



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů

**Transformace pšenice a ječmene od patogenu odvozenou
rezistencí vůči WDV**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Markéta Trajerová
Studijní program:	N1501 Biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie rostlin
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Ing. Ludmila Ohnoutková, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2019

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne

.....

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucí práce Ing. Ludmile Ohnoutkové, Ph.D. za odborné vedení a cenné rady a Mgr. Tomáši Vlčkovi za trpělivost. Dále bych chtěla poděkovat prof. Zofii Szweykowske-Kulińské a Dr. Andrzejowi Pacakovi za vedení a pomoc při práci na experimentech v rámci programu ERASMUS⁺ pracovní stáže a v neposlední řadě děkuji spolupracovnicím Bc. Baše Macúchové a Bc. Baše Klčové za podporu při práci v laboratoři i mimo ni.

Bibliografická Identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Markéta Trajerová
Název práce	Transformace pšenice a ječmene od patogenu odvozenou rezistencí vůči WDV.
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum, Oddělení chemické biologie a genetiky.
Vedoucí práce	Ing. Ludmila Ohnoutková, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2019
Abstrakt	<p>Virové choroby rostlin způsobují vážné ztráty výnosu zemědělských plodin. Konvenční šlechtění je pro vývoj rezistence obvykle dostačující, nicméně jedná se o dlouhodobý, drahý proces, který může být jednoduše překonán jinou variantou viru. Jednou z metod genového inženýrství jejíž cílem je zvýšení tolerance k patogenu je od patogenu odvozená rezistence. Jejím principem je vložení genu nebo části sekvence patogenu do genomu rostliny. Jeho expresí dochází k blokadě specifického stupně životního cyklu viru. V rámci této diplomové práce byly připraveny transgenní rostliny jarní pšenice a jarního ječmene nesoucí upravený gen replikačního proteinu viru zakrslosti pšenice (WDV). Přítomnost transgenu byla ověřena metodou PCR v T₀ a T₁ generaci. U vybraných rostlin transgenní pšenice byla analyzována relativní exprese transgenu. V rámci ERASMUS⁺ pracovní stáže byla analyzována přítomnost siRNA odvozených od WDV replikačního proteinu v rostlinách jarního ječmene a byly připraveny sRNA knihovny pro analýzu exprese malých RNA podmíněné reakcí ke stresu ze sucha u rostlin jarního ječmene a transgenní linie jarního ječmene nesoucí transgen <i>osm</i>.</p>
Klíčová slova	transformace, pšenice, ječmen, od patogenu odvozená rezistence, virus zakrslosti pšenice, WDV, siRNA, sRNA
Počet stran	80
Počet příloh	2
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Bc. Markéta Trajerová
Title	Transformation of wheat and barley for WDV pathogen-derived resistance.
Type of thesis	Master
Department	Centre of region Hana for biotechnological and agricultural research, Department of chemical biology and genetics.
Supervisor	Ing. Ludmila Ohnoutková, Ph.D.
The year of presentation	2019
Abstract	<p>Viral diseases can cause severe yield losses of crops. Conventional breeding is usually sufficient for development of resistance against pathogen, but is also protracted, expensive and can be overcome by different variation of virus. One of the methods of genetic engineering of pathogen resistance is called pathogen-derived resistance (PDR). Plants are transformed by viral genes or sequences and its expression blocks specific step of virus life cycle. In this thesis transgenic spring wheat and spring barley were prepared. These plants carry a modified gene of replication protein of wheat dwarf virus (WDV). The presence of transgene was verified in T₀ and T₁ generation by PCR. Expression of transgene was analysed in selected plants. Within the ERASMUS⁺ traineeship program was analysed presence of siRNA derived from spring barley carrying gene encoding WDV replication protein and sRNA libraries were prepared to analyse expression of small RNA in response to drought stress in spring barley and transgenic spring barley carrying <i>osm</i> transgene.</p>
Keywords	transformation, wheat, barley, pathogen-derived resistance, wheat dwarf virus, WDV, siRNA, sRNA
Number of pages	80
Number of appendices	2
Language	Czech

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK	1
CÍLE PRÁCE.....	4
1. ÚVOD.....	5
2. TEORETICKÝ ÚVOD.....	6
2.1 REZISTENCE ROSTLIN VŮČI PATOGENŮM.....	6
2.1.1 Přírozeně vyvolaná imunita.....	7
2.1.1.1 Efektorová imunita (ETI)	7
2.1.1.2 Chemické cesty indukce rezistence	8
2.1.2 Od patogenu odvozená rezistence (PDR).....	9
2.1.2.1 Od proteinu odvozená rezistence.....	10
2.1.2.2 Od RNA odvozená rezistence.....	12
2.1.3 CRISPR/Cas9.....	15
2.2 VIRUS ZAKRSLOSTI PŠENICE	17
2.2.1 Čeleď Geminiviridae.....	17
2.2.1.1 Replikace Geminivirů.....	18
2.2.1.2 Průběh nákazy Geminiviry	19
2.2.2 Struktura WDV	21
2.2.3 Příznaky a rozšíření nákazy WDV	22
2.2.4 Ochrana proti virovým chorobám	23
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	24
3.1 Materiál	24
3.1.1 Použité chemikálie	24
3.1.2 Použitá antibiotika.....	26
3.1.3 Použité standarty	26
3.1.4 Použité kity	26
3.1.5 Použité přístroje	27
3.1.6 Použité pufry	28
3.1.7 Rostlinný materiál	29
3.1.8 Vektory použité pro transformace	30
3.2 Metody	32
3.2.1 Transformace pšenice.....	32
3.2.1.1 Izolace genomické DNA pšenice	32
3.2.1.2 PCR analýza T ₀ a T ₁ generace.....	32
3.2.1.3 Izolace celkové RNA.....	33
3.2.1.4 Přečištění celkové RNA	33
3.2.1.5 Přepis celkové RNA do cDNA.....	33
3.2.1.6 Určení relativní exprese transgenů pomocí qRT-PCR	33
3.2.2 Ověření vektorů a transformace ječmene	35
3.2.2.1 Izolace plazmidové DNA	35
3.2.2.2 Transformace elektrokompetentních buněk <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	35
3.2.2.3 Restrikční analýza	36
3.2.2.4 Transformace ječmene.....	36
3.2.2.5 Izolace genomické DNA z ječmene	36

3.2.2.6 PCR analýza T ₀ generace	36
3.2.3 Detekce siRNA odvozených od transgenu	37
3.2.3.1 Izolace genomické DNA ječmene	37
3.2.3.2 Izolace celkové RNA	37
3.2.3.3 PCR analýza k potvrzení přítomnosti transgenu a jeho exprese	37
3.2.3.4 Izolace celkové RNA obohacené o sRNA frakci	38
3.2.3.5 Odsolení celkové RNA obohacené o sRNA frakci	38
3.2.3.6 Kontrola kvality celkové RNA obohacené o sRNA frakci	39
3.2.3.7 Příprava radioaktivně značených prób	39
3.2.3.8 Northern Blot	39
3.2.4 Příprava sRNA knihoven	40
3.2.4.1 Izolace genomické DNA ječmene	40
3.2.4.2 Izolace celkové RNA	40
3.2.4.3 PCR analýza k potvrzení přítomnosti transgenu a jeho exprese	41
3.2.4.4 Izolace celkové RNA obohacené o sRNA frakci	41
3.2.4.5 Odsolení celkové RNA obohacené o sRNA frakci	41
3.2.4.6 Kontrola kvality celkové RNA obohacené o sRNA frakci	41
3.2.4.7 Izolace sRNA	41
3.2.4.8 Eluce a přečištění sRNA z gelu	42
3.2.4.9 Příprava sRNA knihoven	43
3.2.4.10 Kontrola kvality a kvantity knihoven	44
4. VÝSLEDKY	45
4.1 Transformace pšenice a určení relativní exprese	45
4.1.1 Potvrzení přítomnosti transgenu v T ₀ generaci	45
4.1.2 Potvrzení přítomnosti transgenu v T ₁ generaci	46
4.1.3 Určení relativní exprese transgenu	48
4.2 Ověření vektorů a transformace ječmene	53
4.2.1 Ověření sekvence vektorů	53
4.2.2 Potvrzení přítomnosti transgenu v T ₀ generaci	55
4.3 Detekce siRNA odvozených od WDV transgenu	57
4.3.1 Potvrzení přítomnosti transgenu na úrovni DNA	57
4.3.2 Potvrzení přítomnosti transgenu na úrovni RNA	58
4.3.3 Kontrola kvality celkové RNA obohacené o sRNA frakci	59
4.3.4 Northern Blot	60
4.4 Příprava sRNA knihoven	61
4.4.1 Potvrzení přítomnosti transgenu na úrovni DNA	61
4.4.2 Potvrzení přítomnosti transgenu na úrovni RNA	62
4.4.3 Kontrola kvality celkové RNA obohacené o sRNA frakci	63
4.4.4 Příprava sRNA knihoven	64
4.4.5 Kontrola kvality sRNA knihoven	65
5. DISKUZE	66
6. ZÁVĚR	70
7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	71
PŘÍLOHY	79

SEZNAM ZKRATEK

<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
AOX (Alternative Oxidase)	alternativní oxidasy
Apaf-1 (Apoptotic protease-activating factor 1)	aktivační faktor pro apoptickou proteasu 1
BSCTV (Beet Severe Curly Top Virus)	
BYDV (Barley Yellow Dwarf Virus)	virus žluté zakrslosti ječmene
Cas9 (CRISPR Associated System 9)	
CC (coiled coil)	svinutá doména
Ced4 (Cell death protein 4)	protein asociovaný s buněčnou smrtí 4
CP (coat protein)	obalový protein
CPMR (Coat Protein Mediated Resistance)	od obalového proteinu odvozená rezistence
CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat)	
crRNA (crispr RNA)	
CTV (Citrus Tristeza Virus)	
<i>DCL1-4</i>	gen pro enzym Dicer1-4
dsDNA (double strand DNA)	dvouvláknová DNA
dsRNA (double strand RNA)	dvouvláknová RNA
<i>eiF4E</i> (Eucaryotic translation Initiation Factor 4E)	eukaryotický iniciační faktor translace 4E
ETI (Effector Triggered Immunity)	efektorová imunita
gen <i>avr</i>	gen avirulence
gen R	gen rezistence
GRAB (Geminivirus RepA-Binding transcription factors)	doména pro vazbu transkripčních faktorů
GRS	společný motiv pro <i>Geminiviry</i>
HDR	homologní rekombinace
hpRNA (hairpin RNA)	vlásečková RNA
<i>hpt</i>	hygromycin fosfotransferasa
IR (Intergenic Region)	mezigenová oblast
ISR (Induced Systemic Resistance)	indukovaná systémová

LZ (leucine zipper)	rezistence
MP (movement protein)	leucinový zip
mRNA (messenger RNA)	pohybový protein
<i>N. benthamiana</i>	mediátorová RNA
NB-LRR (nucleotide binding site-leucine rich repeat)	<i>Nicotiana benthamiana</i>
NHEJ	pro nukleotidy vazné místo- doména bohatá na leucin
ORFs (Open Reading Frames)	nehomologní rekombinace
<i>osm</i>	čtecí rámce pro transkripci
PAM (Protospacer Adjacent Motif)	Osmotin
PDR (Pathogen-derived resistance)	místo obsahující NGG nebo NAG sekvenci
PEG	od patogenu odvozená rezistence
PLRV (Potato Leaf Roll Virus)	polyethylenglykol
PR proteiny (Pathogen Related)	vir svinutky bramboru
PRSV (Papaya Ringspot Virus)	
PTGS (Post transcription gene silencing)	post-transkripční genové umlčení
PVY (potato virus Y)	Y vir bramboru
qPCR	kvantitativní PCR
RBR (Retinoblastoma protein)	retinoblastomový protein
RdRp (RNA dependent RNA polymerase)	RNA dependentní RNA polymeráza
REn (Replication enhancer)	zesilovač replikace
Rep A (Replication protein A)	replikační protein A
Rep protein (Replication protein)	replikační protein
RFC (Replication Factor C)	replikační faktor C
RNA (ribnucleic acid)	ribonukleová kyselina
RNAi (RNA interference)	RNA interference
ROS (Reactive Oxygen Radicals)	reaktivní kyslíkové radikály
RPA32 (Replication protein 32)	replikační protein 32
SA (Salycic Acid)	kyselina salicylová

SAR (Systemic Acquired Resistance)	systemově získaná rezistence
sgRNA (single guide RNA)	navádějící RNA
SIR (Short Intergenic Region)	krátká mezigenová oblast
siRNAs (short interfering RNAs)	krátké interferující RNA
SnRK1 (Sucrose Non-fermenting 1-Related Kinase)	
ssDNA (single strand DNA)	jednovláknová DNA
ssRNA (single strand RNA)	jednovláknová RNA
stRNA (small temporal RNA)	malé dočasné RNA
$T_{0/1/2}$	transgenní generace 0/1/2
TEV (Tobacco Etch Virus)	
TGMV (Tomato Golden Mosaic Virus)	
TGS (Transcriptional Gene Silencing)	umlčení transkripce
TIR doména (Toll/II-1)	doména homologní k doméně Toll proteinu
TMV (Tobacco Mosaic Virus)	virus tabákové mozaiky
TRA (promoter TRAnsactivation domain)	promotorová transaktivační doména
TYLCSV (Tomato Yellow Leaf Curl Sardinia Virus)	virus žluté kadeřavosti listů rajčete (Sardinia)
TYLCV (Tomato Yellow Leaf Curl Virus)	virus žluté kadeřavosti listů rajčete
WDV (Wheat Dwarf Virus)	virus zakrslosti pšenice
WSMV (Wheat Strike Mosaic Virus)	virus čárkovité mozaiky pšenice
ZFN (Zinc Finger Nuclease)	nukleasy se zinkovými prsty

CÍLE PRÁCE

TEORETICKÁ ČÁST:

- ❖ Zpracování literární rešerše:
 - Možnosti rezistence rostlin vůči patogenům
 - WDV

PRAKTICKÁ ČÁST:

- ❖ Transformace pšenice replikačním proteinem K5 a J1.
 - U T₀ generace stanovení přítomnosti transgenu na úrovni DNA.
 - U T₁ generace stanovení exprese transgenu.
- ❖ Transformace ječmene jarního replikačním proteinem AC4 a O2.
 - U T₀ generace stanovení přítomnosti transgenu na úrovni DNA.
- ❖ Detekce siRNA u generace T₃DH₂ ječmene jarního nesoucí J1 transgen.
 - Kultivace rostlin a ověření přítomnosti transgenu na úrovni DNA a RNA.
 - Izolace celkové RNA obohacené o sRNA frakci.
 - Příprava hybridizačních prób a Northern blotting.
- ❖ Příprava sRNA knihoven u T₂DH₁ generace ječmene jarního nesoucí *osm* transgen.
 - Kultivace rostlin a ověření přítomnosti transgenu na úrovni DNA a RNA.
 - Izolace celkové RNA obohacené o sRNA frakci.
 - Izolace sRNA frakce a příprava sRNA knihoven.
 - Kontrola kvality a kvantity knihoven.

1. ÚVOD

Pšenice patří mezi nejstarší kulturní rostliny, je základní potravinářskou surovinou a slouží jako krmivo nebo surovina pro výrobu škrobu a lihu. Kvůli její důležitosti je potřeba přizpůsobovat vlastnosti pšenice proměnlivým vnějším podmínkám klasickým šlechtěním nebo genovou manipulací. Jedním z patogenů, které mohou pšenici napadat je virus zakrslosti pšenice (WDV). WDV je rostlinný ssDNA virus s kruhovým genomem patřící do čeledi *Geminiviridae* a rodu *Mastrevirus*. Virus je schopen napadat ječmen i pšenici. Mezi hlavní symptomy nákazy patří zakrnělý vzrůst rostlin a žluté listy s nepravidelnými skvrnami. Nákaza může vyústit až v úhyn rostliny. Jedná se o hospodářsky závažnou nemoc obilnin napadající především ozimé varianty pšenice a ječmene.

Existuje několik způsobů obrany proti virům zahrnující genové inženýrství, například od patogenu odvozená rezistence (PDR). Principem PDR je zvýšení tolerance rostliny k patogenu expresí jeho genu nebo části sekvence v rostlině. PDR se dělí na rezistenci odvozenou od proteinu a rezistenci odvozenou od RNA. Od proteinu odvozená rezistence spoléhá na interferenci virálního proteinu exprimovaného z rostliny. Rezistence může být vyvolaná obalovým proteinem (CP), pohybovým proteinem (MP), RNA dependentní RNA polymerázou (RdRp) nebo replikačním proteinem (Rep/RepA) u virů, které nekódují RdRp. Od RNA odvozená rezistence využívá tzv. RNA interference. Exprese hpRNA komplementární k transgenu je štěpena enzymem Dicer a krátké RNA jsou inkorporovány do RISC komplexu, který katalyzuje degradaci komplementární RNA.

V rámci této diplomové práce byly rostliny jarní pšenice cv. Fielder a jarního ječmene cv. Golden Promise transformovány genem replikačního proteinu viru zakrslosti pšenice upraveným k vyvolání od patogenu odvozené rezistence.

2. TEORETICKÝ ÚVOD

2.1 REZISTENCE ROSTLIN VŮČI PATOGENŮM

Pšenice a další obilniny (například kukuřice nebo ječmen) patří do čeledi lipnicovité, třídy jednoděložných rostlin. Primárním genovým centrem pšenice je Středozeří (Mediterranean; Vavilov, 1926) a její původ je spojen se třemi druhy rostlin, které stále rostou v původním genovém centru. Převážná část dnes pěstované pšenice je hexaploidní *Triticum aestivum* (AABBDD), která vznikla pravděpodobně před 8 000 lety zkřížením tetraploidní pšenice *Triticum turgidum* var. *durum* (AABB; vzniklé domestikací divoké *Triticum dicoccum*) s diploidní trávou *Aegilops tauschii* (DD). Vznik tetraploidní *Triticum dicoccum* je spojován se zkřížením diploidní pšenice *Triticum monococcum* (AA) a diploidní trávy *Aegilops speltoides* (BB). Dnešní pěstovaná pšenice je allopolyploid, nesoucí tři originální samostatné haploidní genomy A, B a D. (Gill a Gill, 1994; Patnaik a Khurana, 2001)

Nejnovější sekvenace pšeničného genomu (*Triticum aestivum* cv. Chinese spring) určila přítomnost 107 891 genů a jejich regulačních oblastí na 21 chromozomech. Velikost genomu byla stanovena mezi 15,4 a 15,8 Gb a množství repetitivní DNA bylo stanoveno na 85 % (IWGSC, 2018).

První transformace pšenice byla provedena v roce 1985. Pomocí PEG (polyethylenglykol, Lörz *et al.*, 1985) byly transformovány protoplasty, které byly později transformovány pomocí elektroporace (He *et al.*, 1994). Transformace protoplastů je však obtížná z důvodu komplikované regenerace rostlin. Další použitou transformační technikou se stala dodnes používaná biolistika, fungující na principu nástřelu mikroprojektilů obalených zájmovou DNA do buněk. Biolistická metoda byla úspěšně použita k transformaci pšenice v roce 1992. Vektorem pBARGUS byly transformovány buňky typu C embryonálního kalusu odvozené ze somatických embryí tak, aby z nich mohly regenerovat nové rostliny (Vasil *et al.*, 1992). Nevýhodou této metody je častá mnohonásobná inserce transgenů. Druhá používaná metoda transformace pšenice využívá půdní bakterii *Agrobacterium tumefaciens*. Několik let byly jednoděložné rostliny označovány jako nevhodní hostitelé *Agrobacterium*, protože *in vitro* ani *in vivo* nedocházelo k jejich infekci (Hoisington *et al.*, 2012). V roce 1988 byla připravena první transgenní pšenice přímou injekcí inokula *Agrobacteria* na bazální část 1 až 4 dny starých semenáčků (Woolston *et al.*, 1988). V roce 1991 byla oznámena první *in vitro* transformovaná buňka nezralého pšeničného embrya (Mooney *et al.*, 1991). Transformace *Agrobacteriem* ale nebyla považována za praktickou až do roku 1997, kdy byla potvrzena stabilní transformace

s mendelovskou dědičností do T₁ generace (Cheng *et al.*, 1997). Výhodou této transformace je stabilnější inkorporace menšího množství kopií transgenů (Patnaik and Khurana, 2001). Jako marker ke studiu transformace pšenice byl využit virus zakrslosti pšenice (WDV, Wheat Dwarf Virus). Amplifikace virální DNA vedla nejen k výrazným symptomům, ale i jednoduché detekci ELISA testem (Woolston *et al.*, 1988; Dale *et al.*, 1989).

V současné době se pro transformaci pšenice využívají dva typy pšeničných explantátů: nezralá květenství a nezralá zygotická embrya, která jsou transformována buď biolisticky nebo s pomocí *A. tumefaciens* (Gaponenko *et al.*, 2018). Mezi odrůdy pšenice, které se nejčastěji využívají k transformaci ve formě nezralých embryí patří Bobwhite, cv. Fielder a cv. Veery 5. Alternativně se využívají i kalusy nezralých embryí kultivarů jarní pšenice Florida a Cadenza (Jones *et al.*, 2005).

2.1.1 Přirozeně vyvolaná imunita

Rostlinné viry mají velmi negativní dopad na zemědělské plodiny, proto se pro boj s nimi v posledním století věnovalo nemalé úsilí. Standartní techniky rostlinné patologie jako je karanténa, eradikace (odstranění napadených rostlin) nebo střídání plodin jsou stále velmi důležitými nástroji ke kontrole virových onemocnění, nicméně nevýhody jako cena, pochybná účinnost nebo nespolehlivost během let dávají prostor moderním metodám genetické manipulace (Scholthof *et al.*, 1993), které doplňují přirozené mechanismy rostlinné obrany.

2.1.1.1 Efektorová imunita (ETI)

Kromě pasivní obrany proti patogenům, například rigidní buněčné stěny, si rostliny vyvinuly také aktivní obranu. Nejčastějším mechanismem spojovaným s aktivní obranou je ETI (Effector Triggered Immunity; efektorová imunita). Obrana rostliny spočívá v hypersenzitivní reakci, programované buněčné smrti buněk v okolí místa primární infekce, což se na rostlině projeví jako nekrotické léze (Goldbach *et al.*, 2003). Spuštění tohoto obranného systému je závislé na přítomnosti produktu dominantního genu rezistence v rostlině (genu R) a virovému genu avirulence (genu *avr*). Pokud je korespondující gen R přítomen na rostlině a současně komplementární *avr* gen ve viru, výsledkem je rezistence (Dangl and Jones, 2001). Geny *avr* u rostlinných virů obvykle kódují obalové proteiny, replikasy, nebo pohybové proteiny. Strukturální integrita *avr* proteinů je důležitá pro percepci R proteiny (Bonas and Lahaye, 2002). Jednoduchý model působení předpokládá rozpoznání signální dráhy, které se účastní *avr*, pomocí produktu genu R, který následně spouští signální kaskádu obraných reakcí. Všechny zatím sekvenované R geny kódují

proteiny, které se dají rozdělit do pěti tříd. Nejzastoupenější skupinou R proteinů jsou ty, obsahující vazné místo pro nukleotidy a sekvence bohaté na leucin (NB-LRR; Nucleotide Binding site – Leucine Rich Repeat). Tyto proteiny fungují výhradně jako R proteiny a jsou vysoce vyvinuté pro tuto funkci. LRR domény se vyskytují na C-terminálním konci v různém počtu a podílejí se na protein-proteinových interakcích, peptid-ligand vazbách a protein-uhlovodíkových interakcích. NB místo je součástí větší domény, která je homologní s některými eukaryotickými efektoři buněčné smrti, jako je například Apaf-1 (Apoptotic Protease-Activating Factor 1) nebo Ced4 (CELL Death protein 4). Tato skupina proteinů je dále rozdělena podle složení N-terminální domény. Na N-terminálním konci může být „coiled coil“ doména (CC-NB-LRR), leucinový zip (leucine zipper; LZ-NB-LRR), nebo TIR doména (TIR-NB-LRR) homologní k doménám proteinů zapojujících se v signálních drahách (Dangl and Jones, 2001). R geny se mohou vyskytovat jako součást klastru homologních genů nebo samostatně, v závislosti na druhu rostliny. Distribuce NB-LRR genů v genomu byla vysvětlována tandemovou genovou duplikací a duplikací jednotlivých genů nebo malých skupin genů do různých lokusů. Na distribuci R genů má vliv i rekombinace a homogenizace (Leister, 2004). V genomu *Arabidopsis thaliana* bylo zjištěno 149 NB-LRR genů z nichž 58 mělo zkrácenou sekvenci. Z těchto 149 genů bylo 40 detekováno samostatně a zbytek byl identifikován ve 43 klastrech (Meyers *et al.*, 2002).

2.1.1.2 Chemické cesty indukce rezistence

K indukci rezistence vůči virům a jiným patogenům existují i chemické cesty. ISR (Induced Systemic Resistance; indukovaná systémová rezistence) a SAR (Systemic Acquired Resistance; systémově získaná rezistence). ISR je vyvolána mnoha druhy rostlinných rhizobakterií. SAR je indukovaná primární infekcí především patogeny vyvolávající hypersenzitivní reakci. Za určitých podmínek je ale možné vyvolat SAR uměle, například benzothiadiazolem. V *Arabidopsis* přirozeně vyvolaná SAR zahrnuje expresi genů, z nichž některé jsou funkčně spojené se systémem obrany závislým na kyselině salicylové a PR (Pathogen Related) proteinech. Jak ISR, tak SAR jsou zodpovědné za dlouhodobé rezistence proti různým patogenům, mezi něž se řadí i viry. Funkce ISR, na rozdíl od SAR, proti virům ale nebyla ještě plně zmapována (Faoro a Gozzo, 2015).

Kyselina salicylová (SA; salicylic acid) je rostlinný hormon regulující kromě růstu a vývoje i obranu vůči biotickým a abiotickým stresům. Sama nespouští imunitní reakci, ale spolupracuje s mnoha dalšími fytohormony. Syntéza SA se mimo jiné spouští po aktivaci

PTI (Pattern Triggered Immunity) a ETI obranných reakcích - ve vrchních částech rostliny se začnou akumulovat PR proteiny, SA a dochází ke spuštění SAR (Klessig *et al.*, 2018).

SA aktivuje obranu proti virům: Stimuluje transkripci RNA dependentní RNA polymerázy 1, která reguluje RNA umlčení a inhibuje transport elektronů při buněčném dýchání, pravděpodobně skrz ROS (Reactive Oxygen Radicals, reaktivní kyslíkové radikály) interakcí salicylátu s peroxidásami. Tyto sloučeniny jsou monitorovány sensorovými proteiny, které se spolu s oxidem dusnatým podílí na tvorbě signálu směřujícímu k jádru. V jádře dochází k transkripci obranných genů a genů alternativních oxidas (AOX, Alternative OXidase). AOX negativně ovlivňují tvorbu ROS. Dochází k inhibici syntézy a/nebo pohybu viru (Sing *et al.*, 2004).

2.1.2 Od patogenu odvozená rezistence (PDR)

Potenciál využití patogenu pro zvýšení rezistence plodin proti virům byl poprvé demonstrován, když H.H. McKinney v roce 1929 připravil tabák odolný proti silnému kmenu TMV (Tobacco Mosaic Virus, vir tabákové mozaiky) pomocí předchozí infekce mírným kmenem TMV. Tento typ odolnosti byl později nazván „cross-protection“ a byl úspěšně použit i u jiných rostlin, například rajčat, papáji nebo citrusů. Nevýhodou této rezistence je využití infekčního viru jako kontrolního opatření. Dalším závažným problémem je virulence kmenů virů, která se liší jak mezi plodinami, tak mezi odrůdami jedné plodiny. Virus použitý k ochraně jedné plodiny by mohl způsobit infekci na jiných plodinách nebo odrůdách rostoucích poblíž. S rozvojem molekulární biologie byly vyvinuty nové teorie vhodné k testování. Koncept od patogenu odvozené rezistence využívající transgenních rostlin byl rozpracován v roce 1985, kdy Sanford a Johnston navrhli, že exprese určitých genů patogenu by mohla změnit rovnováhu virových složek v hostitelské rostlině a tím narušit životní cyklus viru. V neúspěšnějších případech by mohlo dojít až k omezení replikace a/nebo pohybu patogenu na infikovanou buňku. Výhodou této rezistence je, že i při méně efektivní interferenci s replikačním cyklem viru symptomy nákazy mohou být modulované a vyústit pouze v lokální infekci. (Scholthof *et al.*, 1993; Goldbach *et al.*, 2003)

Od patogenu odvozená rezistence může být dvojí: 1. odvozená od proteinu a 2. odvozená od RNA. Od RNA odvozená rezistence je často účinná vůči vysokým úrovním inokula, ale je velmi specifická. Od proteinu odvozená rezistence obecně vykazuje nižší účinnost ale vyšší spektrum rezistence (Lomonossoff, 1995).

2.1.2.1 Od proteinu odvozená rezistence

Původní transgenem indukovaná rezistence vůči viru byla vyvolána genem obalového proteinu (CP; Coat Protein) viru tabákové mozaiky. Transgenní rostliny infikované virem vykazovaly zpožděné a utlumené příznaky (Powell *et al.*, 1986). U TMV CP byla detekována i rezistence k příbuzným kmenům TMV a kmenům, jejichž CP má podobnou strukturu (Beachy, 1997). U CP genu PVY (Y vir bramboru) z kmene N605 byla detekována rezistence i proti kmenu 0803 (Malnoe *et al.*, 1994), ale například rostliny nesoucí CP viru PRSV (Papaya RingSpot Virus) byly rezistentní pouze vůči kmenu ze kterého byl CP odvozen (Tennant *et al.*, 1994).

Molekulární mechanismus CPMR (Coat Protein-Mediated Resistance; od obalového proteinu odvozená rezistence) není ještě plně pochopen, a navíc se liší podle druhu virů. U experimentů s TMV u tabáku bylo dokázáno, že rostliny exprimující vyšší množství TMV CP byly tolerantnější vůči virionu TMV oproti pouze RNA TMV. Proto bylo navrženo, že CPMR proti TMV funguje skrz inhibici rozložení virionu u primárně infikovaných buněk. Inokulum RNA bylo schopno obejít rezistenci, protože žádné rozkládání u nezapouzdřené RNA není třeba. Z poznatků o CPMR vyšlo několik konzistentních důkazů: **(1)** Rezistence je závislá na místě exprese CP. CPMR je závislá na expresi CP v primárně infikovaných buňkách epidermis. Pokud bylo CP exprimováno pouze v mezofylových buňkách listu rezistence ani tolerance nebyly přítomny. **(2)** Byl připraven test zapouzdření. Do pseudovirionů (částic podobným virionu TMV) byla zabalena mRNA β -glukoronidasy, která byla inokulována do protoplastů vykazujících CPMR a protoplastů netransgenních rostlin. Produkce GUS byla mnohem menší u protoplastů CPMR než u protoplastů bez CP transgenů. **(3)** Byl proveden další test zapouzdření. Byly připraveny mutantní a rekombinantní formy CP TMV, které se nechaly interagovat s nemutovaným CP TMV. Tato rezistence byla spojována s interakcí mezi těmito obalovými proteiny, která zapříčinila inhibici rozložení virionu. I po provedení těchto experimentů ale stále nebyla potvrzena inhibice pohybu pozdějších stádií po rostlině. **(4)** Byl proto testován vliv CPMR na vaskulární transport. Segment rostliny vykazující CPMR byl naroubován na TMV náchylnou netransgenní rostlinu. Pohyb TMV skrz naroubovaný segment byl inhibován (Baulcombe, 1996). Pozdější výzkum ukázal ovlivnění CPMR například i mutací v CP ovlivňující elektrostatické interakce mezi podjednotkami (Bandahmanne and Gronenborn, 1997) nebo stavem agregace CP (Asurmendi *et al.*, 2007). CPMR může být ovlivněna určitou konfigurací kvartérní struktury CP (Prins *et al.*, 2008).

