the site of emmer domestication. *Theoretical and Applied Genetics* **114**(6), 947-959.
- Mahas A., Ali Z., Tashkandi M., Mahfouz M. M. (2019): Virus-Mediated Genome Editing in Plants Using the CRISPR/Cas9 System. *Plant Genome Editing with CRISPR Systems*, 311-326.
- Mahfouz M. M., Li L., Shamimuzzaman M., Wibowo A., Fang X., Zhu J.K. (2011): De novo-engineered transcription activator-like effector (TALE) hybrid nuclease with novel DNA binding specificity creates double-strand breaks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 2623-2628.
- Makarova K.S., Wolf Y.I., Alkhnbashi O.S., Costa F., Shah S.A., Saunders S.J., Barrangou R., Brouns S.J.J., Charpentier E., Haft D.H., Horvath P., Moineau S., Mojica F.J.M., Terns R.M., Terns M.P., White M.F., Yakunin A.F., Garrett R.A., van der Oost J., Backofen R., Koonin E.V. (2015): An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nature Reviews Microbiology* **13**, 722-736.
- Martinez-Perez E., Shaw P., Moore G. (2001): The Ph1 locus is needed to ensure specific somatic and meiotic centromere association. *Nature* **411**, 2024-2307.
- Mayer A. (1886): Über die Mosaikkrankheit des Tabaks. *Die Landwirtschaftliche Versuchstationen* **32**, 451-467.
- Miller J., Mclachlan A., Klug A. (1985). Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIa from *Xenopus Oocytes*. *The EMBO Journal* **4**, 1609-1614.
- Miller J.C., Holmes M.C., Wang J., Guschin D.Y., Lee Y.-L., Rupniewski I., Beausejour C.M., Waite A.J., Wang N.S., Kim K.A., Gregory P.D., Pabo C.O., Rebar, E.J. (2007): An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing. *Nature Biotechnology* **25**, 778-785.

- Miller J.C., Tan S., Qiao G., Barlow K.A., Wang J., Xia D.F., Meng X., Paschon D.E., Leung E., Hinkley S.J., Dulay G.P., Hua K.L., Ankoudinova I., Cost G.J., Urnov F.D., Zhang H.S., Holmes M.C., Zhang L., Gregory P.D., Rebar E.J. (2011): A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nature Biotechnology* **29**, 143-148.
- Mojica F., Garcia-Martinez J., Soria E. (2005): Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of Molecular Evolution* **60**, 174-182.
- Moore G., Devos K. M., Wang Z., Gale M. D. (1995): Cereal genome evolution. Grasses, line up and form a circle. *Current biology* **5**(7), 737-739.
- Moynahan M. E., Jasin, M. (2010): Mitotic homologous recombination maintains genomic stability and suppresses tumorigenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **11**, 196-207.
- Napoli C., Lemieux C., Jorgensen R. (1990): Introduction of achimeric chalcone synthase gene into petunia results irreversible co-suppression of homologous genes in trans. *The Plant Cell* **2**(4), 279-89.
- Nekrasov V., Wang C., Win J., Lanz C., Weigel D., Kamoun S. (2017): Rapid generation of a transgene free powdery mildew resistant tomato by genome deletion. *Science Reports* **7**, 48.
- Pavletich N.P., Pabo C.O. (1991): Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å. *Science* **252**, 809-817.
- Potrykus I. (1991): Gene transfer to plants: Assessment of published approaches and results. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **42**(1), 205-225.
- Pourcel C., Salvignol G., Vergnaud G. (2005): CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology* **51**, 653-663.
- Puchta H., Dujon B., Hohn B. (1993): Homologous recombination in plant cells is enhanced by *in vivo* induction of double strand breaks into DNA by a site-specific endonuclease. *Nucleic Acids Research* **21**(22), 5034-5040.
- Puchta H., Dujon B., Hohn B. (1996): Two different but related mechanisms are used in plants for the repair of genomic double-strand breaks by homologous recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 5055-5060.
- Puchta H., Fauser F. (2014): Synthetic nucleases for genome engineering in plants: prospects for a bright future. *The Plant Journal* **78**, 727-741.
- Rakoczy-Tojanovska M. (2002): Alternative methods of plant transformation – a short review. *Cellular & molecular biology letters* **7**, 849-858.
- San Filippo J., Sung P., Klein H. (2008): Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annual Review of Biochemistry* **77**, 229-257.
- Sanford J.C. (1990): Biolistic plant transformation. *Physiologia Plantarum* **79**(1), 206-209.
- Scholthof H.B., Scholthof K.B., Jackson A.O. (1996): Plant Virus Gene Vectors for Transient Expression of Foreign Proteins in Plants. *Annual Review of Phytopathology* **34**, 299-323.
- Schornack S., Meyer A., Romer P., Jordan T., Lahaye T. (2006): Gene-for-gene-mediated recognition of nuclear-targeted AvrBs3-like bacterial effector proteins. *Journal of Plant Physiology* **163**, 256-272.
- Song G., Jia M., Chen K., Kong K., Khattak B., Xie C., Li A., Mao L. (2016): CRISPR/Cas9: A powerful tool for crop genome editing. *The Crop Journal* **4**, 75-82.
- Vasil V., Castillo A.M., Fromm M.E., Vasil I.K. (1992): Herbicide resistant fertile transgenic wheat plants obtained by microprojectile bombardment of regenerable embryogenic callus. *Bio/Technology* **10**, 667-674.
- Voytas D. F. (2013): Plant genome engineering with sequence-specific nucleases. *Annual Review of Plant Biology* **64**, 327–350.
- Wang Y., Cheng X., Shan Q., Zhang Y., Liu J., Gao C., Qiu J.L. (2014): Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nature Biotechnology* **32**(9), 947-951.
- Watabe H., Iino T., Kaneko T., Shibata T., Ando T. (1983): A new class of site-specific endodeoxyribonucleases. Endo.Sce I isolated from a eukaryote, *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry* **258**, 4663-4665.