Obalovým proteinem *p25* viru „citrus tristeza virus“ (CTV) byly transformovány rostliny mexické limetky (*Citrus aurantifolia* (Christ.) Swing). Část transgenních rostlin nesla *p25* CP z kmene T-305 a část nesla *p25* CP z mírnějšího kmene T-317. Po inokulaci virem byla na rostlinách pozorována škála symptomů. Některé rostliny vykazovaly fenotyp napadené kontroly, u některých došlo ke zpožděnému nástupu symptomů a část rostlin (10 – 33 %) byla bez symptomů. Rezistentní rostliny obsahovaly velké množství *p25* CP (Domínguez *et al.*, 2002). Mezi další příklady CPMR můžeme zařadit sóju rezistentní vůči „soybean mosaic virus“ (Wang *et al.*, 2001) nebo tabák rezistentní vůči Potyvirus (Lindbo and Dougherty, 1992).

Kromě obalového proteinu je možné použít i replikační protein viru (Rep protein). U virů, jejichž genom se skládá ze ssDNA není kódována polymeráza, ale jejich replikace je závislá na jejich vlastním replikačním proteinu a hostitelské polymeráze. Jako příklad může sloužit rezistence proti TYLCSV (Tomato Yellow Leaf Curl Sardinia Virus; virus žluté kadeřavosti listů rajčete). Rep protein silně inhiboval replikaci viru v protoplastech, a pokud byl exprimován ve větším množství, indukoval rezistenci. Protein zkrácený o N-terminální doménu se vázal na virální Rep protein se kterým tvořil dysfunkční komplexy (Prins *et al.*, 2008). Délka rezistence je závislá na schopnosti viru utiřit expresi transgenu. TYLCSV neovlivňoval expresi transgenu závislou na 35S promotoru, ale indukoval tvorbu specifických 21-25 nt dlouhých siRNAs (Lucioli *et al.*, 2003). Dalším příkladem je transgenní ječmen nesoucí upravený protein asociovaný s replikací viru zakrslosti pšenice (WDV RepA) a stejný upravený protein Rep A ale s mutací v interakční doméně RBR (RetinoBlastoma-Related protein). T₁ generace transgenních rostlin ječmene jarního byla vystavena dříve infikovanému přirozenému přenašeči WDV, křísu polnímu. Množství virové DNA bylo stanoveno TaqMan qPCR. Rostliny nesoucí transgen s mutací v interakční doméně vykazovaly symptomy odpovídající 2 týdennímu zpoždění infekce oproti rostlinám nesoucí pouze upravený RepA. Expresce transgenu byla podobná u obou typů rostlin (Cejnar *et al.*, 2018).

K vyvolání PDR může sloužit i pohybový protein (movement protein; MP). Ten, na rozdíl od CP, jako nemutovaný rozšiřuje infekci. Upravený protein je zodpovědný za zpožděný nástup symptomů nákazy a poskytuje rezistenci i vůči taxonomicky vzdálenějším virům. Transgenní tabáky nesoucí dMP TMV byly odolné i vůči „tabacco rattle virus“, „peanut chlorotic streak virus“ a „tabacco ringspot virus“ (Prins *et al.*, 2008).

U RNA virů, je možné připravit rezistentní rostliny i pomocí genu kódující RNA-dependentní RNA-polymerázu (RdRp, replikasa). Tabáky transformované modifikovanou

RdRp viru TMV vykazovaly inhibici replikace viru v místě inokulace. Rezistence byla specifická pouze pro použitý kmen ale docházelo k inhibici jak virionů, tak neobalené RNA TMV. Ačkoliv 54 kDa protein nebyl v místě infekce přímo detekován, protoplasty nesoucí plazmid exprimující protein vykazovaly sníženou replikaci viru (Carr *et al.*, 1992). Pro jinou virovou RdRp byla ale navržena koexistence proteinové i na RNA závislé rezistence, protože celá 54 kDa RdRp viru „pepper mild mottle virus“ se nezdála vhodnou pro vyvolání rezistence, přesto rostliny exprimující pouze 30% sekvence RdRp byly odolné (Prins *et al.*, 2008).

RdRp viru svinutky bramboru (PLRV, Potato LeafRoll Virus) byla transformována do rostlin brambor cv. Desirée. Byly připraveny dva konstrukty nesoucí celý PLRV rRdRp gen s promotory 35S a RolA (floémově specifický promotor z *Agrobacterium rhizogenes*). U linií rostlin nesoucí transgen pod promotorem 35S byly detekovány známky infekce, ty ale byly později potlačeny a 40 dní od infekce nebyl vir v rostlinách detekován. U rostlin s transgenem pod promotorem RolA se známky infekce projeví opožděně (Ehrenfeld *et al.*, 2004). Mezi další příklady se řadí i PDR vůči viru Y bramboru (Schubert *et al.*, 2004) nebo vinná réva rezistentní vůči „fanleaf virus“ (Barbier *et al.*, 1998).

2.1.2.2 Od RNA odvozená rezistence

Genové umlčování bylo poprvé popsáno v roce 1990 v rostlinách petúnie. Původně nevysvětlitelný fenomén byl pozorován u rostlin nesoucích transgen kódující enzym chalcon syntasu důležitý pro tvorbu fialového pigmentu. Místo navýšení pigmentu a sytě fialové barvy okvětních lístků byly rostliny naopak bílé (Napoli *et al.*, 1990). Po provedení dalších studií nebyla detekována exprese transgenů ani endogenního genu. Tento fenomén byl nazván kosuprese (Jorgensen, 1992; Palli, 2012) a jeho základní mechanismus zůstal neznámý dalších 8 let. Po srovnání účinků ssRNA a dsRNA u modelového organismu *Caenorhabditis elegans* došli Fire a Mello k závěru, že purifikované ssRNA ať už „sense“ nebo „antisense“ jsou při umlčování 10x až 100x méně účinné než dsRNA. Umlčování pomocí ssRNA je možné pouze, pokud je do organismu injektováno „sense“ i „antisense“ vlákno. Hybridizace dvou ssRNA tak mohla proběhnout *in vivo* (Fire *et al.* 1998; Sen a Blau, 2006). Andrew Z. Fire a Craig C. Mello dostali v roce 2006 za objev RNA interference Nobelovu cenu za Fyziologii a Medicínu (Tisková zpráva vydaná 2.10.2006).

Zatím jsou známy dva mechanismy umlčování transgenů a endogenních lokusů. Prvním je TGS (transcriptional gene silencing; umlčení transkripce), závislý na methylovaném lokusu, čímž dochází ke změně struktury chromatinu a geny nejsou přepisovány. Druhým mechanismem je post-transkripční genové umlčení (PTGS) pod který spadá RNA

interference (RNAi; dříve zvaná kosuprese), proces odehrávající se ve všech eukaryotických organismech (Hammond *et al.*, 2001).

Za objevení tohoto mechanismu v původně PDR transgenních rostlinách napadených virem může neodpovídající množství mRNA transgenů odvozeného od genu viru vztažené ke stupni rezistence. Dokonce právě některé rostliny s nízkou nebo nedetekovatelnou expresí proteinu vykazovaly nejvyšší stupeň tolerance. Tyto odchylky indikovaly zapojení RNA (Prins *et al.*, 2008). V roce 1993 byl připraven tabák rezistentní vůči „tobacco etch virus“ (TEV). Vloženým transgenem byl obalový protein viru zkrácený na N-terminálním konci. Transgenní rostliny po vystavení infekci nejdříve vykazovaly typické symptomy, ty ale po 3 až 5 týdnech od inokulace vymizely a nejen, že virus v dříve napadených pletivech nebyl detekován, ale tyto rostliny byly specificky rezistentní vůči TEV. Množství mRNA transgenů bylo u těchto rostlin 12 až 22x menší než u neinokulovaných transgenních linií, bylo proto navrženo, že rezistence je výsledkem cytoplazmatické aktivity, která se zaměřuje na specifické RNA sekvence (Lindbo *et al.*, 1993). Tento model byl potvrzen a dále rozpracován. Sekvenčně specifické rozpoznání bylo podmíněno tvorbou siRNA (small interfering RNA) odvozených od transgenů. Jelikož byly siRNA detekovány i v infikovaných divokých typech rostlin dospělo se k závěru, že RNA transgenů přeprogramovala již stávající antivirální obranu rostlin (Baulcombe, 1996).

Proces RNAi je závislý na dsRNA (double strand RNA) umlčování. Tato dsRNA vzniká pomocí RdRp a je nutné, aby byla schopná se složit do vlásenky, která je rozpoznána a naštipána enzymem Dicer (*DCL*) na 21-24 nt dlouhé siRNA (small interfering RNA) s 2 nt převisy na 3' konci a fosfátovou skupinu na 5' konci. V genomu *Arabidopsis* byly identifikovány čtyři *DCL* geny. Primárním senzorem přítomnosti virální dsRNA je *DCL4*, který produkuje 21 nt siRNA, *DCL2* produkuje 22nt siRNA a *DCL3* v nepřítomnosti obou předešlých proteinů produkuje 24 nt siRNA. *DCL1* přispívá pouze minimálně. Dicer dále katalyzuje vznik RISC komplexu (RNA Induced Silencing Complex). Katalytickou jednotkou tohoto komplexu je ARGONAUTE protein (Borgio, 2009; Llave, 2010). Tato skupina proteinů je zapojená i v miRNA (micro RNA) drahách, syntéze proteinů, nebo při udržování integrity genomu. Selektce vlákna z dsRNA závisí na termodynamické stabilitě 5' konce. Obecně platí, že molekuly s nestabilnějším 5' koncem jsou inkorporovány do RISC (Hutvagner and Simard, 2008; Llave, 2010). Aktivovaný RISC nesoucí siRNA, která je 100% komplementární k cíli zajišťuje degradaci mRNA. Nicméně byla potvrzena existence takzvaných stRNA (small temporal RNA; malé dočasné RNA), které na rozdíl od

siRNA nejsou 100% komplementární ke svému cíli a nedochází rovnou k úplné degradaci mRNA, ale pouze k zastavení translace (Hannon, 2002).

Účinnost RNAi je závislá na mnoha faktorech: výběru genu, metodě introdukce dsRNA a její expresi, nebo přítomnosti nespecifických cílů (Mamta and Rajan, 2017). Jedním z faktorů je i struktura vkládané RNA. Jako nejlepší možnost se podle Wesley *et al.* (2001) ukázala být hpRNA (hairpin RNA, vlásenková RNA). Byla provedena studie na rostlinách rýže nesoucí GUS gen (kódující β -glukoronidasu). Rostliny nesoucí hpRNA, u kterých byl GUS gen utišen bylo 85 % na rozdíl od 30 % rostlin nesoucích pouze ssRNA (kosuprese). Přítomnost intronu v RNA se také ukázala jako důležitá, když 100 % rostlin transformovaných konstrukty s intronem vykazovalo umlčení (Smith *et al.*, 2000). Dalším příkladem úspěšného RNAi jsou rostliny tabáku rezistentní vůči viru Y bramboru, viru tabákové mozaiky a viru mozaiky okurky. Vybrané virové 5' konce cDNA fragmentů (200 – 250 bp) byly naklonovány jako jedna chimérická cDNA a vloženy do vektoru pRHPTC jako obrácené repetice, aby po přepisu byla zformována hpRNA. Rostliny tabáku NC89 byly transformovány pomocí *A. tumefaciens* a z celkem 1018 získaných transgenních linií bylo 18 % imunní ke ko-infekci PVY, TMV a CMV (Zhu *et al.*, 2009). Dalším příkladem RNAi v rostlinách je pšenice rezistentní vůči WSMV (Wheat Strike Mosaic Virus; virus čárkovité mozaiky pšenice), který je přenášen roztočem (*Curl mite*). RNAi konstrukt byl navržen tak, aby jako hpRNA cílil na nukleární inkluzní protein A. Rezistence byla testována na T₁ generaci a z celkového počtu 10 linií 6 vykazovalo kompletní rezistenci, která byla klasifikována jako imunita. Pro klasifikaci rezistence jako „imunita“ je nutné splnit 4 kritéria: (1) na rostlinách nejsou pozorovány symptomy nákazy, (2) ELISA testy odpovídají neinfikovaným rostlinám, (3) v listových extraktech nebyly pomocí qPCR detekovány sekvence viru, (4) citlivé rostliny vystavené listovým extraktům nejsou infikovány (Fahim *et al.*, 2010). Jako hpRNA byl navržen i konstrukt obsahující BYDV (Barley Yellow Dwarf Virus; Virus žluté zakrslosti ječmene), podle sekvence z kmene PAV. Z 25 transgenních linií T₀ generace jich 9 prokázalo silnou odolnost vůči viru. Rostliny T₁ generace dvou z těchto linií, nesoucí pouze 1 kopii transgenu byly dokonce klasifikovány jako imunní (Wang *et al.*, 2000).

V roce 1994 byla na trh uvedena odrůda rajčete Flavr Savr. Jednalo se o první aplikaci RNAi, a to v době, kdy mechanismus působení ještě nebyl plně znám. Rajče Flavr Savr obsahovalo „antisense“ kopii genu pro polygalakturonázu, která potlačuje produkci enzymu urychlující dozrávání. Ačkoliv byla tato odrůda po svém uvedení na trh velmi populární, o tři roky později byla její produkce zastavena kvůli nízké poptávce. I přes tento neúspěch

výzkum RNAi pokračuje a další produkty dosáhly různých fází regulačního schválení. Ve většině zemí jsou ale na RNAi založené transgenní rostliny regulovány jako geneticky modifikované a jejich schválení předchází velmi přísná hodnocení. Nicméně nedávné pokroky ve vývoji od RNAi odvozených biopesticidů by mohly poskytnout alternativu ke geneticky modifikovaným plodinám (Jalaludin *et al.*, 2018).

2.1.3 CRISPR/Cas9

Editace genomu využívající programovatelných nukleas v posledních letech vzkvétá, a to především díky technologii CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat/CRISPR Associated System 9). Metody cílené editace genomu představují univerzální způsob k přesným delecím, insercím nebo bodovým mutacím sekvence v různých organismech. Pro editaci rostlinného genomu se CRISPR systém, na rozdíl od meganukleas (nukleasy se zinkovými prsty (ZFN; Zinc Finger Nuclease) nebo TALENs (Transcription Activator-Like Effector Nucleases; Christian *et al.*, 2010) stal využívanější technikou, díky schopnosti vytvořit zlom i v methylovaném místě (Sander and Joung, 2014; Mali *et al.*, 2013).

Dnes používaný CRISPR/Cas9 systém je odvozený od přirozeně se vyskytujícího „imunitního systému“ některých prokaryot, který jim umožňuje obranu před viry. Po objevení bakteriálního systému se ukázalo, že nativní crRNA (CRISPR RNA) je modifikovatelná na funkční sgRNA (single guide RNA, navádějící RNA) a expresí sgRNA-Cas9 v heterologním systému je možné poměrně jednoduše místně specificky editovat genom. První komponentou systému je enzym Cas9, který katalyzuje DNA zlomy. Druhou komponentou je sgRNA, která navádí Cas9 na cílové místo, umístěné „upstream“ od PAM motivu (Protospacer Adjacent Motif; místo obsahující NGG nebo NAG sekvenci) a kde má dojít ke dvouvláknovému zlomu. Vytvořený zlom pak může být opraven dvěma způsoby: **(1)** nehomologní rekombinací (NHEJ) a **(2)** homologní rekombinací (HDR). NHEJ může vést k inserci nebo delecii v genomu, zatímco HDR může být využito k tvorbě bodových mutací nebo inserce zájmové sekvence skrz rekombinaci cílového lokusu a exogenní DNA. Ideálně by každá sgRNA měla být komplementární k unikátnímu souboru 20 bazí v genomu (Schaeffer and Nakata, 2015; Sander and Joung, 2014).

Technologií CRISPR/Cas9 byly úspěšně připraveny rostliny rezistentní vůči virům. Prvním příkladem jsou *Nicotiana benthamiana* a *Arabidopsis* rezistentní vůči „Beet Severe Curly Top Virus“ (BSCTV). BSCTV se řadí mezi Geminiviry a mezi jeho hostitele patří kromě řepy taky tabák a huseníček. Byla navržena sgRNA cílená na inhibici replikace viru.

Bylo vybráno 43 cílů pro Cas9 pomocí kterých bylo připraveno 43 vektorů nesoucích Cas9 pod 35S promotorem a sgRNA pod AtU6 promotorem (U6 promotor kontroluje expresi U6 RNA a malých nukleárních RNA). Byla provedena tranzientní transformace plazmidem nesoucím Cas9 a sgRNA. Za dva dny byly rostliny infikovány BSCTV a o deset dní později byly viditelné první symptomy viru. Titr viru byl určen pomocí qPCR, která ukázala, že sgRNA-Cas9 všech konstruktů inhibovala akumulaci viru v infikovaných listech. Ve srovnání s kontrolním vektorem 38 ze 43 konstruktů redukovalo titr viru o víc jak 60 % a 20 konstruktů o víc jak 80 %. Protože Geminiviry jsou schopny šířit se v rostlinných pletivech, symptomy nákazy byly pozorovány i na neinokulovaných listech. U nejúčinnějších konstruktů ale nebyly pozorovány vážné symptomy a titr viru byl oproti kontrole o 90 až 97 % nižší (Ji *et al.*, 2015). Ve druhém případě byl připraven konstrukt Cas9-sgRNA specifický k nekódující sekvenci „Tomato Yellow Leaf Curl Virus“ (TYLCV) a transformován do *N. benthamiana*. Rostliny nesoucí transgen byly vystaveny TYLCV. CRISPR/Cas systém dokázal vyvolat degradaci a indukci mutací ve virové DNA. Po otestování všech sgRNA se jako nejúčinnější ukázaly být ty, cílící na mezigenové oblasti (Ali *et al.*, 2015). Ve třetím případě byl připraven konstrukt sgRNA-Cas9 k narušení funkce *eiF4E* (Eucaryotic translation Initiation Factor 4E; eukaryotický iniciační faktor translace 4E) endogenního genu okurky seté (*Cucumis sativus*) cílící na N' a C' konce. Rezistence byla testována na T₃ generaci. Homozygotní transgenní potomci vykazovali imunitu ke „Cucumber vein yellowing virus“, a rezistenci ku „Zucchini yellow mosaic virus“ a „Papaya ring spot mosaic virus-W“. Heterozygotní mutanti a nemutované rostliny byly velmi náchylné k těmto virům (Chandrasekaran *et al.*, 2016).

2.2 VIRUS ZAKRSLOSTI PŠENICE

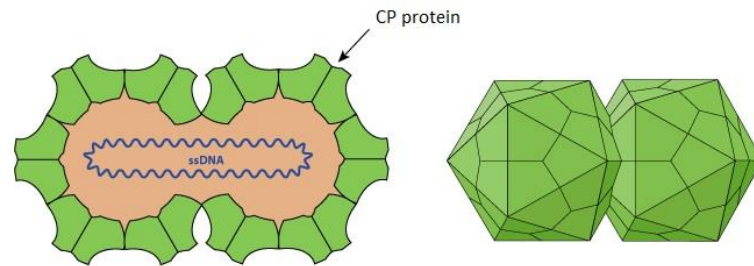
Virus zakrslosti pšenice je patogen napadající obiloviny patřící do čeledi *Geminiviridae* a rodu *Mastrevirus*. Je přenášen křísem polním a poprvé byl detekován na území tehdejší Československé republiky (Vacke, 1961). Nepřítomnost přirozené genetické rezistence a vzácnost jakéhokoliv stupně tolerance nákazy z něj učinila jeden z nejškodlivějších virů napadajících obiloviny. Virus napadá primárně pšenici (*Triticum aestivum* L.), některé specifické kmeny jsou schopny napadat i ječmen (*Hordeum vulgare* L.) (Abt *et al.*, 2015) ale byli již publikováni i napadení jedinci rostlin: jílek vytrvalý (*Lolium perenne*, Vacke, 1971), chundelka metlice (*Apera spica-venti*, Vacke and Cibulka, 1999) a pohánka hřebenitá (*Cynosurus cristatus*, Ripl and Kundu, 2015).

2.2.1 Čeleď Geminiviridae

Geminiviridae je čeleď malých, nezapouzdřených, ssDNA virů s kruhovým genomem o velikosti 2,5 až 5,2 kb napadajících jednoděložné i dvouděložné rostliny. Tato čeleď má jedinečnou morfologii částic: jedná se o dva spojené dvacetistěny tvořené obalovým proteinem (Obr. 1). Do čeledi *Geminiviridae* patří rody: *Becutrovirus*, *Begumovirus*, *Capulavirus*, *Curtovirus*, *Eragrovirus*, *Grablovirus*, *Mastrevirus*, *Topocuvirus* a *Turncurtovirus*. Všechny tyto druhy jsou přenášeny hmyzem. (Tab.1; Zerbini *et al.*, 2017).

Tab. 1 Rody čeledi *Geminiviridae*, jejich nejvýznamnější druhy, přenašeči a hostitelé. Upraveno podle Zerbini *et al.*, 2017.

Rod	Druh	Přenašeč	Hostitel
<i>Becutrovirus</i> (2 druhy)	<i>Beet curly top Iran virus</i> <i>Spinach curly top</i> <i>Arizona virus</i>	Křístkovití	Dvouděložné rostliny
<i>Begumovirus</i> (> 360 druhů)	<i>Affrican cassava mosaic virus</i> <i>Tomato yellow leaf curl virus</i>	Molice	Dvouděložné rostliny
<i>Capulavirus</i> (4 druhy)	<i>Alfalfa leaf curl virus</i>	Mšice	Dvouděložné rostliny
<i>Curtovirus</i> (3 druhy)	<i>Beet curly top virus</i>	Křístkovití	Dvouděložné rostliny
<i>Mastrevirus</i> (>30 druhů)	<i>Maize streak virus</i> <i>Wheat dwarf virus</i>	Křístkovití	Jedno- a dvouděložné rostliny
<i>Eragrovirus</i> (1 druh)	<i>Eragrostis curvula streak virus</i>	neznámý	Dvouděložné rostliny
<i>Grablovirus</i> (1 druh)	<i>Grapevine red blotch virus</i>	Křístkovití	Vinná réva
<i>Topocuvirus</i> (1 druh)	<i>Tomato pseudo curly top virus</i>	Ostnohřebetkovití	Dvouděložné rostliny
<i>Turncurtovirus</i> (1 druh)	<i>Turnip curly top virus</i>	Křístkovití	Dvouděložné rostliny



Obr. 1 Morfologie částic virů čeledi *Geminiviridae*. CP protein: Coat Protein, obalový protein. Převzato z: https://viralzone.expasy.org/109?outline=all_by_protein.

Begumovirus jako jediný má jedno- nebo dvojdílný genom, ostatní zástupci mají pouze jednodílný genom. Genom mastrevirů tvoří cirkulární ssDNA o velikosti 2,6 – 2,8 kb, která kóduje obalový protein, pohybový protein, a replikační protein exprimovaný jako dvě ORFs (Open Reading Frames). Rep protein je mezi druhy mastrevirů velmi konzervovaný, na rozdíl například od obalového proteinu, který určuje vektorovou specificitu. Genom dvojdílných begumovirů je tvořen DNA-A a DNA-B komponenty, každý s velikostí 2,5 až 2,6 kb. DNA-A kóduje obalový protein, domnělý pohybový protein, replikační protein, aktivátor transkripce, zesilovač replikace a C4 protein. DNA-B kóduje protein jaderného kyvadlového transportu a pohybový protein. Genom jednodílných begumovirů připomíná DNA-A komponentu dvojdílného viru (Zerbini *et al.*, 2017).

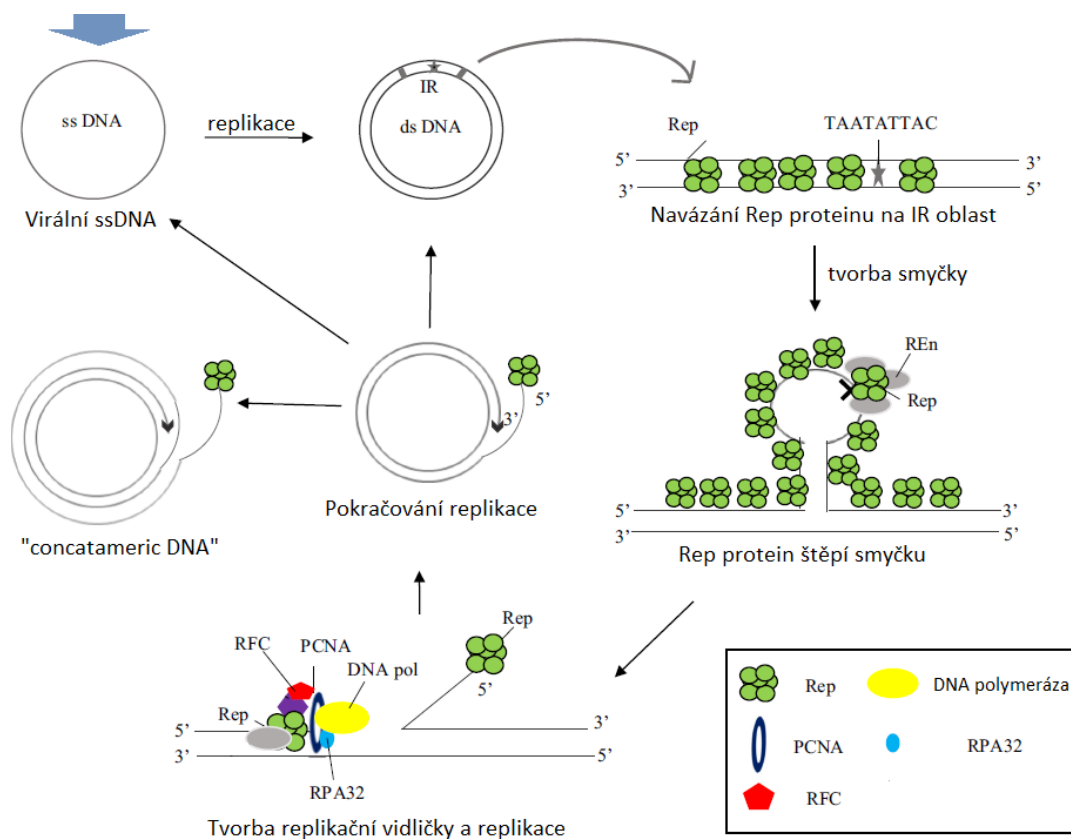
2.2.1.1 Replikace Geminivirů

Replikace geminivirů probíhá v jádře hostitelské buňky, kam je po inokulaci transportována virová DNA, a to dosud neznámým mechanismem. První stupeň zahrnuje převedení cirkulární ssDNA na meziformní nadšroubovicově stočenou dsDNA pomocí tzv. počátku replikace (-) vlákna. V případě mastrevirů se malá, 80 nt ssRNA molekula naváže na (+) vlákno a je obalena. Tato molekula pravděpodobně slouží jako primer a je následkem aktivity DNA primasy, na což ukazuje její 5'konec který obsahuje několik ribonukleotid monofosfátů. Mechanismus kontrolující iniciaci replikace není dosud znám. Molekula ssDNA se u mastrevirů navazuje do SIR místa (Short Intergenic Region; krátká mezigenová oblast), což naznačuje, že právě tady se nachází počáteční místo replikace (-) vlákna. U jiných geminivirů se tato molekula nevyskytuje a například virus „African cassava mosaic virus“ se replikuje pomocí RNA-primeru jehož 5'konec leží v IR regionu (Intergenic Region, mezigenová oblast), stejně jako počáteční místo (+) vlákna. Elongace ssDNA a tvorba kovalentně spojené dsDNA je úplně závislá na hostitelských enzymech. Replikaci zajišťuje hostitelská DNA polymeráza typu α nebo δ a přednostně je replikována DNA

v nadšroubovicové formě. Tento převod pravděpodobně není výsledkem činnosti DNA gyrázy, ale navázáním hostitelských histonů, které vytvoří nukleosom. U mastrevirů se při replikaci zapojují proteiny Rep a RepA. Tyto proteiny jsou exprimovány ze stejného genu pod dvěma ORFs. RepA je zhruba o 80-90 nt kratší na C-terminální části, má tedy zhruba 75 % velikosti Rep proteinu a jeho celková velikost je zhruba 31 kDa. RepA je potřebný k replikaci MP a CP a funguje i jako negativní regulátor replikace. Je schopný se vázat na RBR protein (Retinoblastomový protein), který reguluje přechod z G1 do S fáze buněčného cyklu. Druhým proteinem zapojeným do replikace je Rep protein, který kódují všechny geminiviry. Jedná se o zhruba 40 kDa, vysoce konzervovaný protein. Je schopen se vázat na DNA, místně specificky ji štěpit nebo spojovat a je nezbytnou komponentou pro iniciaci a terminaci „rolling cycle replication“. Dalším stupněm je převod nadšroubovicové dsDNA do dsDNA a ssDNA pomocí „rolling-cycle replication“. Rep protein se naváže na vysoce konzervovanou sekvenci TAATATT//AC dsDNA (sekvence obsahující „nonanucleotide“, znak // znázorňuje štěpení), oligomerizuje, vytváří smyčku, kterou následně rozštípne. Proces elongace zahrnuje extenzi na 3'konci a využití komplementárního vlákna jako templátu. Rep protein odmotává dsDNA, zatímco replikační faktory hostitele jako RPA32 (Replication Protein A32), RFC (Replication Factor C) nebo DNA polymeráza se seskupí na 3'konci. Jakmile je přepsána celá sekvence, dochází v jejím „nonanucleotide“ místě znovu k rozštípnutí a ligaci na rodičovský virion pomocí Rep proteinu. Další DNA syntéza ústí ve vznik „concatameric forms of DNA“, mnohocyklické DNA nabalené na sobě (Obr. 2; Gutierrez, 1999; Rizvi *et al.*, 2014).

2.2.1.2 Průběh nákazy Geminiviry

Geminiviry typicky infikují buňky listu a vaskulárních pletiv, které opustily buněčný cyklus a neexprimují DNA polymerázu. Geminiviry proto musejí pozměnit hostitelské kontrolní mechanismy transkripce k indukci produkce proteinů zapojených v DNA replikaci. Dochází k aktivaci genů exprimovaných během S/G2 fáze buněčného cyklu a inhibici genů zapojených v M/G1 fázi. Základním regulátorem buněčného cyklu je RBR protein, který je regulován fosforylací narušující vazbu E2F transkripčních faktorů a umožňující transkripci E2F cílových genů v rámci přípravy na S fázi. Rep, RepA a REn proteiny (Replication Enhancer, zesilovač replikace) se vážou na RBR. Inaktivace RBR umožňuje předčasný vstup do S fáze. Geminiviry, na rozdíl od lidských DNA virů neindukují buněčné dělení. Některé viry nutí buňky k replikaci její vlastní i virové DNA, jiné sice indukují mitotický cyklus, ale zastaví ho v profázi. Ačkoliv je interakce s RBR proteinem v rámci *Geminiviridae* silně



Obr. 2 Replikace *Geminiviridae* pomocí „rolling-cycle replication“. Rep: Replikační protein, PCNA: Proliferating Cell Nuclear Antigen, RFC: Replication Factor C, RPA32: Replication Protein A32. Převzato a upraveno podle: Rizvi *et al.*, 2014.

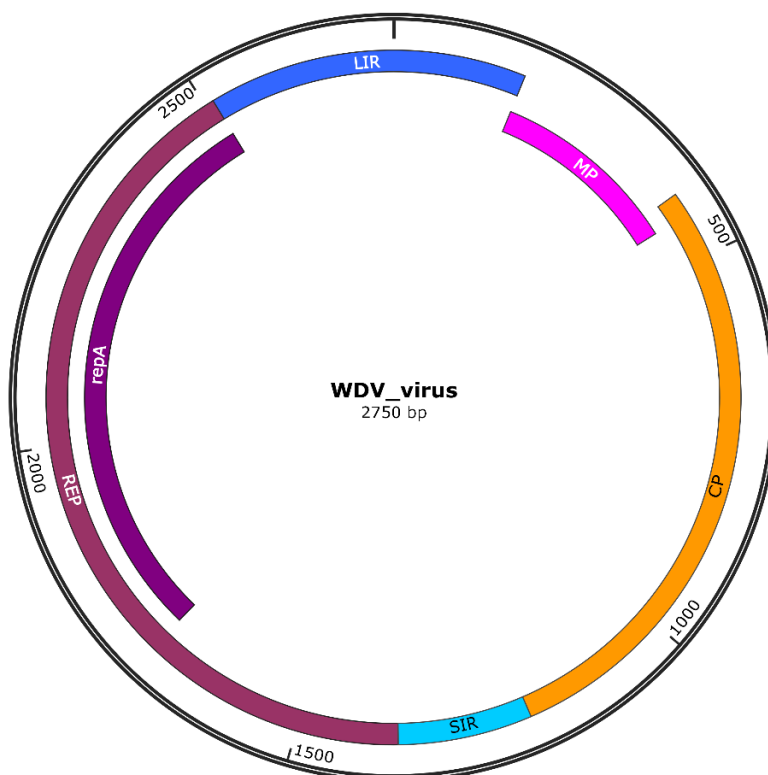
konzervovaná, následky této interakce se liší v závislosti na druhu viru, typu buňky nebo zapojením satelitních proteinů (Hanley-Bowdoin *et al.*, 2013). Transkriptomický profil napadených buněk ukázal zvýšenou transkripci genů zapojených při opravě poškozené DNA a genů pro rekombinantní proteiny. Toto navýšení může být z důvodu štěpené virální DNA a ssDNA, kterou buňka vnímá jako vlastní poškozenou DNA (Ascensio-Ibáñez *et al.*, 2008).

Na nedávno provedené studii byla pozorována fosforylace Rep proteinu „Tomato golden mosaic virus“ (TGMV) kinasou SnRK1 (Sucrose Non-fermenting 1-Related Kinase) na S97. Serin byl tedy zaměněn za kyselinu asparagovou, tzv. „phosphomimicking“, a konstrukty byly transformovány do protoplastů *Nicotina tabacum*. Mutovaný Rep protein se množil pomaleji než nemutovaný Rep v kontrolní skupině. Výsledky této studie ukazují, že SnRK1 fosforylací Rep proteinu zpomalují jeho translaci a kinasa je pravděpodobně zapojená v obraně vůči patogenům. Téměř všechny geminiviry mají serinový zbytek na podobném místě jako TGMV Rep protein (Shen *et al.*, 2018). V roce 2012 byla podána žádost o patent inhibitoru replikace geminivirů založeném na proteinu zinkových prstů schopný se navázat na replikační smyčku a zamezit tím množení viru (Sera, 2017).

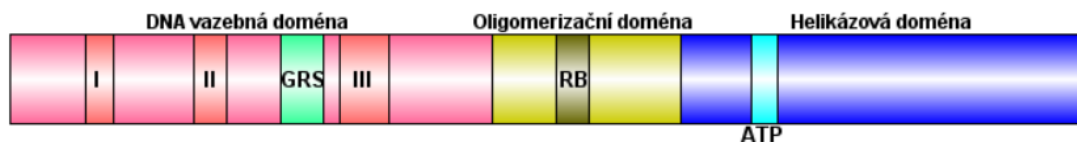
2.2.2 Struktura WDV

Genom WDV je malý, má 2 750 nt (český izolát CZWDV-W, Obr. 3) a kóduje 4 proteiny: obalový protein, pohybový protein, a dva replikační proteiny Rep a RepA, které jsou transkribovány pod dvěma ORFs (Köklü *et al.*, 2007).

Podle literatury byla sestavena pravděpodobná schémata Rep a RepA proteinů. Rep protein obsahuje 3 domény: DNA vazebnou doménu, oligomerizační doménu a helikázovou doménu. DNA vazná doména má čtyři konzervované motivy: I. DNA vazný motiv, II. motiv pro vazbu kovů, GRS motiv společný pro všechny geminiviry a III. motiv pro štěpení a ligaci DNA. V oligomerizační doméně je umístěn motiv pro vazbu na RBR protein. V helikázové doméně je umístěn vazebný motiv k ATP (Obr. 4). Předpokládá se, že RepA protein sdílí s Rep proteinem DNA vaznou a oligomerizační doménu, experimentálně ale jejich přítomnost nebyla dokázána. Na C-terminálním konci RepA se nachází GRAB doména (Geminivirus RepA-Binding transcription factors; doména pro vazbu transkripčních faktorů) a TRA doména (promoter TRAnsactivation domain; promotorová transaktivační doména), (Obr. 5; Fondong *et al.*, 2013).



Obr. 3 Organizace genomu WDV. MP: pohybový protein, CP: obalový protein, REP: protein asociovaný s replikací, RepA: protein A asociovaný s replikací, LIR: dlouhá mezigenová oblast, SIR: krátká mezigenová oblast. Upraveno podle českého izolátu CZWDV-W, NCBI accession number: FJ546188. Připraveno v programu SnapGene.



Obr. 4 Předpokládané domény a konzervované motivy Rep proteinu. I: DNA vazný motiv, II: motiv pro vazbu kovů, GRS: konzervovaný motiv všech Geminivirů, III: motiv pro štěpení a ligaci DNA. RB: vazné místo pro Retinoblastomový protein. ATP: motiv k vazbě na ATP. Upraveno podle: Fondong *et al.*, 2013 v programu DOG 2.0.



Obr. 5 Předpokládané domény a konzervované motivy Rep A proteinu. I: DNA vazný motiv, II: motiv pro vazbu kovů, GRS: konzervovaný motiv všech Geminivirů, III: motiv pro štěpení a ligaci DNA. RB: vazné místo pro Retinoblastomový protein. TRA: transaktivace doména pro promotor. GRAB: vazebné místo pro transkripční faktory. Upraveno podle: Fondong *et al.*, 2013 v programu DOG 2.0.

WDV bylo izolováno z pšenice i ječmene, nicméně izoláty z pšenice nejsou schopny napadat ječmen a naopak. Podle sekvence genomu (skóre párové identity) bylo navrženo rozdělení na 5 kmenů, z čehož 3 kmene (A,B,D) byly identifikovány v ječmeni a 2 kmene (C,E) v pšenici (Muhire *et al.*, 2013). Většina WDV pšeničných izolátů v Evropě a Asii sdílí velkou část sekvence kmene WDV-E. Rozdíly mezi izoláty se koncentrují především v intronech, krátkých a dlouhých mezigenových regionech a sekvenci RepA (Wu *et al.*, 2008).

2.2.3 Příznaky a rozšíření nákazy WDV

Vektorem WDV je křís polní (*Psammotettix alienus*), šedě zbarvený hmyz čeledi Křístkovití. Křís polní je infikován virem po vysání floémových šťáv napadené rostliny. Studie pohybu WDV vektorem naznačuje, že viruse se šíří homocoelem do slinných žláz a středního střeva, může procházet skrz pochvu filtrační komory a infikovat rostlinu pšenice do 5 minut od nabodnutí styletu (Wang *et al.*, 2014). Křís polní přezimovává ve stádiu vajíček, ze kterých se v dubnu rodí nymfy dospívající v období května a června v závislosti na teplotě (Manurung *et al.*, 2005). Jakmile venkovní teplota vystoupá nad 15 °C začíná se populace křísů množit. Nejkritičtějším obdobím je podzim, kdy je populace křísů vysoká a rostliny jsou v brzkých stádiích vývoje, tedy nejnáchylnější k infekci (Lindblad and Sigvald, 2004).

Nejvýraznějším symptomem nákazy je zakrňení rostlin. Rostliny rostlé ve skleníku a nakažené ve fázi 1 až 2 listů dosáhly výšky 10 až 15 cm, na rozdíl od kontrolní skupiny,

jejíž jedinci dosáhly výšky až 1 m. Odnožování nakažených rostlin ve skleníku bylo potlačeno, zatímco infikované rostliny rostlé na poli měly naopak více odnoží než neinfikované. Klasy nakažených rostlin byly často sterilní, v mnoha případech ani nevystoupily z pochvy. Pokud se už v klasech vytvořila zrna, byla svraštělá. V ranných stádiích infekce mají listy nepravidelně roztroušené jemné skvrny s nejasnými obrysy. Listy v pozdějším stádiu infekce získávají žlutou barvu směrem od špičky a okraje až k listovému pouzdru a stonku. V konečné fázi rostliny začnou hnědnout a umírat. Inkubační doba viru je v průměru 14 až 15 dní pro pšenici i ječmen (Vacke, 1961).

Od první zmínky v roce 1961 byl virus detekován i na území Švédska (Lindsten *et al.*, 1970), Bulharska (Stephanov and Dimov, 1981), Maďarska (Bisztray and Gáborjányi, 1989, Německa (Huth, 2000) nebo Číny (Xie *et al.*, 2006). Nejčerstvější zmínka o detekci WDV v ozimé pšenici pochází z Estonska (Sömera and Truve, 2019).

2.2.4 Ochrana proti virovým chorobám

Ochrana proti jakémukoliv rostlinnému viru je složitá. Vir nemůžeme identifikovat pouze podle symptomů které jsou zaměnitelné s různými jinými stresy, ale musí se provést laboratorní analýzy- ELISA test, PCR či sekvenování. Virové infekce se často vyskytují smíšené, například WDV a BYDV. Osvědčená ochrana zahrnuje dva kroky (1) agrotechnická opatření: pro setí se volí odrůdy s vyšším stupněm odolnosti, je nutné odstranit možné zdroje nákazy (výdrol obilovin, přerušení zeleného pásu) a zvolit termín setí tak, aby při vzcházení rostlin byla populace přenašečů co nejmenší. (2) Chemická ochrana: moření osiva insekticidy, obecná aplikace insekticidů na jaře a podzim (Chrpová *et al.*, 2017).

Studie maďarských kultivarů ozimé pšenice: Mv Regiment, Mv Emese, Mv Dalma a Mv Vekni pro jejich náchylnost k viru WDV prokázala částečnou rezistenci kultivarů Mv Vekni a Mv Dalma. Množství DNA viru v těchto kultivarech bylo mnohem menší než v kultivarech Mv Regiment a Mv Emese. Kultivary Mv Vekni a Mv Dalma byly proto označeny jako částečně rezistentní (Benkovics *et al.*, 2010). Jedná se o jediný záznam o kultivarech pšenice odolných vůči WDV ve větší míře.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 MATERIÁL

3.1.1 Použité chemikálie

- ❖ 2,4-D (Sigma-Aldrich)
- ❖ 2x RNA LD (Thermo Scientific™)
- ❖ 20x SSC buffer (Sigma-Aldrich)
- ❖ 50 mM MgSO₄ (Sigma-Aldrich)
- ❖ 6x Loading Buffer (Sigma-Aldrich)
- ❖ Acetosyringon (Sigma-Aldrich)
- ❖ Agarosa (SERVA; BioShop)
- ❖ Akrylamid/bisakrylamid 19:1 (Sigma-Aldrich)
- ❖ APS (persulfát amonný, Sigma-Aldrich)
- ❖ BAP (6-Benzylaminopurin; Sigma-Aldrich)
- ❖ Biotin (Sigma-Aldrich)
- ❖ Bromfenol Blue (Bromfenolová modř; Abcam)
- ❖ Citrát sodný (Sigma-Aldrich)
- ❖ CTAB (Cetrimonium bromid; Sigma-Aldrich)
- ❖ CuSO₄ · 5H₂O (Sigma-Aldrich)
- ❖ DEPC (Diethyl pyrokarbonát; Sigma-Aldrich)
- ❖ Dicamba (Sigma-Aldrich)
- ❖ DNA/RNA free voda (Sigma-Aldrich)
- ❖ Dusičnan amonný (NH₄NO₃, Lachema)
- ❖ EDTA (Serva)
- ❖ Ethanol (Selico)
- ❖ Etidium bromid (Invitrogen)
- ❖ Fenol (Sigma-Aldrich)
- ❖ Formamid (Sigma-Aldrich)
- ❖ Glukosa (Sigma-Aldrich)
- ❖ Glutamin (Sigma-Aldrich)
- ❖ Glycerol (Sigma-Aldrich)
- ❖ GlycoBlue (Thermo Scientific™)
- ❖ Hypochlorid sodný (Fluka)
- ❖ Chloroform (Sigma-Aldrich)

- ❖ Izopropanol (Lach-Ner)
- ❖ Kasein hydrolyzát (Duchefa)
- ❖ KCl (chlorid draselný; Sigma-Aldrich)
- ❖ KH_2PO_4 (Sigma-Aldrich)
- ❖ Kvasničný extrakt (Sigma-Aldrich)
- ❖ Kyselina boritá (Sigma-Aldrich)
- ❖ LB (Sigma-Aldrich)
- ❖ LB Agar (Sigma-Aldrich)
- ❖ L-glutamová kyselina (Sigma-Aldrich)
- ❖ Maltóza (Duchefa)
- ❖ Mannitol (Sigma-Aldrich)
- ❖ MES (Sigma-Aldrich)
- ❖ $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Lachema)
- ❖ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Lachema)
- ❖ miliQ voda
- ❖ M-trypton (Sigma-Aldrich)
- ❖ Murashige a Skoog médium M0222 (Duchefa)
- ❖ Murashige a Skoog médium M0238 (Duchefa)
- ❖ Myo-inositol (Sigma-Aldrich)
- ❖ Myo-Inositol (Sigma-Aldrich)
- ❖ Na_2HPO_4 (hydrogenfosforečnan sodný; Sigma-Aldrich)
- ❖ NaCl (Lachema)
- ❖ NaH_2PO_4 (dihydrogenfosforečnan sodný; Sigma-Aldrich)
- ❖ NaOH (hydroxid sodný; Lachema)
- ❖ NH_4NO_3 (Lachema)
- ❖ NotI (New England BioLabs)
- ❖ Octan amonný (Merck Millipore)
- ❖ Octan hořečnatý (Merck Millipore)
- ❖ Octan sodný (Merck Millipore)
- ❖ Oligo (dT)₁₈ (Thermo Scientific™)
- ❖ P1, P2, P3 pufry (Quiagen)
- ❖ PCR H₂O (Sigma-Aldrich)
- ❖ Phytigel (Sigma-Aldrich)
- ❖ Picloram (Sigma-Aldrich)

- ❖ Plant RNA Isolation Aid (Invitrogen™)
- ❖ Prolin (Sigma-Aldrich)
- ❖ pSoup (JIC, MTA 2010)
- ❖ Pufr 3.1 (New England BioLabs)
- ❖ REDTaq Ready Mix (Sigma-Aldrich)
- ❖ Sarkosyl (Sigma-Aldrich)
- ❖ SDS (dodecylsulfát sodný; Sigma-Aldrich)
- ❖ Sso Advanced™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad)
- ❖ SybrGold (Thermo Scientific™)
- ❖ TEMED (Sigma-Aldrich)
- ❖ Thiamin (Sigma-Aldrich)
- ❖ Timentin (Duchefa)
- ❖ Tris báze (Serva)
- ❖ Trizol (Invitrogen)
- ❖ Trypton (Duchefa)
- ❖ Urea (Sigma-Aldrich)
- ❖ Xylene cyanol (Sigma-Aldrich)

3.1.2 Použitá antibiotika

- ❖ Hygromycin B (Sigma-Aldrich)
- ❖ Rifampicilin (Duchefa)
- ❖ Spectinomycin (Duchefa)
- ❖ Tetracyklin (Duchefa)
- ❖ Timentin (Duchefa)

3.1.3 Použité standarty

- ❖ 10 bp ladder (Invitrogen)
- ❖ GeneRuler 100 bp plus DNA ladder (Thermo Scientific™)
- ❖ HyperLadder™ 1 kb (Bioline)
- ❖ HyperLadder™ 50 bp (Bioline)

3.1.4 Použité kity

- ❖ Agilent 6000 RNA Nano kit (Integrated Sciences)
- ❖ DNeasy® plant Mini Kit (QUIAGEN)
- ❖ Gene JET Gel extraction and DNA cleanup Micro Kit (Thermo Scientific™)

- ❖ Illumina TruSeq® Small RNA Library kit
- ❖ QIAquick PCR & Gel Cleanup kit (Quiagen)
- ❖ Qubit 4 Quantitation Starter Kit (ThermoFisher Scientific)
- ❖ Random Primer DNA Labeling Kit (Takara)
- ❖ REDExtract-N-Amp (TM) Tissue PC (Sigma-Aldrich)
- ❖ Revertaid H Minus M-MuLV RT (ThermoFisher Scientific)
- ❖ TURBO DNA-free™ kit (Invitrogen™)

3.1.5 Použité přístroje

- ❖ Agilent 2100 Bioanalyzer (Integrated Sciences)
- ❖ Agilent 2200 TapeStation (Integrated Sciences)
- ❖ Amersham typhoon imaging systém (GE Healthcare)
- ❖ Analytické váhy (A200S Sartorius)
- ❖ Autokláv (PS20A BMT)
- ❖ Binokulární lupa (PZO)
- ❖ Centrifuga (Eppendorf)
- ❖ Digestoř (Merci)
- ❖ Elektroforetická aparatura pro agarosovou elektroforézu (BioRad, AA Hoeffer HE33)
- ❖ Elektroforetická aparatura pro akrylamidovou elektroforézu (Kucharczyk)
- ❖ Elektroporační kyvety (Thermo)
- ❖ Elektroporátor (Cellejc Duo Thermo)
- ❖ Fytokomora (Adaptis 1000; SANYO MLR 351-H)
- ❖ Hybridizační trouba (ProBlot, Labnet)
- ❖ Chlazená centrifuga (BR4 Jouan; Hettich Mikro 200R)
- ❖ Laboratorní třepačka (Orbital Shaker Incubator ES-20)
- ❖ Laminární box (Thermo Scientific)
- ❖ Magnetická míchačka (Variomag; IKA Ret basic PN/0248888)
- ❖ Mrazicí box (Liebher, New Brunswick)
- ❖ Nanodrop (DS-11, DeNovix)
- ❖ pH metr (pH526, WTV)
- ❖ Qubit 4 fluorometr (ThermoFisher Scientific)
- ❖ Termoblok (Thermostat Plus, Eppendorf)

- ❖ Thermocycler (T100™ Thermal cycler, BioRad; ProFlex™ 3x32 Applied Biosystems)
- ❖ Thermocycler pro PCR v reálném čase (C1000 Touch™ Thermal Cyler a CFX96™ Real-Time Systém, Bio-Rad)
- ❖ Termostat (BT120, Laboratorní přístroje Praha)
- ❖ Trans-Blot SD semidry transfer cell (Bio-Rad)
- ❖ Transiluminátor s modrým světlem (UltraBright, Maestrogen)
- ❖ Třepačka (Yellow line 0S5, Heidolph)
- ❖ UV transluminátor (G:Box, SynGene)
- ❖ UV komora (UVP CL-1000, Hyland Scientific)
- ❖ Zdroj napětí k elektroforéze (BioRad; Consort E865; Thermo Scientific EC1000XL)

3.1.6 Použité pufry

- ❖ **50x TAE** **1l**

Tris	242 g
Kyselina octová	57,1 ml
0,5 M EDTA	100 ml
miliQ H ₂ O	do 1 l

- ❖ **10x TBE** **1l**

Tris	108 g
Kyselina boritá	55 g
0,5M EDTA pH=8,0	40 ml
DEPC H ₂ O	do 1 l

- ❖ **DEPC H₂O** **1l**

miliQ H ₂ O	1 l
DEPC	100 µl

Voda byla protřepána, ponechána přes noc v digestoři, znovu protřepána a 2x autoklávována.

3.1.7 Rostlinný materiál

- ❖ Pro transformaci pšenice byla použita nezralá embrya rostlin jarní pšenice cv. Fielder pěstovaná ve skleníku v podmínkách: 16 hod. světlo/8 hod. tma.
- ❖ Pro transformaci ječmene byla použita nezralá embrya rostlin jarního ječmene cv. Golden Promise pěstovaná ve skleníku v podmínkách: 16 hod. světlo/8 hod. tma.
- ❖ Pro detekci siRNA odvozených od transgenu byly použity dihaploidní rostliny (DH₂) generace T₃ nesoucí J1 verzi WDV transgenu, označené jako:

WDV J1 T₃ DH₂ 2n P₄ B₃₆ fenotyp **vysoká**

WDV J1 T₃ DH₂ 2n P₅ A₁₀,

WDV J1 T₃ DH₂ 2n P₁ E₇ fenotyp **zakrslá** a rostliny divokého typu jarního ječmene cv. Golden Promise. Rostliny byly nasazeny na sterilní filtrační papír a kultivovány 3 dny ve fytofotochomře v podmínkách uvedených v Tab. 2. Linie byly přesazeny do sterilní půdy ve dvou biologických replikách (1 květináč = 3 rostliny = 1 biologická replika) a kultivovány ve fytotronu v podmínkách uvedených v Tab. 3. Po třech týdnech byly prýty rostlin odebrány a zamraženy v -80 °C.

- ❖ Pro tvorbu sRNA knihoven byly použity dihaploidní homozygotní rostliny jarního ječmene cv. Golden Promise T₂ generace nesoucí transgen *osm* a rostliny divokého typu jarního ječmene cv. Golden Promise. Rostliny byly nasazeny na sterilní filtrační papír a kultivovány 3 dny ve fytofotochomře v podmínkách uvedených v Tab. 2. Poté byly přesazeny do sterilní půdy ve dvou skupinách: kontrolní skupině a skupině později vystavené stresu ze sucha. V každé skupině byly 2x tři květináče, každý nesoucí buď transgenní rostliny nebo rostliny divokého typu. Rostliny byly kultivovány v podmínkách uvedených v Tab. 3. Po tři týdny byly květináče zalévány na 70 % SWC. Po třech týdnech byly rostlinám kontrolní skupiny odebrány prýty a zamraženy v -80 °C. Rostliny určené pro stres ze sucha byly ponechány ve fytotronu do doby, než SWC kleslo na 20 % a poté zamraženy.

Tab. 2 Podmínky ve fytofotochomře.

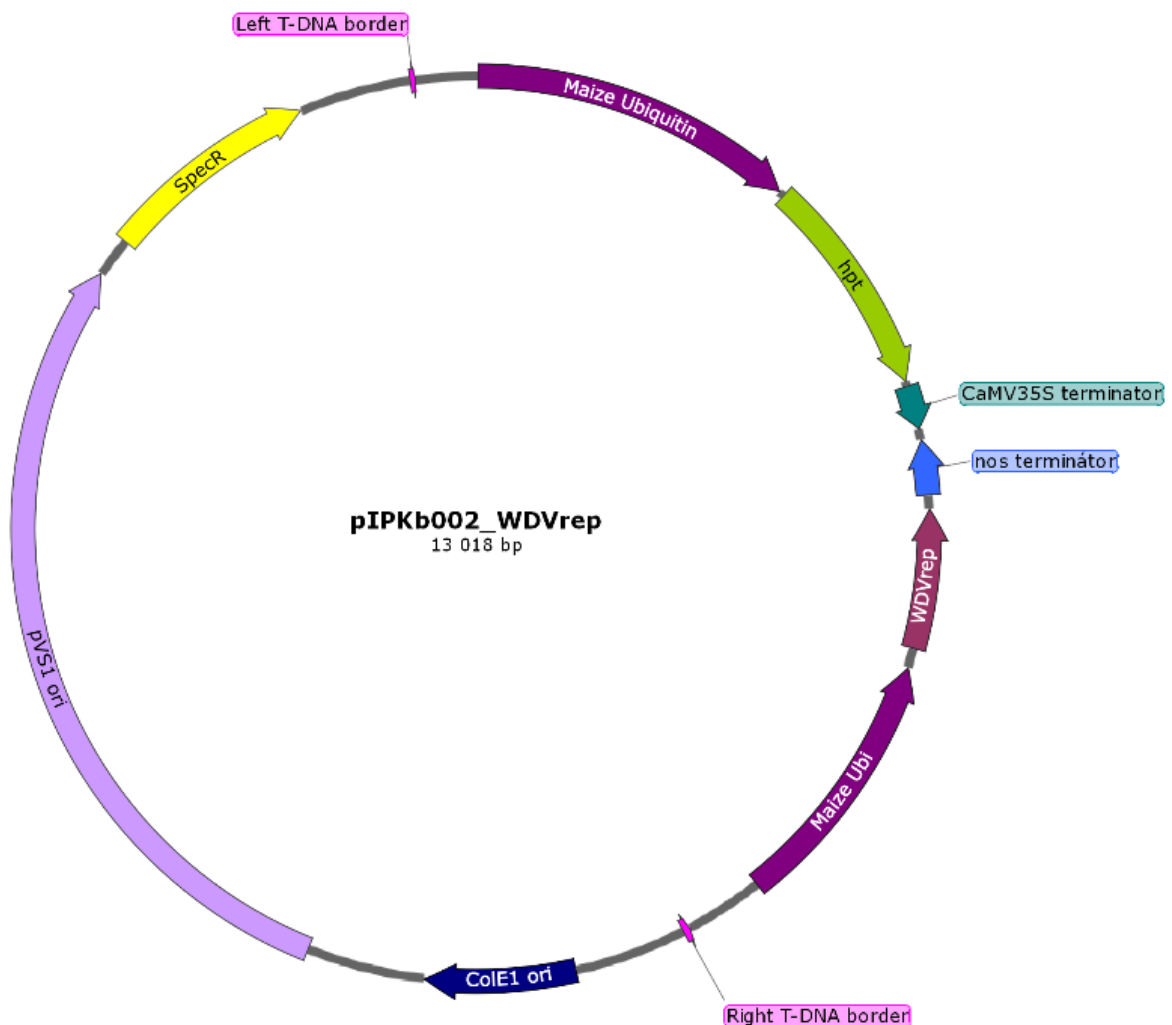
Ozářenost	4LS
Teplota	22 °C
Denní perioda	16 hod. světlo/8 hod. tma
Vlhkost	70 %

Tab. 3 Podmínky ve fytotronu.

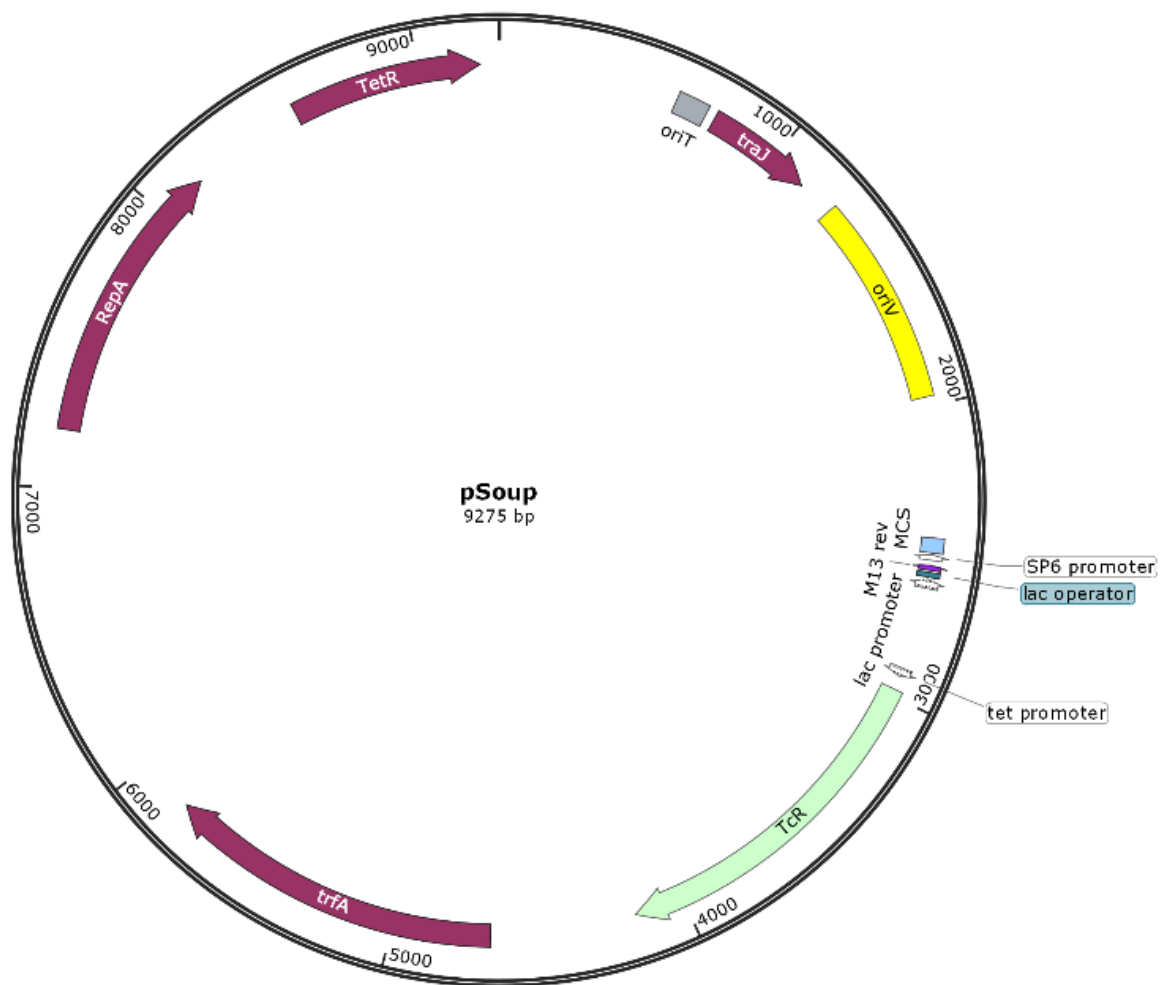
Ozářenost	600 μmol (fotonů) · m ⁻² · s ⁻¹
Teplota	21 °C den/15 °C noc
Denní perioda	16 hod. světlo/8 hod. tma
Vlhkost	60 %

3.1.8 Vektory použité pro transformace

Pro transformaci pšenice i ječmene byly použity destinační pIPKb002 vektory (Obr. 6; Kumlehn, 2008) a pomocný vektor pSoup (Obr.7; Vain *et al.*, 2003). Pro transformaci pšenice byly použity vektory pIPKb002 nesoucí K5 a J1 verze WDV replikačního proteinu, dříve transformované do ječmene (Kostková, 2015). Pro transformaci ječmene byly použity vektory pIPKb002 nesoucí AC4 a O2 verze WDV replikačního proteinu.