- 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**.
- Zamore P. D., Tuschl T., Sharp P. A., Bartel, D. P. (2000): RNAi. *Cell* **101**(1), 25-33.
- Zhang Y., Liang Z., Zong Y., Wang Y., Liu J., Chen K., Qiu J.L., Gao C. (2016): Efficient and transgene-free genome editing in wheat through transient expression of CRISPR/Cas9 DNA or RNA. *Nature Communications* **7**.

8 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AMV	Virus mozaiky vojtěšky
bp	páry bází
BSMV	<i>Barley stripe mosaic virus</i>
CaMV	Virus kvěťákové mozaiky
CP	obalový protein
CRISPR	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats
crRNA	crispr RNA
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxyribonukleotid trifosfát
DSB	dvouřetězcové zlomy
dsRNA	dvouřetězcová RNA
EDTA	kyselina ethylendiaminotetraoctová
HDR	homologní rekombinace
HSP90	heat shock protein 90
CHS	chalkon synthasa
INDEL	inzerce/delece
IWGSC	Mezinárodní konsorcium pro sekvenování genomu pšenice
kb	kilobáze
MAS	markerem zprostředkovaná selekce
MCS	multiklonovací místo
mRNA	messengerová RNA
NHEJ	nehomologní spojení konců
OD	optická hustota
OECD	Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj
PAM	protospacer-sousedící motiv
PCR	polymerasová řetězová reakce
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	ribonukleová kyselina
RNAi	RNA interference
RVD	repeat-variable diresidue
SDSA	hybridizace řetězců závislé na syntéze
sgRNA	single-guide RNA
siRNA	malá interferující RNA
SSA	jednořetězcová hybridizace
ssRNA	jednořetězcová RNA
TALEN	Transcription activator-like nukleasa
T-DNA	transferová DNA
TGB	triple gene block protein
TMV	Virus tabákové mozaiky
tracrRNA	transaktivační RNA
U	jednotka enzymové aktivity
UV	ultrafialové záření
VIGS	virem indukované umlčení genu
VOX	virem zprostředkovaná nadexprese
ZFN	Zinc finger nucleasa