Obr. 6 Schéma vektoru pIPKb002 nesoucího WDVrep transgen. SpecR: gen pro rezistenci ke spektinomycinu, Maze Ubi: promotor kukuřičného ubiquitinu, hpt: gen pro rezistenci ke Hygromycinu B, CaMV35S: terminátor z viru mozaiky kvěťáku, nos1 terminator: terminátor z genomu *Agrobacterium tumefaciens*, ColE1 ori: ori místo pro replikaci v *Escherichia coli*, PVS1 ori: ori místo pro replikaci v *A. tumefaciens*. Left and Right T-DNA border: místa ohraničující kazetu vkládající se do rostlinného genomu. Upraveno podle Kumlehn, 2008 v programu SnapGene.



Obr. 7 Schéma pomocného vektoru pSoup. TetR: gen pro protein regulující rezistenci ke tetracyklinu; oriT: počátek pro horizontální transfer DNA; traJ: gen pro protein rozpoznávající oriT; oriV: počátek replikace v *Escherichia coli*; MCS: mnohočetné klonovací místo; M13 rev: místo pro navázání primeru pro sekvenaci; lac promotor: promotor pro *lac* operon; Tcr: gen pro rezistenci ke tetracyklinu; trfA: gen pro protein navazující se na oriV a regulující transkripci; RepA: gen pro protein asociovaný s replikací. Převzato z: https://www.snapgene.com/resources/plasmid-files/?set=plant_vectors&plasmid=pSoup

3.2 METODY

3.2.1 Transformace pšenice

Pšenice byla transformována podle He *et al.*, 2010. Transformována byla nezralá embrya jarní pšenice cv. Fielder vektory pIPKb002::**K5** a pIPKb002::**J1**.

3.2.1.1 Izolace genomické DNA pšenice

Genomická DNA pšenice byla izolována podle Murray a Thompson, 1980. K izolaci byl využit detergent CTAB.

3.2.1.2 PCR analýza T₀ a T₁ generace

Na ledě byla připravena směs pro PCR (Tab. 4). Směs byla po 8 µl přenesena do PCR mikrozkušavek a byly k ní přidány 2 µl templátu. Seznam dvojic primerů, jejich sekvence a velikosti ampliconů jsou uvedeny v Tab. 5. Program pro detekci WDVrep transgenů je uveden v Tab. 6.

Tab. 4 Složení PCR reakce.

Chemikálie	Množství na 1 vzorek [µl]
PCR H ₂ O	2,5
RED Taq ready mix	5,0
Primer F 10 mM	0,25
Primer R 10 mM	0,25
Templát	2
Celkem	10

Tab. 5 Názvy primerů, jejich sekvence a velikosti ampliconů použité pro PCR.

Název primeru	Sekvence	Velikost ampliconu
WDVrep 215 F	5'-ATGGCCTCTTCATCTGCACC-3'	645 bp
WDVrep 215 R	5'-TGATTCGAGGCTTACGGAGT-3'	
WDVrep 119 R + WDVrep 215 F	5'-CTCAGCTGTGTTTGCATCGG-3'	530 bp

Tab. 6 Program PCR pro detekci WDVrep transgenů.

Děj	Teplota [°C]	Čas [min.]	Počet opakování
Úvodní denaturace	95	2:00	1x
Denaturace	95	0:30	
Anelace	64	0:30	35x
Elongace	72	2:30	
Finální elongace	72	5:00	
Inkubace	4	∞	1x

3.2.1.3 Izolace celkové RNA

Listy byly homogenizovány v tekutém dusíku a třecí misce. Celkem 100 mg homogenátu bylo přeneseno do 1,5 ml mikrozkušavky, byl přidán 1 ml Trizolu a vzorky byly inkubovány 30 min. při 60 °C. Do mikrozkušavek bylo přidáno 200 µl chloroformu, vzorky byly protřepány a centrifugovány při 12 000 g a 4 °C 10 min. Vodná fáze byla přenesena do čistých 2 ml mikrozkušavek. Bylo přidáno 400 µl izopropanolu, vzorky byly protřepány, ponechány stát 10 min. v laboratorní teplotě a poté centrifugovány při 20 000 g a 4 °C 20 min. Supernatant byl odstraněn a k peletu byl přidán 1 ml 70% ethanolu. Vzorky byly centrifugovány při 20 000 g a 4 °C 10 min. Pelet byl ponechán 10 min. v laboratorní teplotě. Bylo přidáno 50 µl RNase free vody. Množství RNA bylo změřeno na Nanodropu a vzorky byly uschovány do -20 °C. RNA byla zkontrolována na 1% agarosovém gelu s ethidiumbromidem (1 µl/40 ml gelu) a 1 obj.% 6% hypochloridu sodném.

3.2.1.4 Přečištění celkové RNA

Celková RNA byla přečištěna TURBO DNA-free™ kitem. Ke 35 µl RNA bylo přidáno 4 µl pufru a 1 µl DNasy. Vzorky byly inkubovány 1 hod. při 37 °C. Poté byly přidány 4 µl inaktivačního pufru a vzorky byly inkubovány 5 min. při laboratorní teplotě. Následovala centrifugace při 10 000 g, 4 °C 1,5 min. Supernatant byl přenesen do čisté mikrozkušavky a množství přečištěné RNA bylo změřeno.

3.2.1.5 Přepis celkové RNA do cDNA

Přepis celkové RNA do cDNA byl proveden pomocí Revertaid H Minus M-MuLV RT kitu. Ke 3,3 µg celkové RNA v 11,5 µl byl přidán 1 µl Oligo (dT)₁₈, vzorky byly stočeny a inkubovány 5 min. při 65 °C. Po inkubaci byly schlazeny na ledě a do každé mikrozkušavky bylo přidáno: 4 µl 5x pufru, 2 µl 10 mM dNTPs a 1 µl Revert Aid RT. Vzorky byly promíchány, stočeny a inkubovány 1 hod. při 42 °C. Enzym byl inaktivován inkubací při 70 °C 10 min. Výsledná cDNA byla uskladněna v -20 °C.

3.2.1.6 Určení relativní exprese transgenů pomocí qRT-PCR

Byla provedena kvantitativní RT-PCR v reálném čase ke zjištění relativní exprese WDVrep genu vůči TEF1 genu (Translation Elongation Factor EF-1 α). Pro detekci WDVrep transgenů a TEF1 genu byly použity primery, jejichž specifikace jsou popsány v Tab. 7. Byla připravena standardní křivka ke zjištění efektivity amplifikace. Z gDNA transgenního ječmene jarního nesoucí J1 transgen byla amplifikována DNA transgenů pomocí WDV RT F a WDV RT R primerů a z netransgenní jarní pšenice byla amplifikována DNA TEF1

pomocí primerů EF1 F a EF1 R. Amplikony o velikosti 100 bp byly pod UV transiluminátorem vyříznuty a DNA byla přečištěna pomocí QIAquick PCR & Gel Cleanup kit. Přečištěné produkty byly naředěné podle desítkového systému a byla provedena qPCR v reálném čase k přípravě standardních křivek. Složení mixu pro qPCR je uvedeno v Tab. 8. Použitý PCR cyklus je uvedený v Tab. 9. Vzorčky byly amplifikovány desetkrát naředěné ve třech technických a biologických replikách. Relativní exprese byla vypočítána podle vzorce uvedeného na Obr. 7

Tab. 7 Název, sekvence a velikost amplikonu primerů použitých k RT-PCR v reálném čase.

Název primeru	Sekvence	Velikost amplikonu
WDV RT F	5'-TTCATCTGCACCCAGGTTCC-3'	100 bp
WDV RT R	5'-GTGCGAAGTGAATCCAAGGC-3'	
EF 1 F	5'- GAAGATGATTCCCACCAAGC-3'	100 bp
EF 2 R	5'- TGACACCAACAGCCACAGTT-3'	

Tab. 8 Složení mixu pro qPCR reakci.

Chemikálie	Množství na 1 vzorek [μl]
PCR H ₂ O	3,2
Sso Advanced™ Universal SYBR® Green Supermix	5,0
Primer F 10mM	0,4
Primer R 10mM	0,4
Templát	1
Celkem	10

Tab. 9 Cyklus qPCR reakce.

Děj	Teplota [°C]	Čas [min.]	Opakování
Úvodní denaturace	95	3:00	1x
Denaturace	95	0:10	
Anelace a elongace	60	1:00	40x
Detekce signálu			
Detekce tavicí křivky	65– 95 °C, nárůst po 0,5 °C		

$$\frac{T_i}{T_{norm}} = \frac{(1 + E_{norm})^{C_{t_{norm}}}}{(1 + E_i)^{C_{t_i}}}$$

Obr. 7 Vzorec k výpočtu relativní exprese transgenů vůči provoznímu genu. T_i/T_{norm} : exprese zájmového genu vůči expresi provozního genu, E: eficeience amplifikace pro každý gen a jeho primery (i: gen zájmu; norm: provozní gen), C_t : číslo cyklu, ve kterém fluorescence překročí kritickou mez. Převzato z: Page and Minocha, 2004.

3.2.2 Ověření vektorů a transformace ječmene

3.2.2.1 Izolace plazmidové DNA

Z bakteriální konzervy *E. coli* DH5 α bylo odebráno 7 μ l. Vzorky z kolonií *A. tumefaciens* AGL1 po transformaci byly odebrány sterilními špičkami. Bakterie byly kultivovány ve 2 ml LB média s antibiotiky (*E. coli*: 50 mg spectinomycin; *A. tumefaciens*: 50 mg spectinomycin, 50 mg rifampicin a 5 mg tetracyklin) přes noc při 37 °C v laboratorní třepačce. Bakteriální suspenze byla přenesena do 5 ml mikrozkušavek a centrifugována 3 min. při 7 000 g v centrifuze chlazené na 4 °C. Supernatant byl vylit a k peletu bylo přidáno 250 μ l studeného P1 pufru. Bakteriální pelet byl resuspendován na třepačce a zalit 250 μ l P2 pufru. Mikrozkušavky byly několikrát převráceny a bylo přidáno 350 μ l P3 pufru. Mikrozkušavky byly opět několikrát převráceny. Vzorky byly dále centrifugovány 15 min. při 7 000 g v chlazené centrifuze. Supernatant byl přenesen do 2 ml mikrozkušavek, bylo přidáno 700 μ l izopropanolu ke každému vzorku a mikrozkušavky byly ponechány k inkubaci 8 min. na ledě. Vzorky byly centrifugovány 10 min. při 18 700 g. K peletu bylo přidáno 500 μ l 70% ethanolu. Následovala centrifugace 5 min. při 10 750 g. Pelet byl vysušen a rozpuštěn ve sterilní H₂O.

3.2.2.2 Transformace elektrokompetentních buněk *Agrobacterium tumefaciens*

Do elektrokompetentních buněk *A. tumefaciens* AGL1 byly transformovány destinační vektory pIPK002b::NAC4 a pIPK002b::NO2 spolu s pomocným vektorem pSoup. K 50 μ l bakteriální kultury bylo přidáno 100 ng pDNA a suspenze byla inkubována na ledě 1 min. Směs byla následně přenesena do sterilní elektroporační kyvety a do elektroporátoru, kde bylo na buňky aplikováno 1800 V. Po elektroporaci bylo k buňkám přidáno 250 μ l SOC média (Tab. 10) a mikrozkušavky byly přeneseny do laboratorní třepačky (180 rpm, 28 °C) na 1 hod. Suspenze byla rozetřena na Petriho misky s tuhým LB médiem a antibiotiky: spectinomycin (50 mg), tetracyklin (5 mg), rifampicilin (50 mg). Petriho misky byly inkubovány při laboratorní teplotě a ve tmě přes noc. Následující den bylo připraveno tekuté LB médium a 5 kolonií z každého vektoru bylo odebráno a kultivováno. Další den byla připravena zásobní inokula pro transformaci.

Tab. 10 Složení SOC média.

Látka	Množství na 100 ml
M-trypton	2 g
Kvasničný extrakt	0,5 g
1M NaCl	1 ml
1M KCl	1 ml
2M Mg ⁺	1 ml
2M glukóza	1 ml
Doplnit do 100 ml miliQ H ₂ O.	

3.2.2.3 Restrikční analýza

Pro restrikční analýzu vektorů bakterií *E. coli* bylo použito 1000 ng pDNA. Pro restrikční analýzu vektorů z bakterií *A. tumefaciens* bylo použito 3000 ng pDNA. Složení mixu pro restrikční analýzu je uvedeno v Tab. 11. Vzorčky byly ponechány přes noc při 37 °C. Další den byly smíchány s 2 µl 6x Loading Buffer a elektroforeticky separovány na 1% agarosovém gelu s etidium bromidem. Výsledek elektroforézy byl zaznamenán na UV transiluminátoru G: Box.

Tab. 11 Příprava restrikční analýzy. Pro restrikci pDNA z *E. coli* bylo použito 1000 ng templátu a pro restrikci pDNA z *A. tumefaciens* bylo použito 3000 ng templátu.

Chemikálie	Množství na 1 vzorek [µl]
PCR H ₂ O	doplněno do 10
Pufř 3.1	2
Templát- pDNA	1-7
NotI HF 5000 jednotek	1
Celkem	10

3.2.2.4 Transformace ječmene

Transformace ječmene byla provedena podle Harwood *et al.*, 2009. Transformována byla nezralá embrya rostlin ječmene jarního cv. Golden Promise. Vektory pro transformaci byly pIPKb002::AC4 a pIPKb002::O2.

3.2.2.5 Izolace genomické DNA z ječmene

Genomická DNA byla izolována REDEExtract-N-Amp Tissue PC kitem podle pokynů výrobce.

3.2.2.6 PCR analýza T₀ generace

PCR analýza T₀ generace byla provedena podle protokolu uvedeném v kapitole 3.2.1.2 .

3.2.3 Detekce siRNA odvozených od transgenu

Detekce siRNA odvozených od transgenu byla uskutečněna na ERASMUS⁺ pracovní stáži na univerzitě Adama Mickiewicze pod vedením prof. Zofie Szweykowske-Kulinske a Dr. Andrzeje Pacaka.

3.2.3.1 Izolace genomické DNA ječmene

Genomická DNA ječmene byla izolována podle Edwards *et al.*, 1991.

3.2.3.2 Izolace celkové RNA

Celková RNA byla izolována podle protokolu uvedeném v kapitole 3.2.1.3. Přečištění RNA a její přepis byl proveden podle protokolů uvedených v kapitolách 3.2.1.4 a 3.2.1.5.

3.2.3.3 PCR analýza k potvrzení přítomnosti transgenu a jeho exprese

PCR analýza byla provedena podle protokolu uvedeném v kapitole 3.2.1.2. Byl použit odlišný PCR program, uvedený v Tab. 12 a byla analyzována i přítomnost selekčního genu *hpt*. Specifikace primerů použitých k detekci *hpt* genu jsou uvedeny v Tab. 13.

Tab. 12 Program touch-down PCR.

Fáze	Děj	Teplota [°C]	Čas [min.]	Počet opakování
Fáze 1	Úvodní denaturace	94	6:00	1x
	Denaturace	94	1:00	
Fáze 2	Anelace	65	0:40	1x
	Elongace	72	0:30	
	Denaturace	94	0:30	
Fáze 3	Anelace	63	0:40	29x
	Elongace	72	1:00	
Fáze 4	Finální elongace	72	7:00	
	Inkubace	4	∞	1x

Tab. 13 Názvy primerů, jejich sekvence a velikosti ampliconů použité pro detekci *hpt* genu.

Název primeru	Sekvence	Velikost ampliconu
HYG F	5'-GATTGCTGATCCCCATGTGT-3'	280 bp
HYG R	5'-GCTGCTCCATACAAGCCAAC-3'	

3.2.3.4 Izolace celkové RNA obohacené o sRNA frakci

Byla připravena směs 1,5 ml Trizolu, 75 μ l 10% sarkosylu a 15 μ l 0,5 M EDTA pH= 8. Ke 100 mg nadrceného rostlinného pletiva bylo přidáno 840 μ l této směsi a protřepáno. Následně bylo přidáno dalších 840 μ l směsi a vzorky byly znovu protřepány. Dále bylo přidáno 100 μ l Plant RNA Isolation Aid, vzorky byly promíchány 15 s na třepače a inkubovány 5 min. při laboratorní teplotě. Během inkubace byly mikrozkuhavky několikrát obráceny. Vzorky byly centrifugovány 5 min. při 14 000 g a laboratorní teplotě. K supernatantu, který byl přenesen do čisté mikrozkuhavky bylo přidáno 300 μ l chloroformu. Mikrozkuhavky byly několikrát obráceny a inkubovány 3 min. při laboratorní teplotě. Vzorky byly centrifugovány 10 min. při 12 000 g a 4 °C. Vodní fáze byla přenesena do čisté mikrozkuhavky a bylo k ní přidáno 100 μ l fenolu saturovaného octanem sodným (pH= 5,0). Směs byla extrahována převrácením mikrozkuhavky. Poté bylo přidáno 300 μ l chloroformu a směs byla znovu extrahována převrácením mikrozkuhavky. Vzorky byly centrifugovány 3 min. při 12 000 g a 4 °C. Byla odebrána vodná fáze. Fenol-chloroformová extrakce a následná centrifugace byly provedeny ještě dvakrát. Po poslední extrakci byly vzorky centrifugovány při laboratorní teplotě. Odebraná vodní fáze byla dvakrát extrahována 400 μ l chloroformu, promíchána na vířivé třepače a centrifugována 3 min. při 12 000 g a laboratorní teplotě. 700 μ l vodná fáze bylo odebráno do 2 ml mikrozkuhavky, byl přidán 1 μ l GlycoBlue a 875 μ l 99,8% ethanolu. Směs byla pomíchána. RNA byla precipitována 350 μ l směsi 0,8 M citrátu sodného a 1,2 M NaCl. Směs byla promíchána. Vzorky byly centrifugovány 30 min. při 12 000 g a 4 °C. Supernatant byl odebrán a pelet v mikrozkuhavce byl znovu centrifugován 3 min. při 12 000 g a 4 °C. Pelet byl 3x promyt 80% ethanolem. Bylo přidáno 500 μ l 80% ethanolu a centrifugováno 2 min. při 12 000 g a 4 °C, k dalším dvěma promytím bylo použito pouze 150 μ l 80% ethanolu a centrifugace probíhala 2 min. při 12 000 g a 4 °C. Pelet byl ponechán k vysušení 5 min. v otevřených mikrozkuhavkách. Pelet byl rozpuštěn v 15 μ l DEPC H₂O a ponechán přes noc v -20 °C. Další den byla RNA zkontrolována na 1% agarosovém gelu s etidium bromidem.

3.2.3.5 Odsolení celkové RNA obohacené o sRNA frakci

Ke 12 μ l rozpuštěného RNA peletu bylo přidáno 41 μ l DEPC H₂O, 17 μ l 2 M octanu amonného, 0,5 μ l GlycoBlue a 70 μ l izopropanolu. Směs byla inkubována 15 min. při -20 °C. Následovala centrifugace 15 min. při maximální rychlosti centrifugy (15 000 rpm) a 4 °C. Supernatant byl odebrán a precipitát byl 2krát promyt 70% ethanolem. Byl přidán 1 ml 70% ethanolu a vzorky byly centrifugovány 3 min. při 12 000 rpm a 4 °C a

poté bylo přidáno 500 μ l 70% ethanolu a vzorky byly centrifugovány 2 min. při 12 000 rpm a 4 °C. Supernatant byl důkladně odstraněn a pelety byly ponechány k vysušení v otevřených mikrozkuřkách 5 min. Pelet byl rozpuštěn v 15 μ l DEPC H₂O a ponechán přes noc v -20 °C. Vzorky RNA byly po delší dobu skladovány v -80°C.

3.2.3.6 Kontrola kvality celkové RNA obohacené o sRNA frakci

Kvalita RNA byla ověřena pomocí Agilent 2100 Bioanalyzer a Agilent 6000 RNA Nano kit. Vzorky byly nejprve naředěny, aby množství RNA v 1 μ l bylo mezi 25 – 500 ng. Následně byly vzorky denaturovány při 70 °C 2 min. v thermocycleru a poté podle protokolu naneseny na RNA nano čip. Po úvodním promytí elektrod sterilní DEPC H₂O byla v programu 2100 Expert nastavena analýza „Plant RNA Nano“. Po ukončení analýzy byly elektrody znovu promyty sterilní DEPC H₂O a kvalita RNA byla zhodnocena na základě RIN hodnoty.

3.2.3.7 Příprava radioaktivně značených prób

Byla provedena PCR se dvěma vzorky WDV rostlin s transgenem J1 podle protokolu uvedeném v kapitole 3.2.1.2. Byly použity primery WDVrep 215 F a WDVrep 215 R. Amplikon o velikosti 645 bp byl z gelu vyříznut a DNA byla eluována pomocí Gene JET Gel extraction and DNA cleanup Micro Kit. Po eluci bylo množství DNA změřeno na Nanodropu a zkontrolováno na gelu. Pro přípravu prób byl využit izotop fosforu ³²P navázaný v dCTP a Random Primer Labelling Kit. K 50 ng templátové DNA byla přidána PCR H₂O do 12 μ l a 2 μ l náhodných primerů. Směs byla zahřáta na 95 °C na 3 min. Poté bylo přidáno 2,5 μ l 10x pufu, 2,5 μ l směsi dNTPs, 5 μ l dCT³²P (1,85 MBq, 50 μ Ci) a 1 μ l Exo free Klenow fragment polymerázy. Vzorky byly inkubovány 10 min. při 37 °C. Enzym byl inaktivován zahřátím na 65 °C na 5 min. a 95 °C na 3 min. Vzorky byly schlazeny na ledě.

3.2.3.8 Northern Blot

Byl připraven 15% denaturující gel (viz 3.2.4.7, Tab. 17). 30 mg celkové RNA bylo naneseno na gel spolu s 2x RNA LD a radioaktivně značeným 10 bp standartem a 17 nt a 25 nt standardem. Elektroforéza probíhala 2,5 h při konstantních 300 V. Poté byla z gelu vyříznuta část se vzorky a byl proveden „semi-dry“ blotting. Všechny komponenty byly namočený do 0,5x TBE a uloženy na Trans-Blot SD semidry transfer cell v pořadí: 3krát filtrační papír – vinylová membrána – gel se vzorky – 3krát filtrační papír. Přenos probíhal 1 hod. při konstantních 20 V a 910 mA. Po přenosu byla RNA na membránu fixována UV zářením v UV komoře 3x 160 s. Poté bylo přidáno 7 ml hybridizačního pufu (Tab. 14)

k přípravě membrány. Po 10 min. byl pufr odstraněn a bylo přidáno čerstvých 7 ml hybridizačního pufru a 6 µl radioaktivních prób. Hybridizace probíhala v hybridizační komoře přes noc při 42 °C. Další den byla membrána 2krát promyta v promývacím pufru (Tab. 15), osušena a ponechána k expozici na destičku v autoradiografické kazetě. Po třech hod. byla destička umístěna do detekčního systému Amersham typhoon imaging system a byla zaznamenána radioaktivita na destičce.

Tab. 14 Složení hybridizačního pufru.

Chemikálie	Množství na 1 l
20x SSC buffer	100 ml
10% SDS	10 ml
DEPC H ₂ O	890 ml

Tab. 15 Složení promývacího pufru.

Chemikálie	Množství na 100 ml
10% SDS	35 ml
1M Na ₂ HPO ₄	37,5 ml
1M NaH ₂ PO ₄	12,5 ml
DEPC H ₂ O	15 ml

3.2.4 Příprava sRNA knihoven

Detekce siRNA odvozených od *osm* transgenů byla uskutečněna na ERASMUS⁺ pracovní stáži na univerzitě Adama Mickiewicze pod vedením prof. Zofie Szweykowske-Kulinske a Dr. Andrzeje Pacaka.

3.2.4.1 Izolace genomické DNA ječmene

Genomická DNA ječmene byla izolována podle Edwards *et al.*, 1991.

3.2.4.2 Izolace celkové RNA

Celková RNA byla izolována podle protokolu uvedeném v kapitole 3.2.1.3. Přečištění RNA a její přepis byl proveden podle protokolů uvedených v kapitolách 3.2.1.4 a 3.2.1.5.

3.2.4.3 PCR analýza k potvrzení přítomnosti transgenu a jeho exprese

PCR analýza byla provedena podle protokolu uvedeném v kapitole 3.2.3.3. Primery použité pro detekci genu *osm* jsou uvedeny v Tab. 16.

Tab. 16 Názvy primerů, jejich sekvence a velikost ampliconu pro detekci genu *osm*.

Název primeru	Sekvence	Velikost ampliconu
OSM opt 2 F	5'-GCCCTGCCTTCATACGCTAT-3'	222 bp
OSM opt 2 R	5'-TACGGGCAGTTGTTCTCAC-3'	

3.2.4.4 Izolace celkové RNA obohacené o sRNA frakci

Izolace celkové RNA obohacené o sRNA frakci byla provedena podle protokolu uvedeném v kapitole 3.2.3.4.

3.2.4.5 Odsolení celkové RNA obohacené o sRNA frakci

Odsolení celkové RNA obohacené o sRNA frakci bylo provedeno podle protokolu uvedeném v kapitole 3.2.3.5.

3.2.4.6 Kontrola kvality celkové RNA obohacené o sRNA frakci

Kontrola kvality celkové RNA byla provedena podle protokolu uvedeném v kapitole 3.2.3.6.

3.2.4.7 Izolace sRNA

Vzorky celkové RNA obohacené o sRNA frakci byly elektroforeticky separovány. Byl připraven 15% denaturující gel (Tab. 17). Směs akrylamid/bisakrylamid, 10x TBE, močoviny a 4 ml DEPC H₂O byla míchána a zahřívána na 60 °C na magnetické míchače.

Tab. 17 Složení denaturujícího 15% gelu.

Chemikálie	Množství na 50 ml
40% akrylamid/bisakrylamid (19:1)	18,75 ml
10x TBE pH= 8	5 ml
Močovina	25 g
Doplněno DEPC H ₂ O do 50 ml	

Po rozpuštění močoviny byla směs doplněna do 50 ml DEPC H₂O a přefiltrována přes 0,45 µm celulosový filtr. Skla, oddělovače a jamkovací hřeben byly umyty detergentem a destilovanou vodou. Skla byla vyčištěna 70% ethanolem. Byla seskládána aparatura na PAGE. Směs byla promíchána a nalita mezi skla, byl přidán jamkovací hřeben. Po

polymerizaci byl gel připraven do elektroforetického tanku, byl odstraněn hřeben a do jedné jamky bylo nanášeno 5 μl LB II (Loading buffor II; Tab. 18). Elektroforéza bez vzorků se nechala běžet 30 min. při konstantních 300 V. Podle separace LB II se vyhodnotila kvalita gelu. Byly připraveny vzorky: k 10 μg RNA byla přidána DEPC H₂O do 10 μl . Bylo přidáno 10 μl LB II, promícháno, vzorky byla denaturovány 2 min. při 90 °C a ihned nanášeny na gel. Dále byly připraveny standarty. DNA standart 10 bp: ke 2 μl bylo přidáno 18 μl DEPC H₂O a 20 μl LB II. RNA standart 17 nt & 25 nt: k 1 μl 10 mM 17 nt RNA a 1 μl 10 mM 25 nt RNA bylo přidáno 8 μl DEPC H₂O a 10 μl LB II. Standarty byly denaturovány, stejně jako vzorky a ihned nanášeny na gel. Elektroforéza se vzorky probíhala 2,5 h při konstantních 300 V. Gel byl barven ve směsi 150 ml 0,5x TBE a 9 μl 10 000x SybrGold 10 min. Poté byl promyt ve 150 ml 0,5x TBE a RNA byla vizualizována pomocí transiluminátoru s modrým světlem. V rozmezí 17 nt a 25 nt byla RNA ze vzorků vyřezána a kousky gelu byly umístěny do 1,5 ml LoBind (Eppendorf) mikroskopické kumavky.

Tab. 18 Složení LB II pufru (Loading buffor II).

Chemikálie	Množství na 10 ml
95% Formamid	9,5 ml
0,5 M EDTA pH = 8	360 μl
10% SDS	25 μl
Xylene Cyanol	60 μl
Bromfenol Blue	60 μl

3.2.4.8 Eluce a přečištění sRNA z gelu

Kousky gelu v LoBind mikroskopických kumavkách byly promyty 700 μl 0,5x TBE a sRNA byla z gelu eluována 500 μl EBR pufru (Tab. 19). Vzorky byly ponechány v termobloku při 25°C a 450 rpm přes noc. Další den bylo přidáno 250 μl chloroformu, vzorky byly protřepány na třepačce, dále bylo přidáno 150 μl saturovaného fenolu pH= 5, vzorky byly znovu protřepány a centrifugovány 3 min. při 20 000 g a laboratorní teplotě. Vodná fáze byla dále

Tab. 19 Složení EBR pufru.

Chemikálie	Množství na 30 ml
1M octan hořečnatý	1,5 ml
1M octan amonný	15 ml
0,5 M EDTA	60 μl
10% SDS	300 μl
DEPC H ₂ O	12,6 ml

extrahována stejným objemem chloroformu, a vzorky byly znovu centrifugovány 3 min. při 20 000 g a laboratorní teplotě. Vodná fáze byla přenesena do čisté LoBind mikrozkušavky s 1,5 µl GlycoBlue a trojnásobným objemem 100% ethanolu. Směs byla ponechána 2 hod. při -20 °C. Po inkubaci byly vzorky centrifugovány 30 min. při 21 500 g a 4 °C. Pelet byl dvakrát promyt 100 µl 75% ethanolu a centrifugován 3 min. při 17 200 g a 4 °C. Pelet se nechal vyschnout 5 min. v otevřené mikrozkušavce a sRNA byla rozpuštěna v 5 µl DEPC H₂O.

3.2.4.9 Příprava sRNA knihoven

Pro přípravu sRNA knihoven byl využit Illumina TruSeq® Small RNA Library kit. Podle návodu dodaném s kitem byly naligovány adaptory na 3' a 5' konce sRNA, byla provedena reverzní transkripce a amplifikace vzniklé cDNA pomocí PCR (Tab. 20). Po amplifikaci všech vzorků byl připraven 7% nedenaturující gel (Tab. 21). Knihovny byly separovány spolu s HRL (High Resolution Ladder) a CRL (Custom Resolution Ladder) dodaných spolu s kitem. K použití byly připraveny: 1 µl HRL + 9 µl ultrapure water + 2 µl 6x DNA LD; 3 µl CRL + 14 µl ultrapure water + 3 µl 6x DNA LD. Ke vzorkům po PCR o objemu 25 µl bylo přidáno 5 µl 6x DNA LD. Vzorky byly separovány 2,5 hod. Poté byl gel vybrán ze skel a barven v roztoku 150 ml 0,5x TBE a 9 µl SybrGold 10 min. Následně byl promyt 0,5x TBE a vizualizován na transiluminátoru s modrým světlem. cDNA o velikosti mezi 145 bp a 170 bp byla vyřezána, umístěna do LoBind tub a eluována (viz 3.2.4.8). Pelet byl rozpuštěn ve 12 µl DEPC H₂O.

Tab. 20 Program PCR pro amplifikaci sRNA

Děj	Teplota [°C]	Čas [min.]	Počet cyklů
Úvodní denaturace	98	0:30	1x
Denaturace	98	0:10	
Anelace	60	0:30	15x
Elongace	72	0:15	
Finální elongace	72	10:00	1x
Inkubace	4	∞	

Tab. 21 Složení nedenaturujícího gelu k separaci sRNA knihoven.

Chemikálie	Množství na 50 ml
40% Akrylamid/bisakrylamid (19:1)	8,75 ml
10x TBE	5 ml
99,9% glycerol	0,5 ml
DEPC H ₂ O	do 50 ml

3.2.4.10 Kontrola kvality a kvantity knihoven

Kontrola kvality sRNA knihoven byla provedena na Agilent 2200 TapeStation. Byly připraveny loadovací špičky High Sensitivity D1000 ScreenTape. Byl připraven standart smícháním 2 μ l vzorkového pufru a 2 μ l High Sensitivity D1000 Ladder. Byly připraveny vzorky pro analýzu smícháním 2 μ l vzorku s 2 μ l vzorkového pufru. Vzorky byly protřepány na IKA třepačce při 2000 RPM po 1 min. Vzorky byly krátce stočeny a analyzovány.

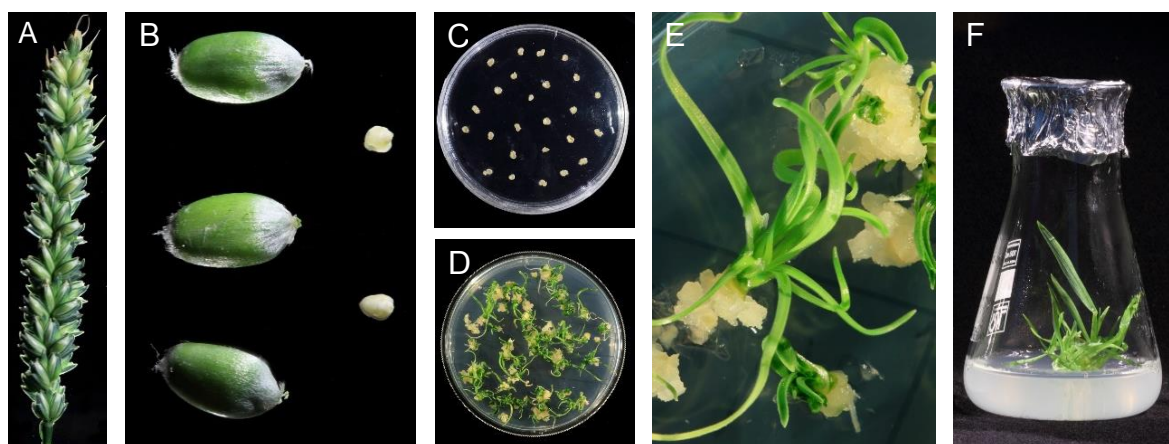
Kontrola kvantity knihoven byla provedena pomocí Qubit 4 fluorometru a Qubit 4 quantitation starter kitu v programu dsDNA High sensitivity Assay. Qubit reagent byl naředěn v poměru 1:200 s Qubit pufrem. Byly připraveny Qubit standarty smícháním 10 μ l standartu s 190 μ l naředěného reagentu. Byly připraveny vzorky smícháním 2 μ l vzorku s 198 μ l naředěného reagentu. Vzorky byly ponechány 2 min. v laboratorní teplotě, než bylo měřeno množství cDNA.

4. VÝSLEDKY

Výsledky prezentované v této práci jsou rozděleny do čtyř částí. První část se zabývá transformací pšenice geny odvozenými od WDV replikačního proteinu a relativní expresí transgenu. Ve druhé části je popsána transformace ječmene geny odvozenými od WDV replikačního proteinu, ve třetí části byla analyzována přítomnost siRNA odvozených od WDV transgenu u dihaploidních rostlin T_3 generace a ve čtvrté části je popsána příprava sRNA knihoven z homozygotních transgenních rostlin generace T_2 nesoucí gen *osm*.

4.1 TRANSFORMACE PŠENICE A URČENÍ RELATIVNÍ EXPRESE

Byla provedena transformace jarní pšenice cv. Fielder konstrukty pIPKb002::**K5** a pIPKb002::**J1** (Obr. 8). U rostlin T_0 generace byla potvrzena přítomnost transgenu. U rostlin T_1 generace byla potvrzena přítomnost transgenu a u vybraných rostlin T_1 generace nesoucích transgen byla provedena qRT-PCR ke zjištění relativní exprese transgenu.

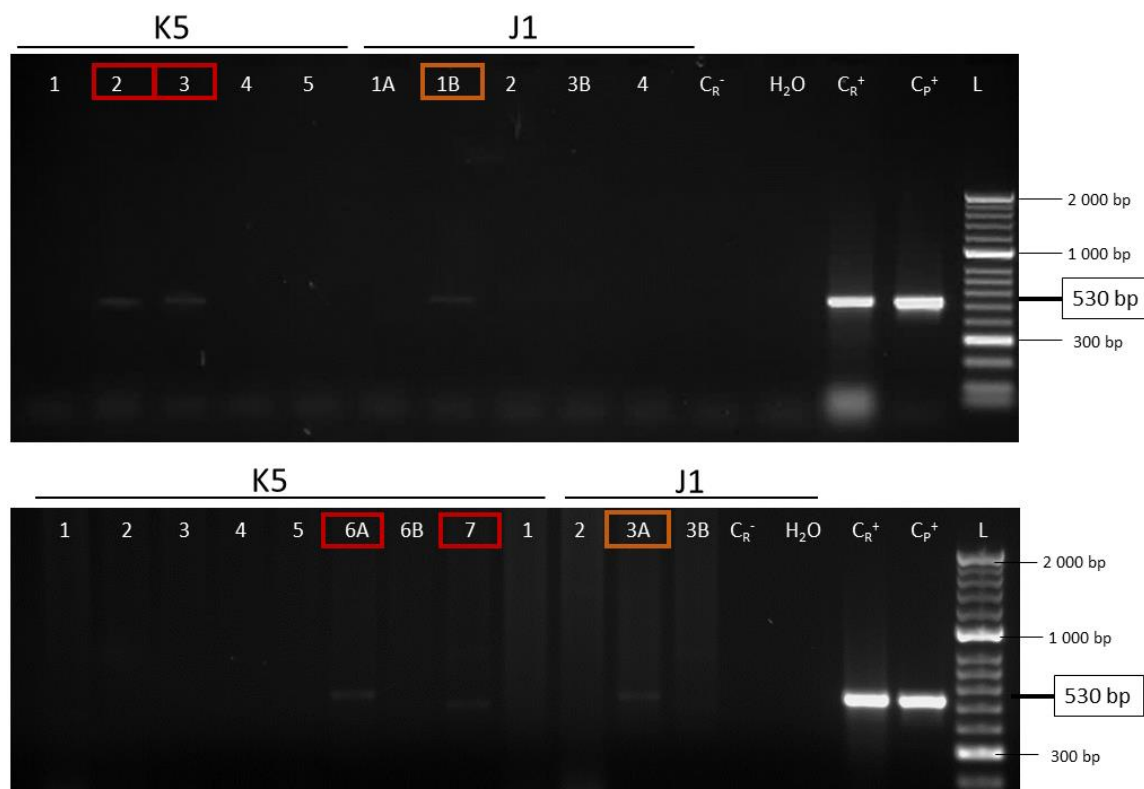


Obr. 8 Transformace nezralých embryí jarní pšenice cv. Fielder. (A) Klas jarní pšenice cv. Fielder. (B) Obilky a nezralá embrya. (C) Embrya na kokultivačním médiu. (D) Kalusy na selekčním médiu. (E) Detail regenerující rostliny na regeneračním médiu. (F) Rostlina na zakořeňujícím médiu.

4.1.1 Potvrzení přítomnosti transgenu v T_0 generaci

Genomická DNA regenerovaných rostlin byla izolována metodou CTAB. Přítomnost transgenů K5 i J1 byla ověřena pomocí PCR, produkty PCR byly separovány na 1% agarosovém gelu (Obr. 9) Byla vypočítána účinnost transformace (Tab. 22). Z 65 embryí transformovaných vektorem pIPKb002::K5 regenerovalo 13 rostlin z nichž 4 byly transgenní a efektivita transformace byla vypočítána na 6,15 %. Ze 70 embryí

transformovaných vektorem pIPKb002::J1 regenerovalo 8 rostlin z nichž 2 nesly transgen a efektivita transformace odpovídala 2,86 %.



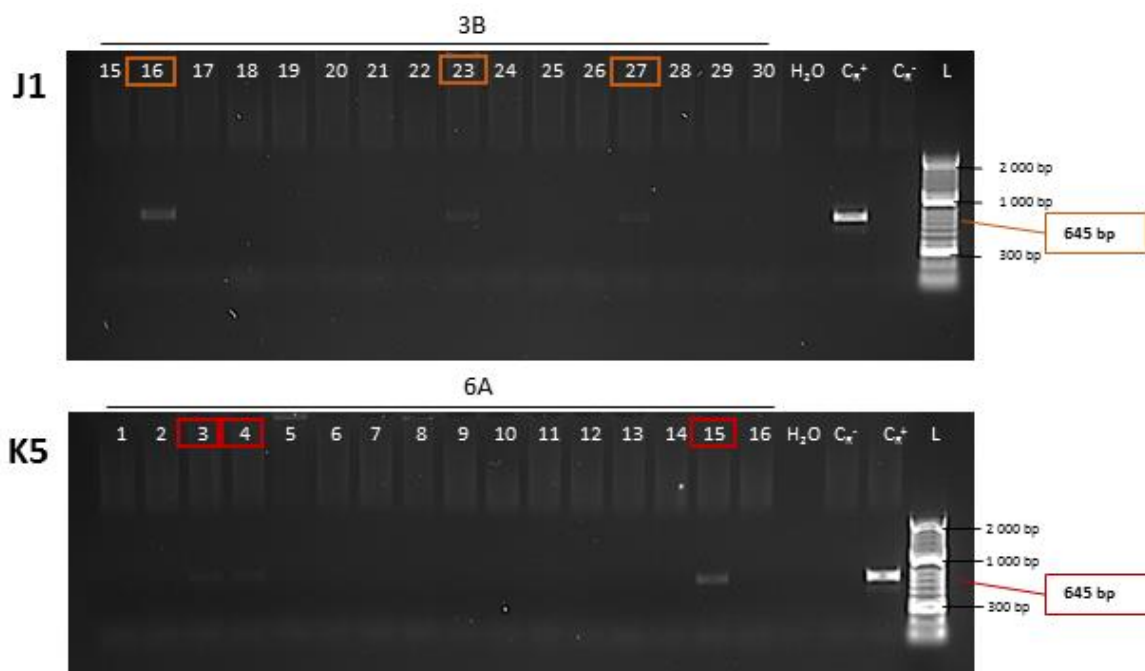
Obr. 9 PCR analýza přítomnosti WDVrep transgenu verze K5 a J1 u T₀ generace jarní pšenice cv. Fielder. Použité primery: WDVrep 215 F a WDVrep 119 R. Předpokládaná velikost ampliconu: 530 bp. C_R⁺: pozitivní kontrola rostlina; C_R⁻: negativní kontrola rostlina; L: HyperLadder 50 bp.

Tab. 22 Počet transformovaných a regenerovaných rostlin jarní pšenice cv. Fielder. Účinnost transformace byla počítána z celkového počtu transformovaných nezralých embryí.

Konstrukt	Číslo vektoru	Počet transformovaných embryí	Počet regenerovaných rostlin	PCR+ rostliny	Účinnost transformace [%]
pIPKb002::K5	142	65	13	4	6,15
pIPKb002::J1	143	70	8	2	2,86

4.1.2 Potvrzení přítomnosti transgenu v T₁ generaci

Genomická DNA rostlin T₁ generace byla izolována metodou CTAB. PCR analýzou byla detekována přítomnost transgenu u rostlin T₁ generace. Produkty PCR analýzy byly separovány na 1% agarosovém gelu (Obr. 10). U rostlin T₁ generace byl zhodnocen fenotyp (Obr. 11). Byla zaznamenána klíčivost, počet transgenních rostlin a segregáčnı poměr (Tab. 23).



Obr. 10 PCR analýza přítomnosti WDV transgenů verze K5 a J1 u T_1 generace rostlin jarní pšenice cv. Fielder. Použité primery: WDVrep 215 F a WDVrep 215 R. Předpokládaná velikost ampliconu: 645 bp. C_R^+ : pozitivní kontrola rostlina; C_R^- : negativní kontrola rostlina. L: HyperLadder 50 bp.



Obr. 11 Rostliny jarní pšenice cv. Fielder generace T_1 . (A) K5/6A (B) K5/7 (C) K5/3 (D) J1/3B (E) J1/1B (F) netransgenní jarní pšenice cv. Fielder. Rostliny jsou označeny: označení WDV transgenů/označení mateřské rostliny T_0 generace.

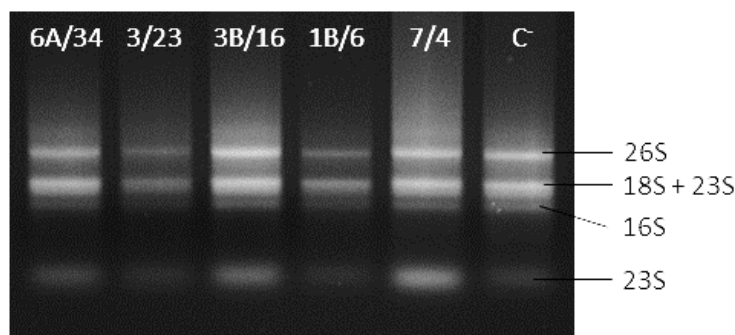
Tab. 23 Počet rostlin generace T₁ jarní pšenice cv. Fielder nesoucích WDV transgen. Rostliny jsou označeny: označení WDV transgenu/označení mateřské rostliny T₀ generace.

Označení rostlin	Počet vysazených rostlin	Počet analyzovaných rostlin	Klíčivost [%]	Počet transgenních rostlin	Počet transgenních rostlin [%]	Segregační poměr (pozitivní: negativní)
K5/6A	60	42	70	6	14,29	1:7
K5/7	15	12	80	1	8,33	1:12
K5/3	25	22	88	1	4,54	1:22
J1/3B	30	30	100	3	10,00	1:10
J1/1B	60	60	100	2	3,33	1:30

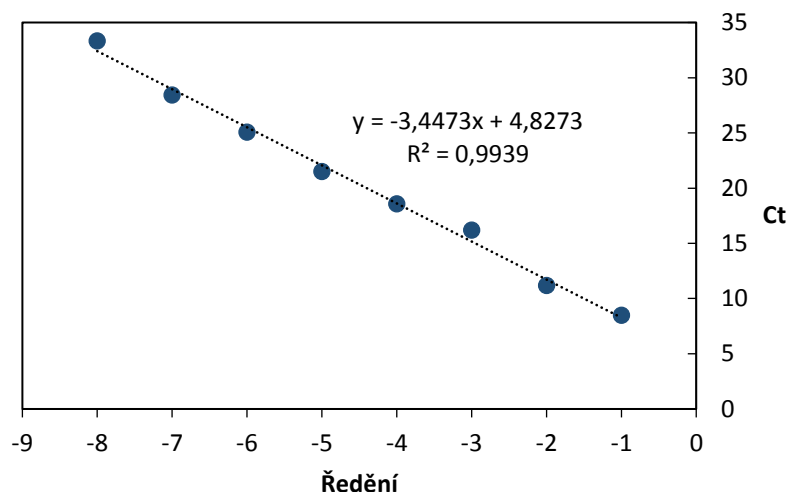
Z celkového počtu 166 analyzovaných rostlin jich 13 neslo WDV transgen. Klíčivost byla nejvyšší u potomstva rostlin 3B a 1B nesoucích J1 verzi WDVrep transgenu. Nejnižší klíčivost byla zaznamenána u potomstva 6A. Nejvyšší procento transgenních rostlin bylo detekováno v potomstvu 6A. Nejnižší procento transgenních rostlin bylo identifikováno mezi potomstvem rostliny 1B. Potomstvo rostliny 6A mělo segregační poměr 1:7, potomstvo rostliny 7 mělo segregační poměr 1:12, potomstvo rostliny 3 mělo segregační poměr 1:22, potomstvo 3B mělo segregační poměr 1:10 a u potomstva rostliny 1B byl zaznamenán segregační poměr 1:30. Fenotyp rostlin T₁ generace odpovídal fenotypu netransgenní kontroly. Byl zaznamenán opožděný vývoj u transgenních rostlin s porovnáním s kontrolou. Zatímco u kontrolní rostliny měly klasy již mimo pochvu, transgenní rostlině 6A teprve začaly vylézat a zbylé linie měly pochvy stále zavřené.

4.1.3 Určení relativní exprese transgenu

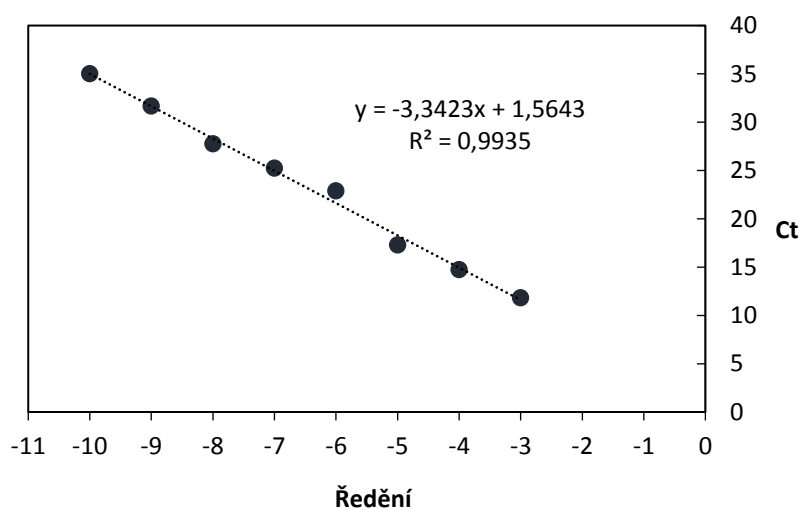
Byla izolována a přečištěna celková RNA. Kvalita RNA byla zkontrolována na agarosovém gelu (Obr. 12). Celková RNA byla přepsána do cDNA. Pomocí qRT-PCR byly připraveny kalibrační křivky pro TEF1 (Obr. 13) a WDVrep (Obr. 14) geny k určení efektivity amplifikace.



Obr. 12 Celková RNA izolovaná z transgenních rostlin jarní pšenice cv. Fielder nesoucí WDV transgen. Označení rostlin: číslo mateřské rostliny T₀ generace/číslo vysazené rostliny T₁ generace. C: netransgenní jarní pšenice cv. Fielder. 26S a 18S: fragmenty cytoplazmatických ribozomů, 23S a 16S: fragmenty chloroplastových ribozomů.



Obr. 13 Standartní křivka amplifikace TEF1 genu. Použité primery: EF1 F a EF1 R. Ct: číslo cyklu ve kterém fluorescence překročí prahovou hodnotu. Ředění: desítkové ředění. Sklon křivky: -3,4473; Korelační koeficient R: 0,9939.



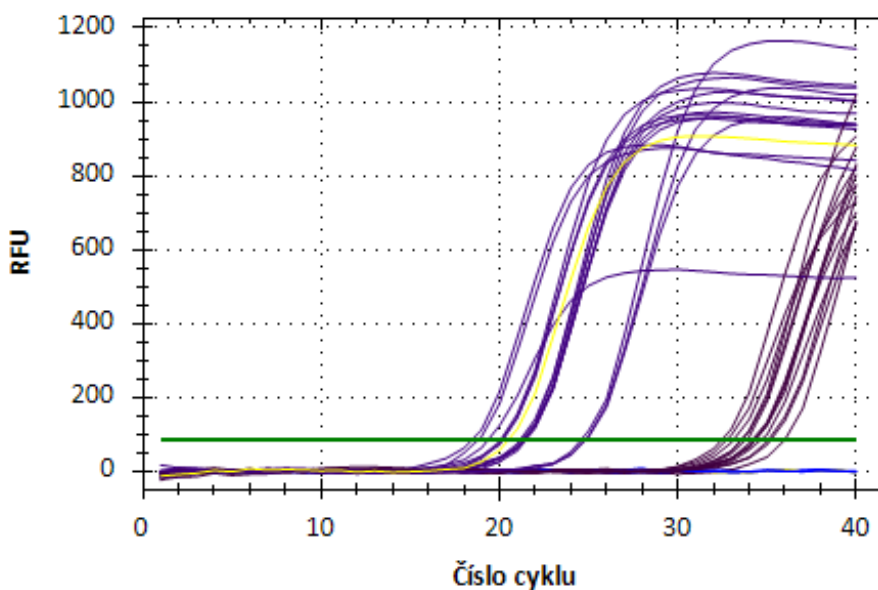
Obr. 14 Standartní křivka amplifikace WDVrep genu. Použité primery: WDV RT F a WDV RT R. Ct: číslo cyklu ve kterém fluorescence překročí prahovou hodnotu. Ředění: desítkové ředění. Sklon: -3,3423; Korelační koeficient R: 0,9935.

U genu TEF1 byl sklon křivky -3,4473 a korelační koeficient R 0,9939. U genu WDVrep byl sklon křivky -3,3423 a korelační koeficient R 0,9935. Programem Bio-Rad Maestro CFX byla vypočítána efektivita amplifikace na 99,229 % u genu WDVrep a 95,02% u genu TEF1 (Tab. 24).

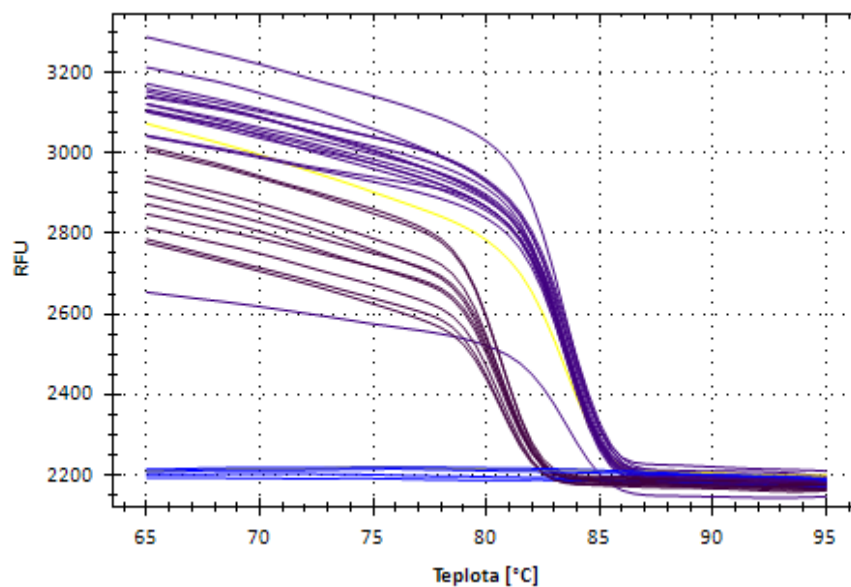
Tab. 24 Efektivita amplifikace WDVrep a TEF1 genů.

Amplifikovaný gen	Efektivita amplifikace [%]
WDVrep	99,229 %
TEF1	95,02 %

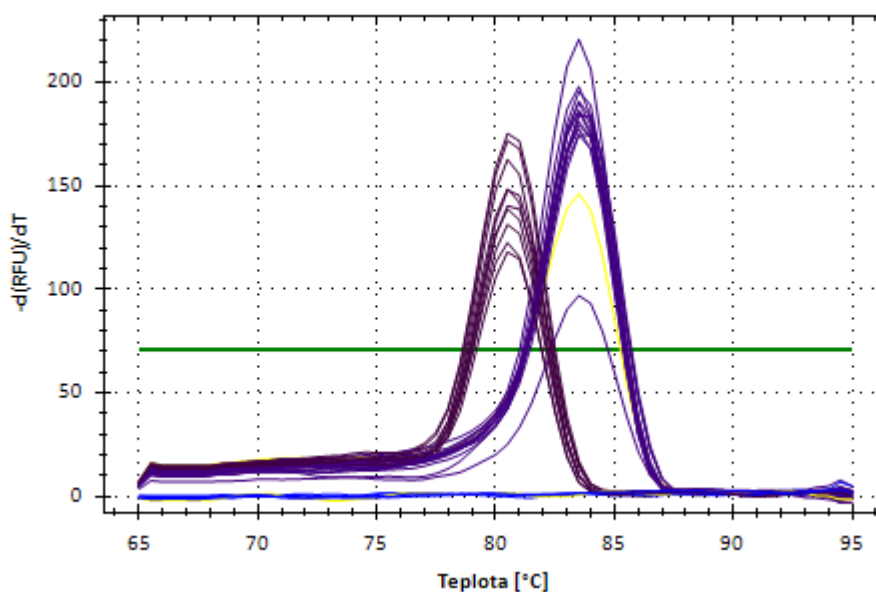
U vybraných linií jarní pšenice cv. Fielder nesoucích WDV transgen byla určena relativní exprese WDV transgenů ku provoznímu genu TEF1 (Tab. 26). Pro každou sadu primerů byly připraveny tři repliky vzorku, jeden vzorek netransgenní jarní pšenice cv. Fielder a dva vzorky bez templátu (H₂O). Výsledky byly zpracovány programem Bio-Rad CFX Maestro (Obr. 15; Obr. 16; Obr. 17). Byly vypočítány průměry Ct (číslo cyklu ve kterém fluorescence překročí prahovou hodnotu všech opakování (Tab. 25)). Produkty PCR byly separovány na 1,5% agarosovém gelu (Obr. 18) pro vizuální kontrolu produktu. Velikosti produktů qRT-PCR odpovídaly předpokládané velikosti určené *in silico* a u žádného ze vzorků nebyly přítomny kontaminace.



Obr. 15 Křivka amplifikace vzorků. Světle fialová: exprese TEF1 genu; tmavě fialová: exprese WDVrep transgenů; žlutá: negativní kontroly; modrá: H₂O. RFU: relativní jednotky fluorescence. Číslo cyklu (Ct): cyklus, ve kterém hodnota fluorescence překročí prahovou hodnotu. Zpracováno v programu Bio-Rad CFX Maestro.



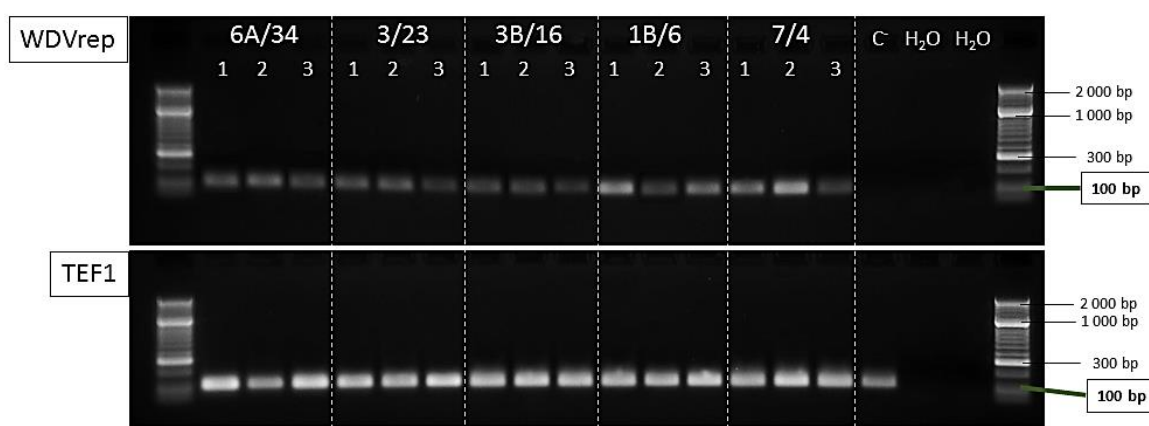
Obr. 16 Tavní křivka vzorků. Světle fialová: exprese TEF1 genu; tmavě fialová: exprese WDVrep transgenů; žlutá: negativní kontroly; modrá: H₂O. RFU: relativní jednotky fluorescence. Číslo cyklu: Ct, cyklus, ve kterém hodnota fluorescence překročí prahovou hodnotu. Zpracováno v programu Bio-Rad CFX Maestro.



Obr. 17 Křivka teploty tání vzorků. Světle fialová: exprese TEF1 genu; tmavě fialová: exprese WDVrep transgenů; žlutá: negativní kontroly; modrá: H₂O. $-d(RFU)/dT$: změna relativní fluorescence/změna teploty. Zpracováno v programu Bio-Rad CFX Maestro.

Tab. 25 Průměry naměřených Ct hodnot všech opakování. Každý vzorek byl analyzován ve třech replikách pro každou sadu primerů. WDV: vzorky s WDV RT F a WDV RT R primery, TEF1: vzorky s EF1 F a EF1 R primery.

Vzorek	Průměr Ct	
	WDV	TEF1
6A/34	35,39	21,33
3/23	33,72	20,09
3B/16	33,99	21,25
1B/6	33,44	18,83
7/4	33,52	24,68
C⁻ TEF1	0	20,33
C⁻ WDV	0	0
H₂O	0	0



Obr. 18 Analýza qRT-PCR v reálném čase. Nahoře: mix s primery WDVrep RT F a WDVrep RT R. Předpokládaná velikost ampliconu: 100 bp. Dole: mix s primery EF1 F a EF1 R. Čísla značí počet technických opakování jednoho vzorku. L: HyperLadder 50bp. C⁻: netransgení jarní pšenice cv. Fielder.

Tab. 26 Relativní exprese WDVrep transgenů vůči TEF1 provoznímu genu.

Rostlina	Relativní exprese transgenů [%]
6A/34	76
3/23	77
3B/16	76
1B/6	78
7/4	72

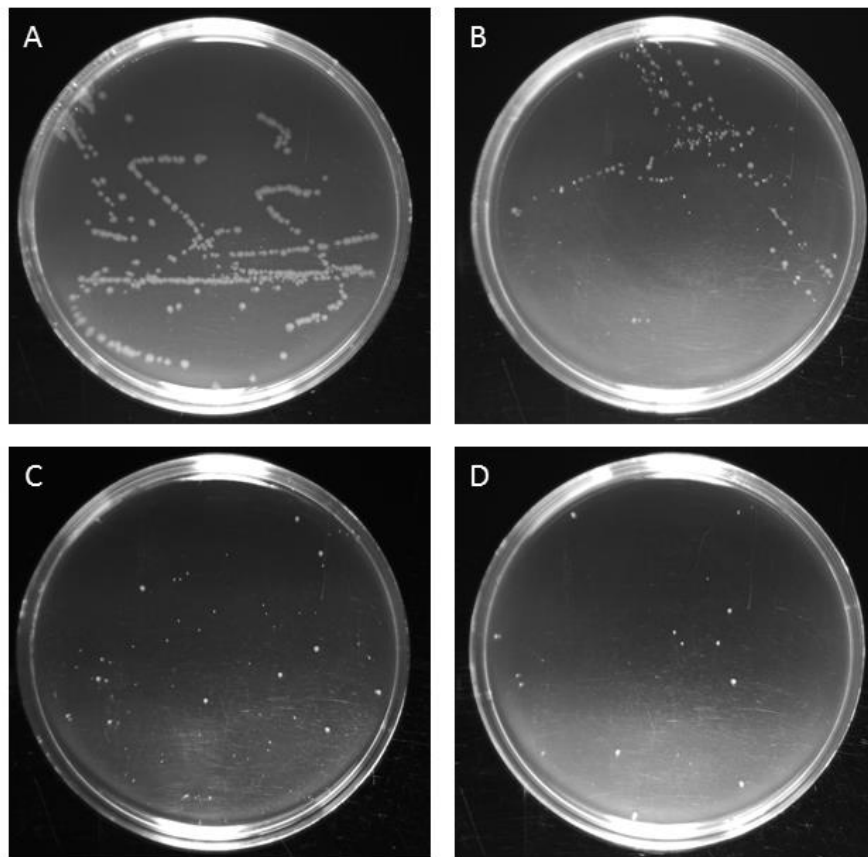
Pomocí qRT-PCR byla stanovena relativní exprese transgenů vůči expresi TEF1. Relativní exprese rostliny 6A/34 nesoucí K5 verzi WDVrep byla stanovena na 76% exprese TEF1, u rostliny 3/23 nesoucí K5 verzi WDVrep byla relativní exprese stanovena na 77%, u rostliny 3B/16 nesoucí J1 verzi WDVrep byla exprese stanovena na 76%, u rostliny 1B/6 nesoucí J1 verzi WDVrep byla exprese stanovena na 78% a u rostliny 7/4 nesoucí K5 verzi WDVrep byla exprese stanovena na 72% .

4.2 OVĚŘENÍ VEKTORŮ A TRANSFORMACE JEČMENE

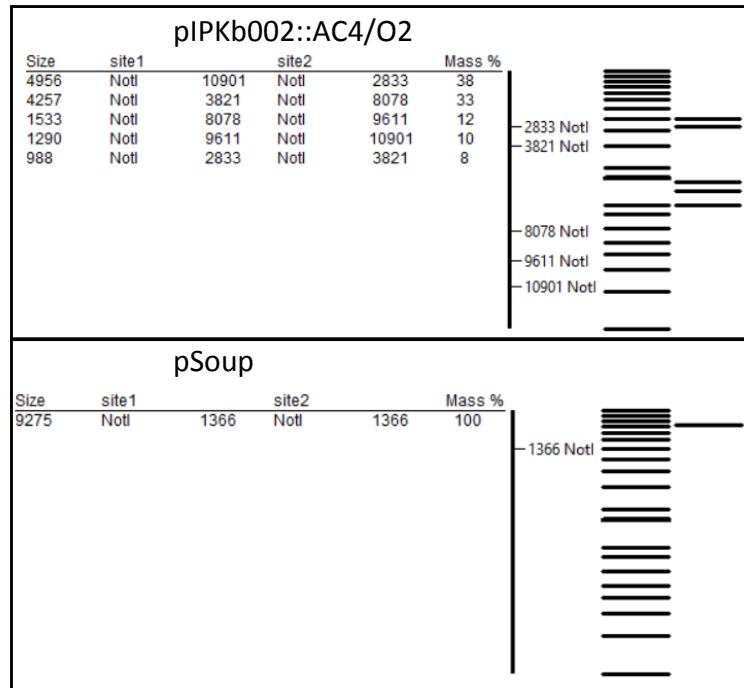
Byla ověřena sekvence vektorů a vneseny do *A. tumefaciens*. Byla provedena transformace nezralých embryí jarního ječmene cv. Golden Promise konstrukty pIPKb002::AC4 a pIPKb002::O2. U rostlin T₀ generace byla potvrzena přítomnost transgenu.

4.2.1 Ověření sekvence vektorů

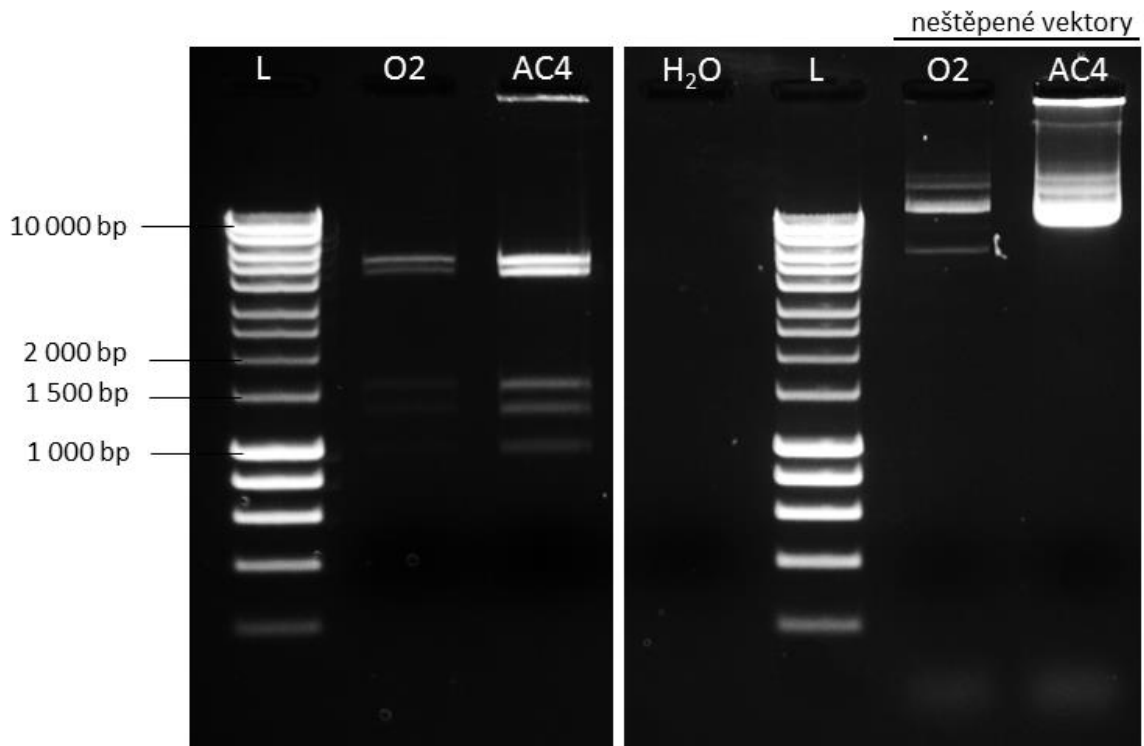
Transgenní bakterie *Escherichia coli* DH5 α byly selektovány na agarovém médiu s antibiotiky (Obr. 19; A,B). Vybrané kolonie byly kultivovány a pDNA byla izolována. Byla provedena restriční analýza. Produkty restriční analýzy byly separovány na 1% agarosovém gelu (Obr. 21). Buňky *A. tumefaciens* AGL-1 byly transformovány zájmovými vektory a pomocným vektorem pSoup a selektovány na médiu s antibiotiky (Obr. 19; C,D). Vybrané kolonie byly kultivovány a pDNA byla izolována. Byla provedena restriční analýza. Produkty restriční analýzy byly separovány na 1% agarosovém gelu (Obr. 22). Velikost fragmentů po restriční analýze pDNA z *E. coli* i *A. tumefaciens* se shodovala se velikostí fragmentů stanovenou *in silico* (Obr. 20).



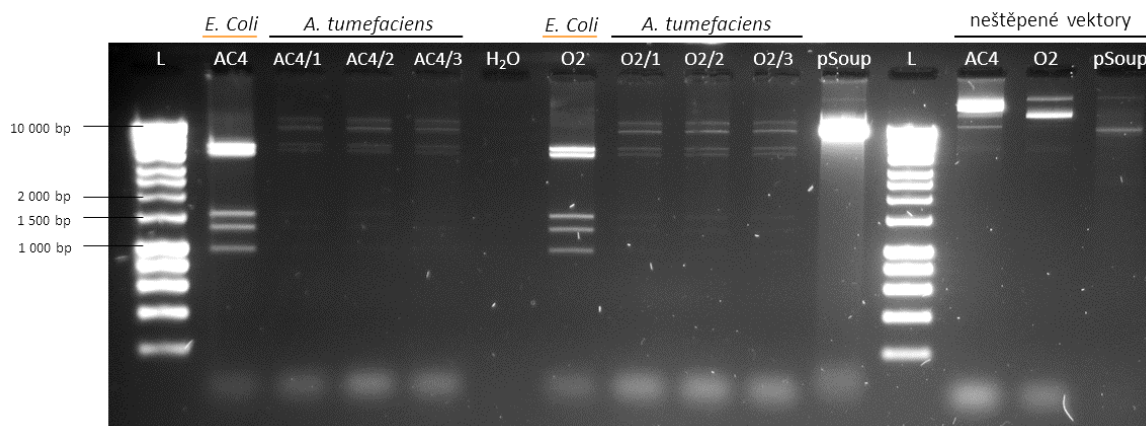
Obr. 19 Agarové médium s antibiotiky a transgenními bakteriálními koloniemi. (A) *Escherichia coli* DH5 α nesoucí pIPKb002::AC4; (B) *Escherichia coli* DH5 α nesoucí pIPKb002::O2; (C) *Agrobacterium tumefaciens* AGL-1 nesoucí pIPKb002::AC4 a pSoup; (D) *Agrobacterium tumefaciens* AGL-1 nesoucí pIPKb002::O2 a pSoup.



Obr. 20 Předpokládaná velikost fragmentů po restriční analýze. Fragmenty vektorů pIPKb002 nesoucí AC4 nebo O2 gen a pomocného vektoru pSoup byly odvozeny *in silico* v programu Ape.



Obr. 21 Restriční analýza vektorů pIPKb002 nesoucích AC4 nebo O2 gen a izolovaných z *Escherichia coli* DH5 α . Očekávané fragmenty: 4956 bp, 4257 bp, 1533 bp, 1290 bp, 988 bp. L: HyperLadder 1kb.



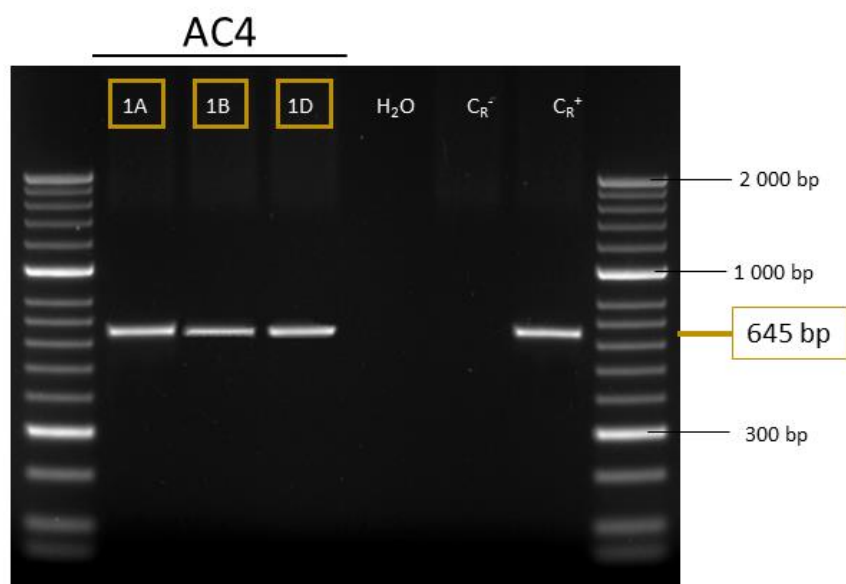
Obr. 22 Restrikční analýza vektorů pIPKb002 nesoucí AC4 nebo O2 gen a vektoru pSoup izolovaných z *Agrobacterium tumefaciens* AGL-1 (AC4/1-3 a O2/1-3 a pSoup) a *Escherichia coli* DH5 α (AC4 a O2). Očekávané fragmenty: 4956 bp, 4257 bp, 1533 bp, 1290 bp, 988bp a linearizovaný vektor pSoup o velikosti 9275 bp. Vzorčky jsou popsány: označení vektorů/označení kolonie.

4.2.2 Potvrzení přítomnosti transgenů v T₀ generaci

Byla provedena transformace ječmene. Genomická DNA rostlin T₁ generace byla izolována REDEExtract-N-Amp Tissue PC kitem. PCR analýzou byla detekována přítomnost transgenů u rostlin T₁ generace. Produkty PCR analýzy byly separovány na 1% agarosovém gelu (Obr. 23; Obr. 24). Velikost PCR produktů se shodovala s předpokládanou velikostí stanovenou *in silico*. Byla potvrzena přítomnost transgenů v T₀ generaci ječmene jarního cv. Golden Promise. Z 95 nezralých embryí transformovaných pIPKb002::O2 regenerovalo 95 rostlin z nichž 6 neslo WDV transgen. Účinnost transformace odpovídala 5,36 %. Z 113 nezralých embryí transformovaných vektorem pIPKb002::AC4 regenerovalo 8 rostlin z nichž 3 nesly WDV transgen. Účinnost transformace odpovídala 2,66 %.



Obr. 23 PCR analýza rostlin generace T₀ transformovaných pIPKb002::O2. Použité primery: WDVrep 215 F a WDVrep 215 R. Předpokládaná velikost ampliconu 645 bp. C_R⁺: rostlina nesoucí WDV transgen, C_R⁻: netransgenní rostlina ječmene jarního cv. Golden Promise. L: HyperLadder 50 bp.



Obr. 24 PCR analýza rostlin transformovaných pIPKb002::AC4. Použité primery: WDVrep 215 F a WDVrep 215 R. Předpokládaná velikost ampliconu 645 bp. C_R⁺: rostlina nesoucí WDV transgen, C_R⁻: netransgenní rostlina ječmene jarního cv. Golden Promise. L: HyperLadder 50 bp.

Tab. 22 Počet transformovaných a regenerovaných rostlin jarního ječmene cv. Golden Promise. Účinnost transformace byla počítána z celkového počtu transformovaných embryí.

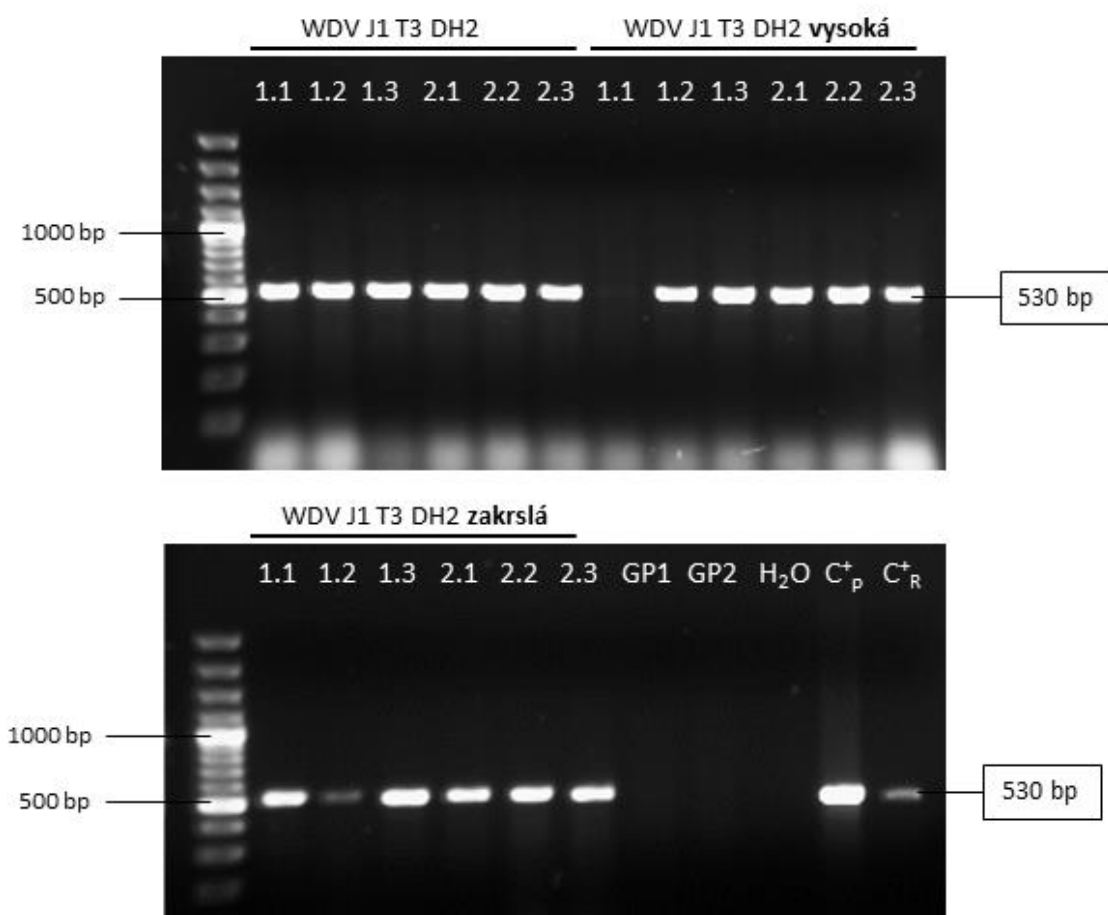
Konstrukt	Číslo vektoru	Počet transformovaných embryí	Počet regenerovaných rostlin	PCR+ rostliny	Účinnost transformace [%]
pIPKb002::O2	243	122	95	6	5,36
pIPKb002::AC4	244	113	8	3	2,66

4.3 DETEKCE siRNA ODVOZENÝCH OD WDV TRANSGENU

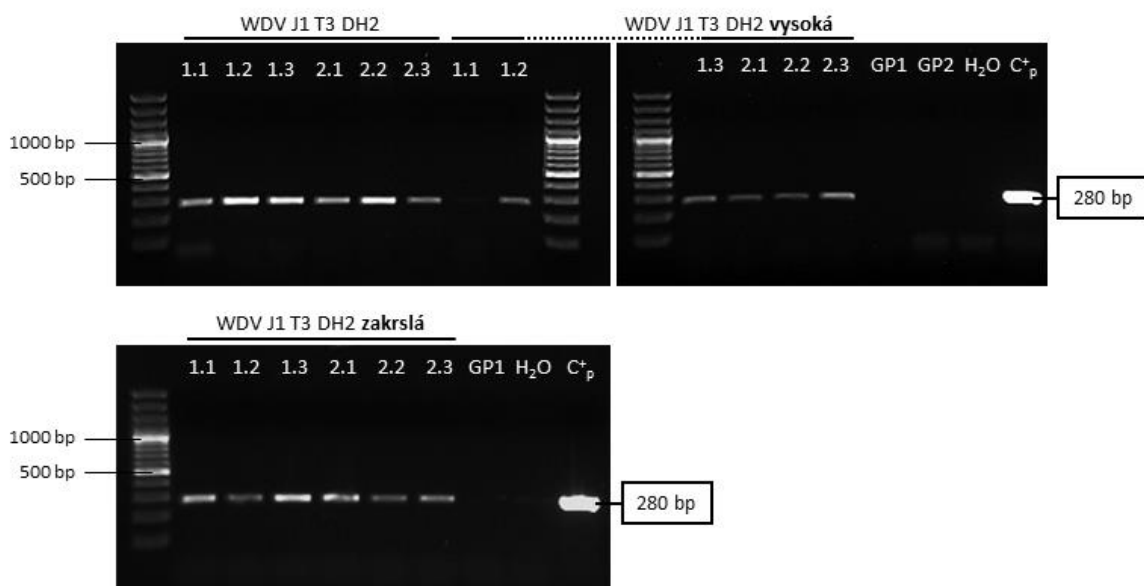
Krátké interferující RNA (siRNA) odvozené od transgenu byly detekovány v transgenním dihaploidním (DH₂) ječmeni jarním cv. Golden Promise generace T₃. Vloženým transgenem byla J1 verze WDVrep genu. Analyzované rostliny měly dva fenotypy: zakrslý a vysoký.

4.3.1 Potvrzení přítomnosti transgenu na úrovni DNA

Genomická DNA ječmene byla izolována REDEExtract-N-Amp Tissue PC kitem. Přítomnost transgenu a *hpt* selekčního genu na úrovni DNA byla analyzována pomocí PCR u každé rostliny. Produkty PCR byly separovány na 1% agarosovém gelu (Obr. 25 a Obr. 26). Byla detekována přítomnost WDV transgenu i selekčního genu *hpt*. Velikost PCR produktů se shodovala s předpokládanou velikostí stanovenou *in silico*. Transgen i selekční gen byly detekovány ve všech rostlinách kromě rostliny 1.1. Rostlina s označením 1.1 byla z testování vyřazena.



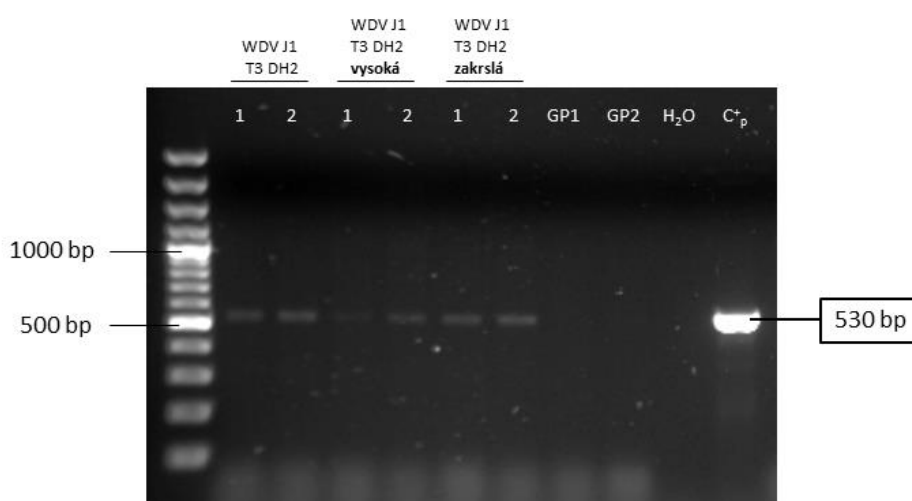
Obr. 25 PCR analýza přítomnosti WDVrep transgenu verze J1 v DNA transgenních T₃DH₂ rostlinách ječmene jarního cv. Golden Promise. Použité primery: WDVrep 215 F a WDVrep 119 R. Očekávaná velikost amplikonu: 530 bp. C_R⁺: Rostlina nesoucí J1 transgen, C_P⁺: plazmid nesoucí J1 DNA, GP1/2 netransgenní rostliny jarního ječmene cv. Golden Promise. L: Gene Ruler 100 bp plus.



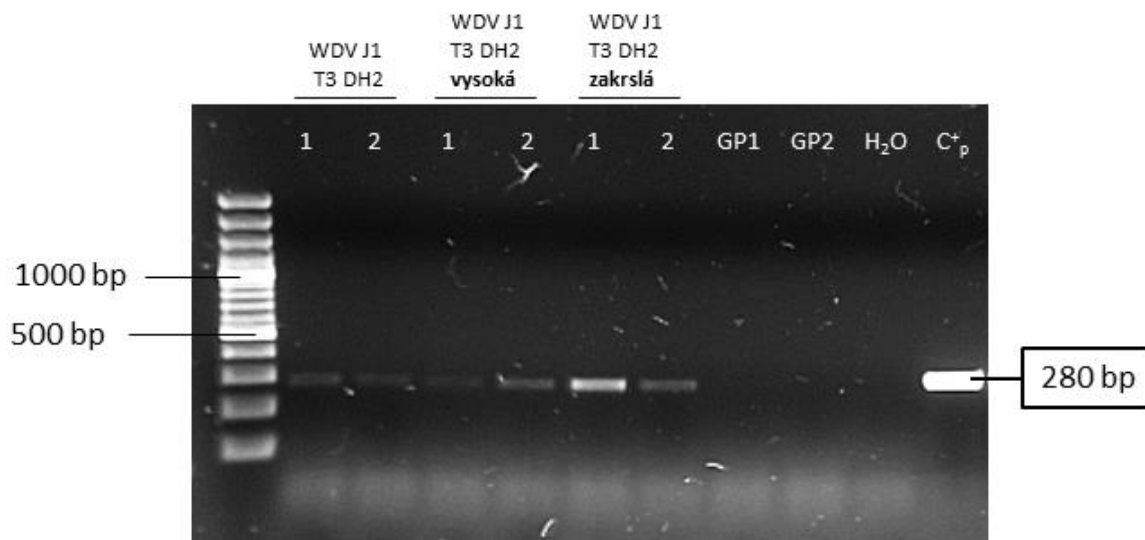
Obr. 26 PCR analýza přítomnosti *hpt* selekčního genu v DNA transgenních T₃DH₂ rostlin ječmene jarního cv. Golden Promise. Použité primery: HYG F a HYG R. Očekávaná velikost amplikonu: 280 bp. C_R⁺: Rostlina nesoucí J1 transgen, C_P⁺: plazmid nesoucí *hpt* gen, GP1/2 netransgenní rostliny jarního ječmene cv. Golden Promise. L: Gene Ruler 100 bp plus.

4.3.2 Potvrzení přítomnosti transgenu na úrovni RNA

RNA byla izolována, přečištěna a přepsána do cDNA. Přítomnost transgenu a *hpt* selekčního genu na úrovni RNA byla analyzována pomocí PCR u každé biologické repliky. Produkty PCR byly separovány na 1% agarosovém gelu (Obr. 27 a Obr. 28). Velikost PCR produktů se shodovala s předpokládanou velikostí stanovenou *in silico*. Byla potvrzena přítomnost WDV transgenu i selekčního genu *hpt*.



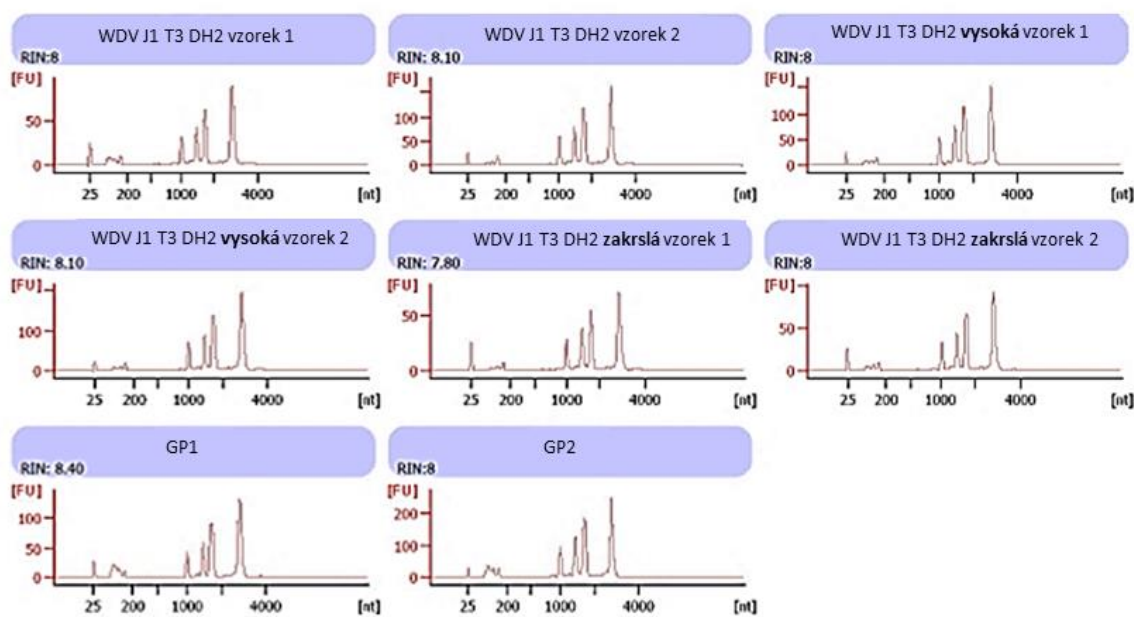
Obr. 27 PCR analýza přítomnosti WDVrep transgenu verze J1 v RNA transgenních T₃DH₂ rostlinách ječmene jarního cv. Golden Promise. Použité primery: WDVrep 215 F a WDVrep 119 R. Očekávaná velikost amplikonu: 530 bp. C_P⁺: plazmid nesoucí J1 DNA, GP1/2 netransgenní rostliny jarního ječmene cv. Golden Promise. L: Gene Ruler 100 bp plus.



Obr. 28 PCR analýza přítomnosti *hpt* selekčního genu v RNA transgenních T₃DH₂ rostlinách ječmene jarního cv. Golden Promise. Použité primery: HYG F a HYG R. Očekávaná velikost amplikonu: 280 bp. C_p⁺: plazmid nesoucí J1 DNA, GP1/2 netransgenní rostliny jarního ječmene cv. Golden Promise. L: Gene Ruler 100 bp plus.

4.3.3 Kontrola kvality celkové RNA obohacené o sRNA frakci

Z transgenních dihaploidních rostlin ječmene jarního cv. Golden Promise generace T₃ nesoucích WDVrep transgen byla izolována celková RNA obohacená o sRNA frakci. Odsolená RNA byla měřena bioanalyzérem Agilent 2100 (Obr. 29; Obr. 30). Kvalita byla hodnocena RIN číslem (Obr. 29). Minimální potřebné RIN číslo pro Northern blotting bylo 7,5.



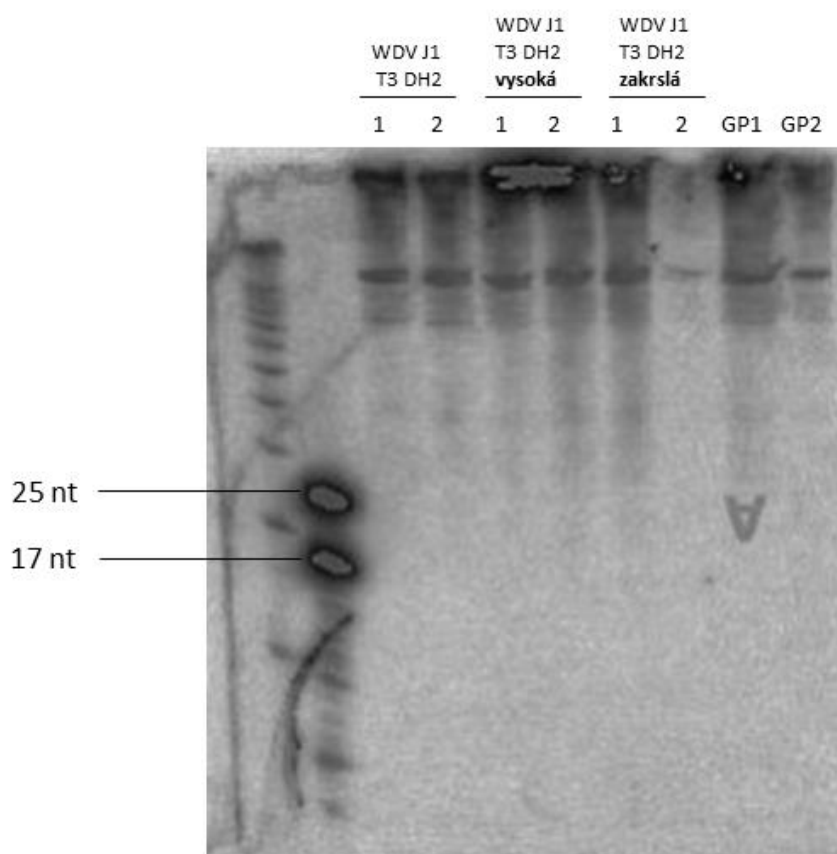
Obr. 29 Výsledky bioanalýzy RNA z rostlin generace T₃DH₂ nesoucích J1 verzi WDVrep transgenu. Bioanalýza byla provedena pomocí Agilent 2100. RIN čísla jsou uvedena u každého vzorku. GP1/2: divoký typ jarního ječmene cv. Golden Promise, FU: jednotky fluorescence.

RIN číslo se pohybovalo mezi 7,8 až 8,4. Z transgenních rostlin ječmene jarního generace T₃DH₂ nesoucích J1 transgen byla úspěšně izolována RNA obohacená o sRNA frakci o vyhovující kvalitě pro Northern blotting.

4.3.4 Northern Blot

Nick-translací J1 ampliconu byly připraveny radioaktivní próby. Analyzovanými vzorky byla odsolená celková RNA izolována z T₃DH₂ rostlin nesoucích J1 transgen. Byl proveden Northern blotting (Obr. 30).

Vazba prób na siRNA byla očekávána mezi 25 a 17 nt. Ani po třídní expozici nebyl v těchto místech detekován žádný signál ani u jednoho vzorku. Krátké interferující RNA odvozené od transgenu nebyly detekovány.



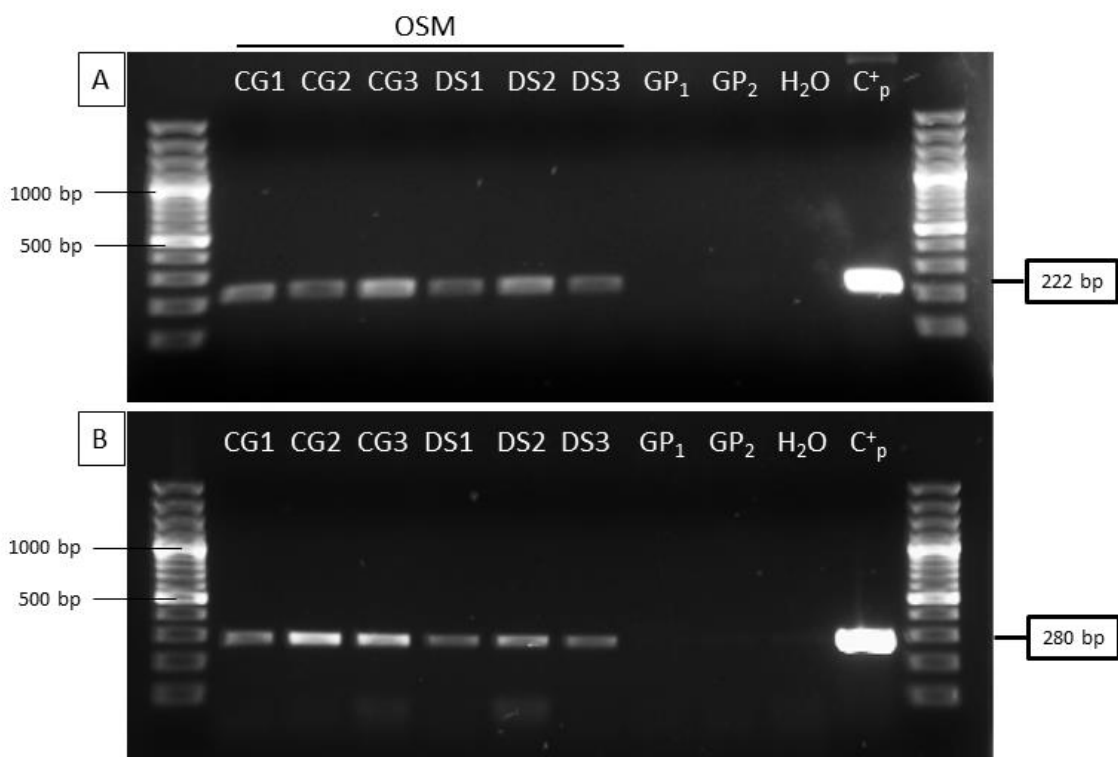
Obr. 30 Northern Blot. Nylonová membrána s navázanou RNA z transgenních dihaploidních rostlin ječmene jarního cv. Golden Promise nesoucích J1 transgen a netransgenního ječmene jarního cv. Golden Promise (GP1/2). Na RNA jsou navázány radioaktivní próby. Expozice membrány na destičku trvala 3 dny. siRNA byly očekávány mezi radioaktivně značenou RNA o velikosti 25 a 17 nt. L: 10 bp ladder.

4.4 PŘÍPRAVA sRNA KNIHOVEN

Knihovny sRNA byly připraveny z dihaploidních rostlin (DH₁) jarního ječmene cv. Golden Promise generace T₂ nesoucích transgen *osm*. Rostliny byly rozděleny na kontrolní skupinu (CG) a skupinu vystavenou stresu ze sucha (DS). V každé skupině byly tři květináče se třemi rostlinami jarního ječmene cv. Golden Promise nesoucí transgen *osm* a tři květináče se třemi rostlinami netransgenního jarního ječmene cv. Golden Promise. Všechny rostliny v jednom květináči byly označeny jako jedna biologická replika.

4.4.1 Potvrzení přítomnosti transgenu na úrovni DNA

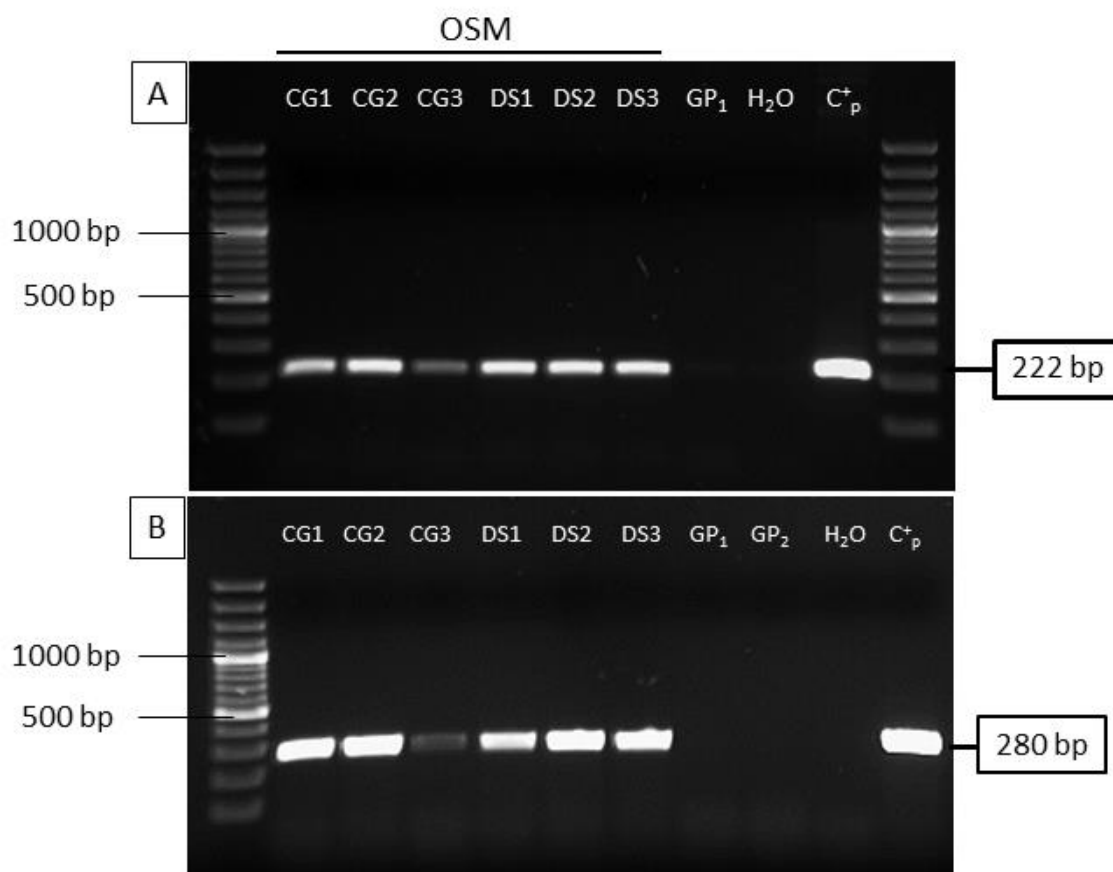
Genomická DNA ječmene byla izolována REDEExtract-N-Amp Tissue PC kitem. Přítomnost transgenu na úrovni DNA byla analyzována pomocí PCR u každé biologické repliky. Produkty PCR byly separovány na 1% agarosovém gelu (Obr. 31). Byla detekována přítomnost *osm* transgenu i selekčního genu *hpt*. Velikost PCR produktů se shodovala s předpokládanou velikostí stanovenou *in silico*.



Obr. 31 PCR analýza DNA transgenních rostlin jarního ječmene generace T₂DH₁ nesoucí transgen *osm*. PCR program: touch-down. **(A)** Potvrzení přítomnosti *osm* transgenu pomocí primerů OSM opt 2 F a OSM opt 2 R. Očekávaná velikost amplikonu: 222 bp. **(B)** Potvrzení přítomnosti selekčního genu *hpt* pomocí primerů HYG F a HYG R. Očekávaná velikost amplikonu: 280 bp. CG1-3: kontrolní skupina, DS1-3 skupina vystavená stresu ze sucha. GP_{A/B}: Golden Promise, C⁺_p: Pozitivní kontrola: vektor pBract2014::*OSM*.

4.4.2 Potvrzení přítomnosti transgenu na úrovni RNA

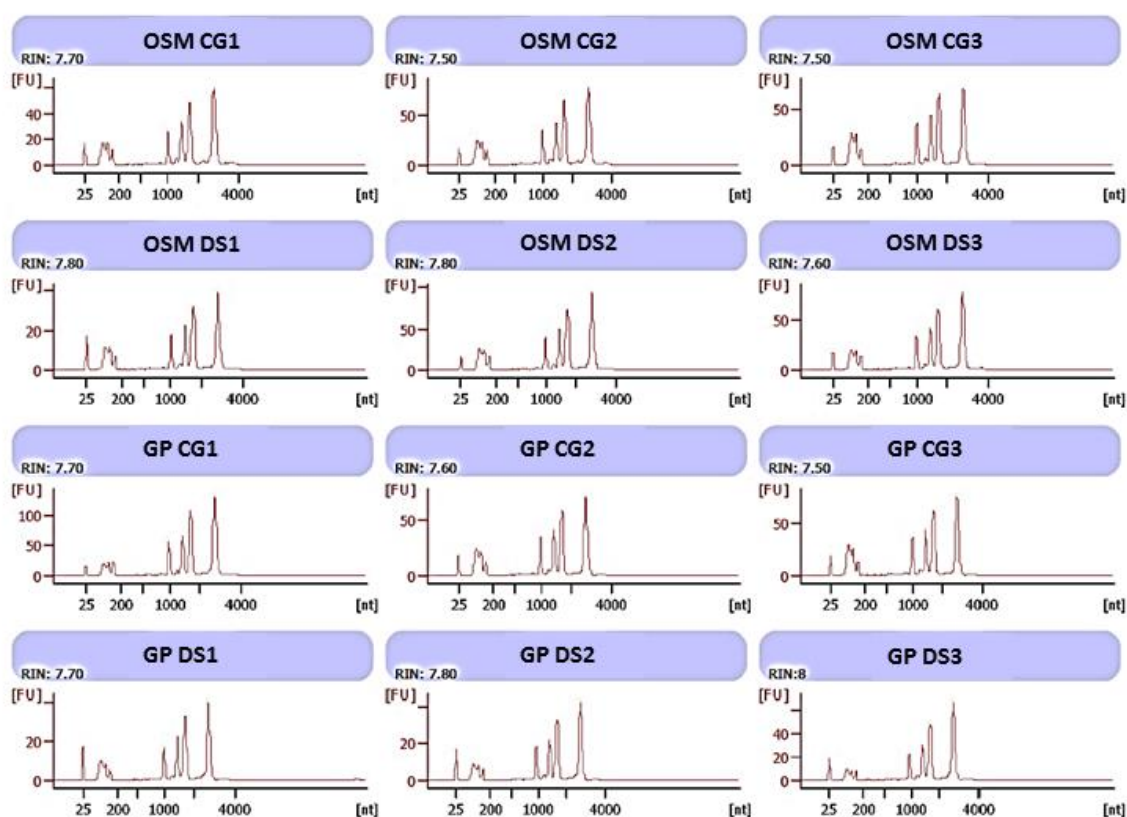
RNA byla izolována, přečištěna a přepsána do cDNA. Přítomnost transgenu na úrovni RNA byla analyzována pomocí PCR u každé biologické repliky. Produkty PCR byly separovány na 1% agarosovém gelu (Obr. 32). Velikost PCR produktů se shodovala s předpokládanou velikostí stanovenou *in silico*. Byla potvrzena přítomnost *osm* transgenu i selekčního genu *hpt*.



Obr. 32 PCR analýza RNA rostlin jarního ječmene cv. Golden Promise generace T₂DH₁ nesoucích transgen *osm*. PCR program: touch-down. **(A)** potvrzení přítomnosti *osm* transgenu pomocí primerů OSM opt 2 F a OSM opt 2 R. Očekávaná velikost ampliconu: 222 bp. **(B)** Potvrzení přítomnosti selekčního genu *hpt* pomocí primerů HYG F a HYG R. Očekávaná velikost ampliconu: 280 bp. CG1-3: kontrolní skupina, DS1-3 skupina vystavená stresu ze sucha. GP_{A/B}: Golden Promise, C⁺_p: Pozitivní kontrola pBract2014::*OSM*.

4.4.3 Kontrola kvality celkové RNA obohacené o sRNA frakci

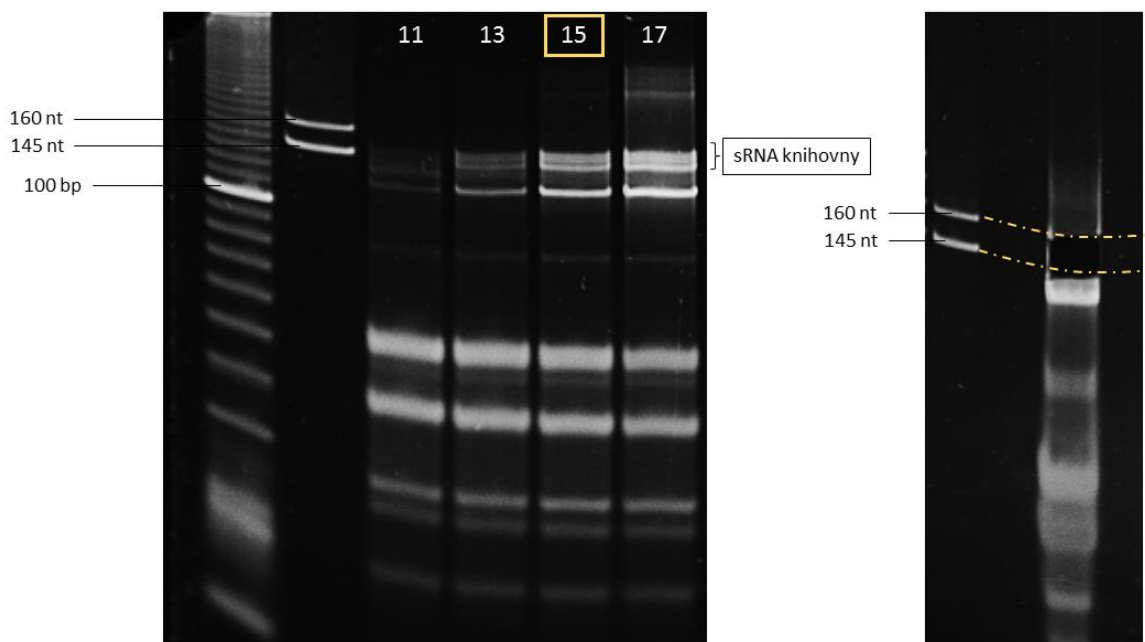
Z transgenních dihaploidním rostlin ječmene jarního cv. Golden Promise generace T₂ nesoucích *osm* transgen byla izolována celková RNA obohacená o sRNA frakci. Odsolená RNA byla měřena bioanalyzárem Agilent 2100 (Obr. 33). Kvalita byla hodnocena RIN číslem (Obr. 33). Minimální potřebné RIN číslo pro přípravu sRNA knihoven bylo 7,5. RIN čísla vzorků se pohybovala mezi 7,5 do 8,0. Kvalita RNA všech biologických replik byla vyhovující pro přípravu sRNA knihoven.



Obr. 33 Výsledky bioanalýzy RNA. Bioanalýza byla provedena pomocí Agilent 2100. RIN čísla jsou uvedena u každého vzorku. OSM: transgenní rostliny ječmene jarního generace T₂DH₁ nesoucí transgen *osm*. GP: netransgenní rostliny ječmene jarního cv. Golden Promise. CG: kontrolní skupina pěstovaná v optimálních podmínkách. DS: skupiny vystavená stresu ze sucha. FU: jednotky fluorescence.

4.4.4 Příprava sRNA knihoven

Z celkové RNA byla izolována sRNA frakce. Pomocí Illumina TruSeq® Small RNA Library kitu bylo připraveno 12 sRNA knihoven. Šest knihoven bylo z šesti biologických replik rostlin T₂DH₁ generace jarního ječmene cv. Golden Promise nesoucího *osm* transgen. Zbýlých šest knihoven byly připraveny z netransgenních rostlin ječmene jarního cv. Golden Promise. Na Obr. 34 je elektroforetická separace sRNA knihovny OSM CG1 ke zjištění optimálního počtu cyklů amplifikace a ukázka vyřezání sRNA knihoven z gelu. Knihovny sRNA byly vyřezány z gelu a přečištěny.



Obr. 34 Elektroforéza produktů amplifikace sRNA knihoven. **Vlevo:** Test optimálního počtu cyklů amplifikace provedený na vzorku OSM CG1. Zvýrazněný počet cyklů byl vybrán jako neoptimálnější. **Vpravo:** Ukázka vyřezání sRNA knihovny z gelu. Knihovny byly vyřezány mezi 160 nt a 145 nt, jak je naznačeno žlutou přerušovanou čarou.

4.4.5 Kontrola kvality sRNA knihoven

Kontrola kvality sRNA knihoven byla provedena na Agilent 2200 TapeStation (Tab. 23). Kontrola kvantity knihoven byla provedena pomocí Qubit 4 fluorometru a Qubit 4 quantitation starter kitu v programu dsDNA High sensitivity Assay (Tab. 24). Bylo úspěšně připraveno 12 sRNA knihoven o vyhovující kvalitě. Předpokládaná velikost cDNA byla 147 nt, ale nejzastoupenější velikosti cDNA se pohybovaly mezi 147 nt a 153 nt. Množství cDNA v knihovnách se velmi lišilo mezi vzorky a pohybovalo se mezi 5,92 až 34,72 ng/ml.

Tab. 23 Výsledek analýzy sRNA knihoven. Analýza byla provedena na Agilent TapeStation 2200. OSM: transgenní rostliny ječmene jarního generace T₂DH₁ nesoucí transgen *osm*. GP: netransgenní rostliny ječmene jarního cv. Golden Promise. CG: kontrolní skupina pěstovaná v optimálních podmínkách. DS: skupiny vystavená stresu ze sucha.

Název vzorku	Velikost nejzastoupenější cDNA
OSM CG1	147
OSM CG2	153
OSM CG3	151
OSM DS1	153
OSM DS2	151
OSM DS3	151
GP CG1	151
GP CG2	148
GP CG3	152
GP DS1	151
GP DS2	146
GP DS3	149

Tab. 24 Kvantita knihoven sRNA měřená pomocí Qubit 4 fluorometru. GP: netransgenní rostliny ječmene jarního cv. Golden Promise. CG: kontrolní skupina pěstovaná v optimálních podmínkách. DS: skupiny vystavená stresu ze sucha.

Vzorek	Koncentrace cDNA [ng/ml]
OSM CG1	11,28
OSM CG2	22,24
OSM CG3	19,92
OSM DS1	19,28
OSM DS2	5,92
OSM DS3	7,12
GP CG1	23,04
GP CG2	16,60
GP CG3	34,72
GP DS1	14,80
GP DS2	15,68
GP DS3	25,40

5. DISKUZE

Prvním cílem diplomové práce bylo získat transgenní rostliny jarní pšenice cv. Fielder nesoucí K5 a J1 verze modifikovaného replikačního proteinu viru zakrslosti pšenice. Efektivita transformace vektorem pIPKb002::K5 byla vypočítána na 6,15 %. Efektivita transformace vektorem pIPKb002::J1 odpovídala 2,86 %. Efektivita transformace obou konstruktů byla velmi nízká. Hexaploidní pšeničný genom, množství repetitivních DNA sekvencí a složitá regenerace transformantů dělají z transformace pšenice velmi obtížnou metodu. He *et al.* (2010) publikoval studii efektivity transformace pšenice. Efektivita transformace uvedená v publikaci se pohybovala mezi 0,9 a 12,3 %. Jiná publikace uvádí efektivitu transformace pšenice mezi 0,3 až 4,3 % (Cheng *et al.*, 1997). Efektivita transformace pšenice v rámci diplomové práce odpovídá citovaným výsledkům.

Dále byly rostliny T₁ generace analyzovány na přítomnost transgenů. Byl vypočítán segregáčn \acute{y} poměr přítomnosti transgenů v T₁ generaci transgenní pšenice oproti netransgenním rostlinám. Předpokládaný poměr podle mendelovské genetiky v T₁ je 3:1. Potomstvo testovaných rostlin nevykazovalo tento ani podobný segregáčn \acute{y} poměr. Nenormáln \acute{i} segregaci transgenů v liniích pšenice transformované biolisticky mělo 14 ze 70 linií (Stoger *et al.*, 1998). Obdobn \acute{e} Cheng *et al.* (1997), který transformoval pšenici pomocí *A. tumefaciens* získal 16 linií z 50 s nemendelistickou segregací transgenů. Tento jev m \acute{u} že být vysvětlen kombinací r \acute{u} zných faktorů, např \acute{i} klad chimérismem, umlčením genu, nebo interakcí transgenů s vývojem gamet. Fenotyp transgenních rostlin odpovídal fenotypu kontrolní rostliny, ale byl viditelný opožd \acute{e} ný v \acute{y} voj oproti netransgenní rostlin \acute{e} jarní pšenice cv. Fielder. Zaostalejší v \acute{y} voj u transgenních rostlin v \acute{u} či kontrole m \acute{u} žeme vysvětlit vložením nenarušením n \acute{e} které metabolické nebo signáln \acute{i} dráhy vložením transgenů.

Expresi WDV transgenů byla srovnávána s expresí transkripčního elongačního faktoru 1- α (TEF1). Efektivita amplifikace byla u transgenů 99,229%, a u TEF1 byla efektivita amplifikace 95,02%. Efektivita amplifikace templátů spadala do tolerovaného rozmezí 90 až 110 %. U všech analyzovaných rostlin byla exprese t \acute{e} m \acute{e} ř shodná a pohybovala se mezi 72 % a 78 % exprese TEF1. Nejvyšší expresi z analyzovaných transgenních rostlin měla rostlina 1B/6, nejnižší expresi měla rostlina 7/4.

Druhým cílem diplomové práce bylo ov \acute{e} ření konstruktů pIPKb002::O2 a pIPKb002::AC4 a transformace ječmene t \acute{e} m \acute{i} to konstrukty. Byla úsp \acute{e} šn \acute{e} provedena transformace ječmene jarního cv. Golden Promise. Celková efektivita transformace konstruktem pIPKb002::O2 byla vypočítána na 5,36 % a efektivita transformace

konstruktem pIPKb002::AC4 byla vypočítána na 2,66 %. Efektivita transformace jsou srovnatelné s efektivitou transformace pšenice, ačkoliv běžně používaným protokolem ve stejné laboratoři je možné dosáhnout efektivit 12 % (Kličová, 2017) i 22 % (Macúchová, 2017). Pokud ale srovnáme efektivitu transformace vektorů pIPKb002 nesoucích K5 a J1 verze WDV replikačního proteinu transformovaných do ječmene (Kostková, 2015), efektivita transformace vychází velmi podobně jako efektivita transformace ječmene O2 a AC4 verzemi WDVrep. K posunu v efektivitě transformace došlo pravděpodobně kvůli velikosti vektorů, jelikož například vektor pBRACT214::*osm* transformovaný s efektivitou 12 % má velikost 8 223 bp, zatímco vektory pIPKb002::WDVrep mají 13 018 bp.

Cílem transformací upravených verzí replikačního proteinu viru zakrslosti pšenice je indukce od patogenu odvozené rezistence a zvýšení tolerance rostlin vůči nákaze WDV. Vektory byly navrženy a transgenní rostliny jsou testovány ve Výzkumném ústavu rostlinné výroby v Praze – Ruzyni (Cejnar *et al.*, 2018). Jelikož je WDV blízce příbuzný modelovému viru rodu Mastrevirů „Maize streak virus“ (MSV), byly upravené replikační proteiny navrženy podle strategie rezistence kukuřice vůči MSV. Zvýšením rezistence vůči MSV se zabývá studie publikovaná v roce 2007 (Shepherd *et al.*). Od patogenu odvozená rezistence vůči MSV byla vyvolána transformací upraveného replikačního proteinu MSV do rosičky krvavé (*Digitaria sanguinalis*), modelové jednoděložné rostliny citlivé k MSV. Regenerované transgenní linie vykazaly vysokou toleranci až imunitu k MSV přenášenému křísem.

Třetím cílem diplomové práce bylo analyzovat přítomnost siRNA odvozených od transgenu. Analyzovanými rostlinami byly dihaploidním jarní ječmeny cv. Golden Promise nesoucí J1 verzi WDVrep transgenu. Všechny WDVrep transgeny jsou exprimovány pod kukuřičným ubiquitinovým promotorem, díky kterému dochází k nadexpresi transgenu. Z důvodu této nadexprese může docházet ke tvorbě siRNA a umlčení exprese transgenu. U transgenních rostlin byla nejdříve ověřena přítomnost transgenu na úrovni DNA i na úrovni RNA. U rostliny 1.1 nebyl přítomen transgen ani *hpt* selekční gen na úrovni DNA, proto byla rostlina z analýzy vyřazena. Pravděpodobně se jednalo o přimíchané netransgenní semeno. Po provedení Northern blotu byla radioaktivita z membrány zaznamenána na autoradiografickou destičku celkem třikrát: po 1 hod., po 24 hod. a po 3 dny. Ani když byla radioaktivita snímána 3 dny nebyl zaznamenán signál mezi 17 nt a 25 nt ani u jednoho vzorku. Díky nespecifické vazbě proub na vrchní části gelu předpokládáme, že metoda byla provedena správně. Nepřítomnost siRNA odvozených od transgenu naznačuje, že mRNA transgenu není degradována a přepisuje se na protein. Stejný experiment byl proveden u linií

transgenní vinné révy (Gambio *et al.*, 2010) V liniích vinné révy nesoucí CP viru GFLP (Grapevine fanleaf virus) pod 35S promotorem nekorelovalo množství transgenů s mRNA a byly v těchto liniích pozorovány mnohočetné inserce transgenů. Krátké, interferující RNA odvozené od transgenů nebyly detekovány. U transgenních rostlin napadených GFLP ale byly identifikovány siRNA mezi 21 nt a 24 nt.

Čtvrtým a posledním cílem diplomové práce byla tvorba sRNA knihoven. Knihovny sRNA byly připraveny z dihaploidních homozygotních rostlin generace T₂ ječmene jarního cv. Golden Promise nesoucí transgen *osmotin*. Osmotin je 24 kDa protein patřící mezi PR proteiny, který byl poprvé izolován z rostlin *Nicotina tabacum* (Goel *et al.*, 2010). Osmotin se podílí na obranných reakcích vůči biotickým i abiotickým stresům. Je regulován abscisovou kyselinou, reguluje adaptaci ke sníženému vodnímu potenciálu (Singh *et al.*, 1989) a je součástí reakce rostliny na poranění nebo napadení virem tabákové mozaiky (LaRosa *et al.*, 1992). V transgenních rostlinách bavlny (Parkhi *et al.*, 2009) a mrkve (Annon *et al.*, 2014) exprimujících osmotin byla potvrzena rezistence ke stresu z nedostatku vody. U transgenních rostlin rajčete byla potvrzena rezistence vůči suchu i zasolení (Goel *et al.*, 2010), u transgenních rostlin pšenice byla potvrzena rezistence pouze vůči zasolení (Sadat Noori a Sokhansanj, 2008). Gen *osmotin* byl modifikován pro expresi v ječmeni a transformován do nezralých embryí jarního ječmene cv. Golden Promise (Klčová, 2017). Před přípravou knihoven byla u všech biologických replik potvrzena přítomnost transgenů i selekčního genu *hpt* na úrovni DNA a RNA. Malé RNA hrají důležitou roli v toleranci k suchu a jejich analýza může odhalit selektivně exprimované sRNA v reakci k suchu, jak publikoval Hackenberg *et al.* (2015). Transgenní rostliny ječmene nadexprimující DREB transkripční faktor, zvyšující rezistenci vůči suchu, ukázaly snížení exprese obvykle níže exprimovaných miRNAs. Změny v expresi miRNAs a siRNAs byly potvrzeny Northern blotem a qRT-PCR.

Izolace sRNA ani příprava knihoven není zdokumentována, z obavy z možných mutací způsobených UV zářením v dokumentačním zařízení G: Box. Frakce sRNA a knihovny byly vizualizovány na transiluminátoru s modrým světlem, který bylo bez dokumentačního zařízení. Obr. 34 byl pořízen, protože se jednalo pouze o test amplifikace. Kvalita knihoven byla zhodnocena na Agilent TapeStation měřením velikosti a zastoupení cDNA fragmentů. V ideálním případě by měl být nejzastoupenější fragment o velikosti 147 nt, který by odpovídal 22 nt sRNA a naligovaným adaptorům. Jakékoliv větší fragmenty znamenají naligování adaptorů na větší sRNA. Dalším krokem v identifikaci sRNA zapojených v reakci ke stresu ze sucha je sekvenování připravených knihoven, identifikace známých

sRNA a jejich kvantifikace v rámci kontrolní skupiny, skupiny vystavené stresu ze sucha a mezi transgenními a kontrolními rostlinami.

Dílčí výsledky diplomové práce byly publikovány ve formě posteru na mezinárodní konferenci 3rd iPLANTA COST v Lisabonu v roce 2019 (viz kapitola Přílohy).

Plakátové sdělení v anglickém jazyce:

Trajerová M., Cejnar P., Vlčko T., Pacak A., Szweykowska-Kulińska Z., Kumar J., Ohnoutková L. (2019): Pathogen-derived resistance to wheat dwarf virus in barley and wheat. 3rd COST iPLANTA, Lisabon, Portugal, February 28th-March 1st, Book of abstract p16. In English.

6. ZÁVĚR

V teoretické části diplomové práce byla vypracována literární rešerše na téma obrana rostlin vůči patogenům s podrobněji rozpracovanými metodami rezistence s využitím genetické informace patogenu a stručným seznámením s virem zakrslosti pšenice, jeho stavbou a průběhem nákazy. V experimentální části byla úspěšně transformována jarní pšenice cv. Fielder od patogenu odvozenou rezistencí vůči WDV upravenými verzemi WDV replikačního proteinu nazvanými K5 a J1. Transgen byl detegován v generaci T₀ i v generaci T₁. U potomků T₁ generace byl vypočítán segreganční poměr transgenu, který neodpovídal mendelistickému štěpnému poměru. U vybraných rostlin byla určena relativní exprese transgenu vůči TEF1 provoznímu genu. Dále byly připraveny vektory nesoucí O2 a AC4 verze WDV replikačního proteinu a byla úspěšně provedena transformace ječmene. Přítomnost transgenu byla potvrzena v T₀ generaci. Na pracovní stáži programu ERSMUS⁺ byla analyzována přítomnost siRNA odvozených od J1 verze WDVrep transgenu v rostlinách ječmene jarního cv. Golden Promise. Přítomnost siRNA odvozených od transgenu byla vyvrácena, proto předpokládáme že mRNA transgenu je překládána do proteinu. Z rostlin ječmene jarního nesoucích gen *osmotin* byly připraveny sRNA knihovny.

Dílčí výsledky práce byly prezentovány ve formě posteru a abstraktu na mezinárodní konferenci 3rd iPLANTA COST v Lisabonu v roce 2019.

Tolerance transgenních rostlin pšenice a ječmene vůči WDV bude analyzována ve Výzkumném ústavu rostlinné výroby, v.v.i. v Praze – Ruzyni. Identita a zastoupení sRNA v knihovnách bude analyzována sekvenováním.

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Abt I., Alabi O., Alcalá-Briseño, Amarakoon I., Azizi A., Blomme G., Bonaventure Omondi A., Célestin N., Chalam V.C. *et al.* (2015): Wheat Dwarf. In: *Virus Diseases of Tropical and Subtropical Crops*. (Tennant P., Fermin G.) CABI, Boston, USA.
- Ali. Z., Abulfaraj A., Idris A., Ali S., Tashkandi M., Mahfouz M.M. (2015): CRISPR/Cas9-mediated viral interference in plants. *Genome biology* **16**(1), 238.
- Annon A., Rathore K., Crosby K. (2014): Overexpression of tobacco osmotin gene in carrot (*Daucus carota* L.) enhances drought tolerance. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* **50**, 299-306.
- Arif M., Islam S.U., Adnan M., Anwar M., Ali H., Wu Z. (2018) Recent progress on gene silencing/suppression by virus-derived small interfering RNAs in rice viruses especially Rice Grassy stunt virus. *Microbial Pathogenesis* **125**, 210-218.
- Ascencio-Ibáñez J.T., Sozzani R., Lee T-J., Chu T-M., Wolfinger R.D., Cella R., Hanley-Bowdoin L. (2008): Global analysis of Arabidopsis gene expression uncovers a complex array of changes impacting pathogen response and cell during Geminivirus infection. *Plant Physiology* **148**, 436-454.
- Asumerdi S., Berga R.H., Smitha T.J., Bendahmane M., Beachy R.N. (2007): Agregation of TMV CP plays a role in CP functions and coat-protein-mediated resistance. *Virology* **366**, 98-106.
- Bandhamane M. Gronenborn B. (1997): Engeneering resistance against Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) using antisense RNA. *Plant Molecular Biology* **33**, 351-357.
- Barbier P., Perrin M., Cobanov P., Walter B. (1998): Probing pathogen-derived resistance against the fanleaf virus in grapevine. *VII International Symposium on Grapevine Genetics and Breeding* **528**, 385-388.
- Baulcombe D.C. (1996): Mechanism of pathogen-derived resistance to viruses in transgenic plants. *The Plant Cell* **8**, 1833-1844.
- Beachy R.N. (1997): Mechanism and applications of pathogen-derived resistance in transgenic plants. *Current Opinion in Biotechnology* **8**, 215-220.
- Benkovics A.H., Vida G., Nelson D., Veisz O., Bedford I., Silhavy D., Boulton M.I. (2010): Partial resistance to Wheat Dwarf Virus in winter wheat cultivars. *Plant Pathology* **59**, 1144-1151.
- Bisztray, G., Gáborjányi, R. (1989) Isolation and characterisation of wheat dwarf virus found for the first time in Hungary. *Journal of Plant Diseases and Protection* **96**, 449-454.
- Bonas U., Lahaye T. (2002): Plant disease resistance triggered by pathogen-derived molecules: refined models of specific recognition. *Current Opinion in Microbiology* **5**, 44-50.
- Carr J.P., Marsh L.E., Lomonosoff G.P., Sekiya M.E., Zaitlin M. (1992): Resistance to tobacco mosaic virus induced by the 54-kDa gene sequence requires expression of the 54-kDa protein. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **5**, 397-404.

- Cejnar P., Ohnoutková L., Ripl J., Vlčko T., Kundu J.K. (2018): Two mutations in the truncated Rep gene RBR domain delayed the *Wheat dwarf virus* infection in transgenic barley plants. *Journal of Integrative Agriculture* **17**(11), 2492-2500.
- Dale P.J., Marks M.S., Brown M.M., Woolston C.J., Gunn H., Boulton M.I., Mulineaux P.M., Lewis D.M., Kemp J.M., Chen D.F., Gilmour D.M., Flavell R.B. (1989): Agroinfection of wheat: inoculation of *in vitro* grown seedlings and embryos. *Plant Science* **63**, 237-245.
- Dangl J.L., Jones J.D.G. (2001): Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **411**, 826-833.
- Domínguez A., de Mendoza A.H., Guerri J., Cambra M., Navarro L., Moreno P., Peña L. (2002): Pathogen-derived resistance to Citrus tristeza virus (CTV) in transgenic mexican lime (*Citrus aurantifolia* (Christ.) Swing.) plants expressing its p25 coat protein gene. *Molecular Breeding* **10**, 1-10.
- Ehrenfeld N., Romano E., Serreno C., Arce-Johnson P. (2004): Replicase mediated resistance against Potato Leafroll Virus in potato Désirée plants. *Biological Research* **37**, 71-82.
- Fahim M., Ayala-Navarrete L., Millar A.A., Larkin P.J. (2010): Hairpin RNA derived from viral Nla gene confers immunity to wheat streak mosaic virus infection on transgenic wheat plants. *Plant Biotechnology Journal* **8**, 821-834.
- Faoro F., Gozzo F. (2015): Is modulating virus virulence by induced systemic resistance realistic? *Plant Science* **234**, 1-13.
- Fire A., Xu S., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E., Mello C.G. (1998): Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**(6669), 806.
- Fondong V.N. (2013): Geminivirus protein structure and function. *Molecular Plant Pathology* **14**(6), 635-649.
- Gambino G., Perrone I., Cara A., Chitarra W., Boccacci P., Marinoni D.T., Barberis M., Maghuly F., Laimer M., Gribaudo I. (2010): Transgene silencing in grapevines transformed with GFLV resistance genes: analysis of variable expression of transgene, siRNA production and cytosine methylation. *Transgenic Research* **19**, 17-27.
- Gaponenko A.K., Mishutkina Y.V., Timoshenko A.A., Shulga O.A. (2018): Genetic transformation of wheat: State of Art. *Russian Journal of Genetics* **54**(3), 267-283.
- Gill K.S., Gill B.S. (1994): Mapping in the realm of polyploidy: The wheat model. *BioEssays* **16**, 841-846.
- Goel D., Singh A.K., Yadav V., Babbar S.B., Bansal K.C. (2010): Overexpression of Osmotin gene confers drought stress in transgenic tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Protoplasma* **245**, 133-141.
- Goldbach R., Bucher E., Prins M. (2003): Resistance mechanism to plant viruses: an overview. *Science Direct* **92**, 207-212.
- Gutierrez C. (1999): Geminivirus DNA replication. *Cellular and Molecular Life Sciences* **56**, 313-329.

- Hackenberg M., Gustafsson P., Langridge P., Shi B.-J. (2015): Differential Expression of microRNAs and other small RNAs in barley between water and drought conditions. *Plant Biotechnology Journal* **13**, pp. 2-13.
- Hammond S.M., Caudy A.A., Hannon G.J. (2001): Post-transcriptional gene silencing by double stranded RNA. *Nature Reviews Genetics* **2**, 110.
- Hanley-Bowdoin L., Bejarano E.R., Robertson D., Mansoor S. (2013): Geminiviruses: masters at redirecting and reprogramming plant processes. *Nature Reviews Microbiology* **11**(11), 777.
- Hannon G.J. (2002): RNA interference. *Nature* **418**, 244-251.
- He D.G., Mouradev A., Yang Y.M., Mouradeva E., Scott K.J. (1994): Transformation of wheat (*Triticum aestivum* L.) through electroporation of protoplasts. *Plant Cell Report* **14**, 64-70.
- Hoisington D., Bohorova N, Fennell S., Khairallah M., Pelledrineschi A., Ribaut J.M. (2012): The application of biotechnology to wheat improvement. *FAO plant production and protection series* **30**, 175-198.
- Huth, W. (2000) Viruses of *Geminiviridae* in Germany—a short overview. *Journal of Plant Diseases and Protection* **107**, 406–414.
- Hutvagner G., Simrad M.J. (2008): Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **9**(1), 22.
- Chandrasekaran J., Brumin M., Wolf D., Leibman D., Klap C. Pearlsman M., Sherman A., Arazi T., Gal-on A. (2016): Development of broad virus resistance in nontransgenic cucumber using CRISPR/Cas9 technology. *Molecular Plant Pathology* **17**(7), 1140-1153.
- 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.
- 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.
- Christian M., Cermak T., Doyle E.L., Schmidt C., Zhang F., Hummel A., Bogdanove A.J., Voytas D. (2010): Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics* **186**, 757-761.
- Chrprová J., Sumíková T., Palicová J., Kumar J., Váňová M., Bílovský J., Veškrna O. (2017): Ochrana obilnin proti virovým chorobám (BYDV a WDV). Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., 27pp.
- International Wheat Genome Sequencing Consortium (IWGSC) (2018): Shifting the limits in wheat research and breeding using a fully annotated reference genome. *Science* **361**, eaar7191.
- Jalaluddin N.S.M., Othman R.Y., Harikrishna J.A. (2018): Global trends in research and commercialization of exogenous and endogenous RNAi technologies for crops. *Critical Reviews in Biotechnology* **39**(1), 67-78.
- Ji X., Zhang H., Zhang Y., Wang Y., Caixia G. (2015): Establishing a CRISPR-Cas-like immune system conferring DNA virus resistance in plants. *Nature Plants* **1**(10), 15144.

- Jones H.D., Doherty A., Wu H. (2005): Review of methodologies and a protocol for the *Agrobacterium*-mediated transformation of wheat. *Plant Methods* **1**(1), 5.
- Jorgensen R. (1992): Silencing of plant genes by homologous transgenes. *AgBiotech News and Information*.
- Klčová B. (2017): *Transformace jarního ječmene genem osmotin*. Bakalářská práce, Univerzita Palackého v Olomouci, Česká republika.
- Klessig D.F., Choi H.W., Dempsey D.A. (2018): Systemic acquired resistance and salicylic acid: past, present and future. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **31**(9), 871-888.
- Köklü G., Ramsell J.N.E., Kvarnheden A. (2007): The complete genome sequence for a Turkish isolate of Wheat Dwarf Virus (WDV) from barley confirms the presence of two distinct WDV strains. *Virus Genes* **34**, 359-366.
- Kostková M. (2015): *Příprava expresního vektoru pro patogen odvozenou rezistenci vůči WDV*. Bakalářská práce, Univerzita Palackého v Olomouci, Česká republika.
- Kumlehn J. (2008): The IPKb vector set: modular binary plasmids for cereal transformation. *ISB News Report*.
- LaRosa P.Ch., Chen Z., Nelson D.E., Singh N.K., Hasegawa P.M., Bressan R.A. (1992): Osmotin gene expression in post-transcriptionally regulated. *Plant Physiology* **100**, 409-415.
- Leister D. (2004): Tandem and segmental gene duplication and recombination in the evolution of plant disease resistance genes. *TRENDS in Genetics* **20**, 116-122.
- Lindblad, M., Sigvald, R. (2004) Temporal spread of wheat dwarf virus and mature plant resistance in winter wheat. *Crop Protection* **23**, 229-234.
- Lindbo J.A., Dougherty W.G. (1992): Pathogen-derived resistance to a potyvirus: immune and resistant phenotypes in transgenic tobacco expressing altered forms of a potyvirus coat protein nucleotide sequence. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **5**(2), 144-153.
- Lindbo J.A., Saliva-Rosales L., Proebsting W.M., Dougherty W.G. (1993): Induction of a highly specific antiviral state in transgenic plants: implication for regulation of gene expression and virus resistance. *The Plant Cell* **5**, 1749-1759.
- Lindsten, K., Vacke, J., Gerhardson, B. (1970) A preliminary report on three cereal virus diseases new to Sweden spread by *Macrostelus* and *Psammotettix* leafhoppers. *National Swedish Institute of Plant Protection* **14**, 285-297.
- Llave C. (2010): Virus-derived small interfering RNAs at the core of plant-virus interactions. *Trends in plant Science* **15**(12), 701-707.
- Lomonosov G.P. (1995): Pathogen-derived resistance to plant viruses. *Annual Review of Phytopathology* **33**, 323-343.
- Lörz H., Baker B., Schell J. (1985): Gene transfer to cereal cells mediated by protoplast transformation. *Molecular and General Genetics* **199**, 178-192.
- Lucioli A., Noris E., Brunetti A., Tavazza R., Ruzza V., Castillo A.G., Bejarano E.R., Accotto G.P., Tavazza M. (2003): Tomato yellow leaf curl sardinia virus rep-derived resistance to homologous and heterogenous geminiviruses occurs by different mechanism and is overcome if virus-mediated transgene silencing is activated. *Journal of Virology* **77**, 6785-6798.

- Macúchová B. (2017): *Transformace jarního ječmene genem limen*. Bakalářská práce, Univerzita Palackého v Olomouci, Česká republika.
- Mali P., Yang L., Esvelt K.M., Aach J., Guell M., DiCarlo J.E., Norville J.E., Church G.M. (2013): RNA-Guided Human genome engineering via Cas9. *Science* **339**(6121), 823-826.
- Malnoe P., Farinelli L., Collet G.F, Reust W. (1994): Small-scale field tests with transgenic potato, cv. Bintje, to test resistance to primary and secondary infections with potato virus Y. *Plant Molecular Biology* **25**, 963-975.
- Mamta B., Rajam M.V. (2017): RNAi technology: a new platform for crop pest control. *Physiology and Molecular Biology of Plants* **23**(3), 487-501.
- Manurung, B., Witsack, W., Mehner, S., Gruntzig, M. and Fuchs, E. (2005): Studies on biology and population dynamics of the leafhopper *Psammotettix alienus* Dahlb. (Homoptera : Auchenorrhyncha) as vector of wheat dwarf virus (WDV) in Saxony- Anhalt, Germany. *Journal of Plant Diseases and Protection* **112**, 497–507
- Meyers B.C., Kozik A., Griego A., Kuang H., Michelmore R.W. (2003): Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in Arabidopsis. *The Plant Cell* **15**, 809-834.
- Mooney P.A., Goodwin P.B., Dennis E.S., Llewellyn D.J. (1991): *Agrobacterium tumefaciens*-gene transfer into wheat tissues. *Plant Cell Tissue Organ Culture* **25**, 209-218.
- Muhire B., Martin D.P., Brown J.K., Navas-Castillo J., Moriones E., Zerbini F.M., Rivera-Bustamante R., Malathi V.G., Briddon R.W., Varsani A. (2013): A genome wide pairwise-identity-based proposal for the classification of viruses in the *Mastrevirus* (family *Geminiviridae*). *Archives of Virology* **158**, 1411-1424.
- Murray M.G., Thompson W.F. (1980): Rapid Isolation of high Molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research* **8**(19), 4321-4325.
- Napoli C., Lemieux Ch., Jorgensen R. (1990): Introduction of a chimeric chalcon gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *The Plant Cell* **2**, 279-289.
- Page A.F., Minocha S.C. (2004): Analysis of gene expression in transgenic plants. *Methods in Molecular biology* **286**, 291-311.
- Palli S.R. (2012): RNAi methods for management of insects and their pathogens. *CAB Reviews* **7**(004), 1-10.
- Parkhi V., Kumar V., Sunilkumar G., Campbell L.M., Singh N.K., Rathore K.S. (2009): Expression of apoplastically secreted tobacco Osmotin in cotton confers drought tolerance. *Molecular Breeding* **23**, 625-639.
- Patnaik D. a Khurana P. (2001): Wheat biotechnology: A minireview. *Electronic Journal of Biotechnology* **4**(2), 7-8.
- Powel P.A., Star D.M., Sanders P.R., Beachy R.N. (1989): Protection against tobacco mosaic virus in transgenic plants that express tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science* **232** 738-743.
- Prins M., Laimer M., Noris E., Schubert J., Wassenegger M., Tepfer M. (2008): Strategies for antiviral resistance in transgenic plants. *Molecular Plant Pathology* **9**(1), 73-83.

- Ripl J., Kundu J.K. (2015): *Cynosurus Cristatus*, a new host of wheat dwarf virus in the Czech Republic. *Journal of Plant Pathology* **97**(3), 541-551.
- Rizvi I., Choudhury N.R., Tuteja N. (2014): Insight into the functional characteristic of geminivirus rolling-cycle replication initiator protein and its interaction with host factors affecting viral DNA replication. *Archives of Virology* **160**(2), 375-387.
- Sadat Noori S.A., Sokhansaj A. (2008): Wheat plants containing an Osmotin gene show enhanced ability to produce roots at high NaCl concentration. *Russian Journal of Plant Physiology* **55**(2), pp. 256-258.
- Sander J.D., Joung J.K. (2014): CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nature Biotechnology* **32**(4), 347-355.
- Sanford J.C., Johnston S.A. (1985): The concept of parasite-derived resistance-deriving resistance genes from the parasite's own genome. *Journal of Theoretical Biology* **113**, 395-405.
- Sen G.L., Blau H.M. (2006): A brief history of RNAi: silence of the genes. *The FASEB Journal* **20**, 1293-1299.
- Sera T. (Takeshi Sera) *Geminivirus Replication Inhibitor*. United States Patent no. US 9,943,083, B2, 17.4.2018, 49 stran.
- Shepherd D.N., Mangwende T., Martin D.P., Bezuidenhout M., Thomson J.A., Rybicki E.P. (2007): Inhibition of maize streak virus (MSV) replication by transient and transgenic expression of MVS replication- associated protein mutants. *Journal of General Virology* **88**, 325-336.
- Schaeffer S.M., Nakata P.A. (2015): CRISPR/Cas9-mediated genome editing and gene replacement in plants: transitioning from lab to field. *Plant Science* **240**, 130-142.
- Schen W., Bobay B.G., Greeley L.A., Reyes M.I., Rajabu C.A., Blackburn R.K., Dallas M.B., Goshe M.B., Ascencio-Ibañez J.T., Hanley-Bowdoin L. (2018): Sucrose Nonfermenting 1-Related Protein kinase 1 phosphorylates a Geminivirus Rep protein to impair viral replication and infection. *American Society of Plant Biologists* **178**, 372-389.
- Scholthof K-B G., Scholthof H.B., Jackson A.O. (1993): Control of plant virus disease by pathogen-derived resistance in transgenic plants. *Plant Physiology* **102**,7-12.
- Schubert J., Matoušek J., Mattern D. (2004): Pathogen-derived resistance in potato to Potato virus Y-aspects of stability and biosafety under field conditions. *Virus Research* **100**, 41-50.
- Sing D.P., Moore C.A., Gilliland A., Carr J.P. (2004): Activation of multiple antiviral defence mechanisms by salicylic acid. *Molecular Plant Pathology* **5**(1), 57-63.
- Singh N.K., Nelson D.E., Kunh D., Hasegawa P.M., Bressan R.A. (1989): Molecular cloning of Osmotin and regulation of its expression by ABA and adaptation to low water potential. *Plant Physiology* **90**, 1096-1101.
- Smith N.A., Singh S.P., Wang M.B. Stoutjesdijk P.A., Green A.G., Waterhouse P.M. (2000): Gene Expression: total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature* **407**(6802), 319.
- Sömera M., Truve E. (2019): First report of Wheat dwarf virus in winter wheat in Estonia. *Plant Disease*.

- Stephanov, J., Dimov, A. (1981) Bolestta vdjudjavanje po spenittsata Bolgaria. *Rasteniev Nauki* **18**, 124–128.
- Stroger E., Williams S., Keen D., Christou P. (1998): Molecular characteristics of transgenic wheat and the effect on transgene expression. *Transgenic Research* **7**, 463-471.
- Tennant PF., Gonsalves C., Ling K-S., Fitch M., Manshardt R., Slingtom J.L., Gonsalves D. (1994): Diferential protection against papaya ringspot virus isolates in coat protein gene transgenic papaya and classically cross-protected papaya. *Phytopathology* **84**, 1359-1366.
- Tisková zpráva Nobelova shromáždění v Institutu Karolinka vydána 2.10.2006 udělující Nobelovu cenu za fyziologii a medicínu pro Andrew Z. Fire a Craig C. Mello: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2006/press-release/> [21.3.2019]
- Vacke J. (1961): Wheat Dwarf Virus. *Biologie Plantarum* **3**(3), 228-233.
- Vacke J. (1971): Wheat Dwarf: final report. *Research Institute of Crop Protection Prague-Ruzyně*.
- Vacke J., Cibulka R. (1999): Silky bent grass (*Aspera spica-venti* [L] Beauv.) – a new host and reservoir of wheat dwarf virus. *Plant Protection* **35**, 47-50.
- Vain P., Afolabi A.S., Worland B., Snaoe J.W. (2003): Transgene behaviour in populations of rice plants transformed using a new dual binary vector systém: pGreen/pSoup. *Theoretical and Applied Genetics* **107**(2): 210-217.
- Vasil V., Castillo A.M., Fromm M.E., Vasil I.K. (1992): Herbicide resistant fertile transgenic wheat plants obtained by microprojectile bombardment of regenerable embryonic callus. *Biotechnology* **10**, 667-674.
- Vavlov N.I. (1926): Studies on the origin of cultivated plants. *Bulletin of Applied Botany and Plant Breeding* **14**, 1-245.
- Wang M.B., Abbot D.C., Waterhouse P.M. (2000): A single copy of a virus-derived transgene ancouding hairpin RNA gives immunity to barley yellow dwarf virus. *Molecular Plant Pathology* **1**(6), 347-356.
- Wang X., Eggenberger A.L., Nutter F.W.Jr., Hill J.H. (2001):Pathogen-derived transgenic resistance to soybean mosaic virus in soybean. *Molecular Breeding* **8**, 119-127.
- Wang Y., Mao Q., Liu W., Mar TT., Wei T., Liu Y., Wang X. (2014): Localization and distribution of wheat dwarf virus in its vector leafhopper *Psammotettix alienus*. *Phytopathology* **104**(8), 897-904.
- Wesley S.V., Helliwell Ch.A., Smith N.A., Wang M., Rouse D.T., Liu Q., Gooding P.S., Singh S.P., Abbott D., Stoutjesdijk P.A., Robinson S.P., Gleave A.P., Green A.G., Waterhouse P.M. (2001): Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *The Plant Journal* **27**(6), 581-590.
- Woolston C.J., Barker R., Grunn H., Boulton M.I., Mullineaux P.M. (1988): Agroinfection and nucleotide sequence of cloned wheat dwarf virus DNA. *Plant Molecular Biology* **11**, 35-43.
- Wu B., Melcher U., Guo X., Wang X., Fan L., Zhou G. (2008): Assesment of codivergence of Mastreviruses with their plant hosts. *BMC Evolutionary Biology* **8**, 335.

Xie J., Wang X., Liu Y., Peng Y., Zhou G. (2007): First report of occurrence of wheat dwarf virus in wheat in China. *Plant Disease* **91**(1), 111.

Zerbini F.M., Briddon R.W., Idris A., Martin D.P., Moriones E., Navas-Castillo J., Rivera-Bustamanty R., Roumagnac P., Varsani A., ICTV report consortium (2017): ICTV Virus Taxonomy Profile: *Geminiviridae*. *Journal of General Virology* **98**, 131-133.

Zhu Ch-X., Song Y-Z., Yin G-H., Wen F-J. (2007): Induction of RNA-mediated multiple virus resistance to potato virus Y, tobacco mosaic virus and cucumber mosaic virus. *Journal of Phytopathology* **157**, 101-107.

PŘÍLOHY

Příloha 1

Abstrakt vydaný ve sborníku k mezinárodní konferenci 3rd COST iPLANTA, Lisabon 2019.



PATHOGEN DERIVED RESISTANCE TO WHEAT DWARF VIRUS IN BARLEY AND WHEAT

M. TRAJEROVA¹, P. CEJNAR^{2,3}, T. VLCKO¹, A. PACAK⁴, P. Z.SZWEYKOWSKA-KULIŃSKA⁴, J.KUMAR³, L.OHNOUTKOVA¹

¹Institute of Experimental Botany AS CR & Palacký University, Laboratory of Growth Regulators, Centre of the Region Hana for Biotechnological and Agricultural Research, Šlechtitelů 27, 78371 Olomouc, Czech Republic


²Department of Plant Protection, Faculty of Agrobiolgy, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences, Kamýcká 129, 16500 Prague 6, Czech Republic

³Crop Research Institute, Division of Crop Protection and Plant Health, Drnovská 507/73, 16106 Prague 6, Czech Republic

⁴Department of Gene Expression, Institute of Molecular Biology and Biotechnology, Faculty of Biology, Adam Mickiewicz University, Umultowska 89, 61-614 Poznan, Poland

Wheat dwarf virus, PDR, wheat, barley Agrobacterium-mediated transformation

The principle of pathogen-derived resistance (PDR) by transforming host plants with viral genes or sequences with the purpose to block a specific step during virus multiplication in the plant is one of strategy how to obtain resistance to virus diseases. Wheat dwarf virus (WDV) is one of the most economically serious viral disease in cereals in the different part in the world. The virus affects economically important species of cereals, mainly winter wheat and winter barley. The strategy of PDR-WDV was designed and applied to obtain resistant plant of wheat and barley. Expression vector pIPKb002 was prepared with a selected target sequence of WDV Rep, labeled J1, and with a selected target sequence of WDV Rep with several point mutations, labeled K5 for wheat and barley and AC4 and O2 for barley and also potentially for wheat. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation was used for transforming of immature zygotic embryos of the spring barley cv. Golden Promise and for the spring wheat of cv. Fielder. Barley and wheat regenerated plants T0 generation were evaluated by PCR, the efficiency of transformation was determined. Three different phenotypes of transgenic plants with pIPKb002:J1 were identified in the barley. The dihaploid transgenic plants of T3DH2 generation were evaluated by using Northern Blot to detect J1 mRNA transcript. Verification of resistance in transformed plants T1 and T2 barley and wheat are tested in CRI in Prague.



PATHOGEN DERIVED RESISTANCE TO WHEAT DWARF VIRUS IN BARLEY AND WHEAT

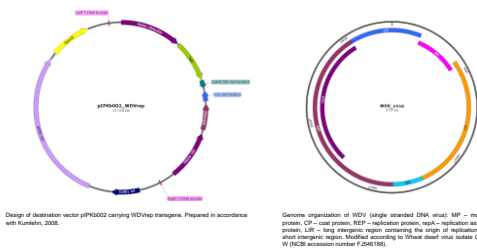
**M. TRAJEROVA¹, P. CEJNAR^{2,3}, T. VLCKO¹, A. PACAK⁴, Z. SZWEYKOWSKA-KULIŃSKA⁴, J. KUMAR³,
L. OHNOUTKOVA¹**

¹Institute of Experimental Botany AS CR & Palacký University, Laboratory of Growth Regulators, Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Šlechtitelů 27, 78371 Olomouc, Czech Republic
²Department of Plant Protection, Faculty of Agrobiology, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences, Kamýcká 129, 16500 Prague 6, Czech Republic
³Crop Research Institute, Division of Crop Protection and Plant Health, Dřevnická 507/73, 16106 Prague 6, Czech Republic
⁴Department of Gene Expression, Institute of Molecular Biology and Biotechnology, Faculty of Biology, Adam Mickiewicz University, Umultowska 89, 61-614 Poznań, Poland

Background

Transforming host plants with viral genes or sequences with the purpose to block a specific step of the virus life-cycle is the principle of so called pathogen derived resistance (PDR) – a strategy to obtain resistance to virus diseases. Wheat dwarf virus (WDV) is one of the most economically serious viral disease in cereals in countries with spring/winter crop cycle. The virus affects economically important species of cereals, mainly winter wheat and winter barley. WDV PDR strategy was designed and applied to obtain resistant plant of wheat and barley. Expression vector pIPKb002 was prepared with a selected target sequence of WDV Rep, labeled J1, and with a selected target sequence of WDV Rep with several point mutations, labeled K5 for wheat and barley and AC4 and O2 for barley. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation was used for transforming of immature zygotic embryos of the spring barley cv. Golden Promise and for the spring wheat of cv. Fielder.

Material and Methods



Used vectors

- pIPKb002 expressing vectors harbouring partial WDV sequence were prepared.
- Expression of all genes of interest is controlled by maize ubiquitin promoter. All destination vectors (pIPKb002) contains selection gene *hpt* (hygromycin phosphotransferase) with conferred resistance to hygromycin B.
- Vectors were: 1) pIPKb002::K5, 2) pIPKb002::J1, 3) pIPKb002::AC4, 4) pIPKb002::O2.
- The differences between vectors are several point mutations in WDV Rep sequence.

Wheat transformation

- Expression vectors: 1) pIPKb002::K5 and 2) pIPKb002::J1.
- Immature embryos of spring wheat cv. Fielder were transformed using *Agrobacterium*-mediated transformation according to protocol by Dr. Wendy Harwood (Figure 1).
- After transformation, selection was performed for 8 weeks on medium containing 30 mg of hygromycin B.
- Regenerated plants were PCR screened to select transgenic plants (Table 1, Figure 3).
- Transformed plants of T1 generation were grown in greenhouse (Figure 4).

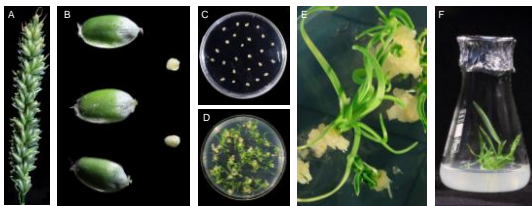


Figure 1. Transformation of spring wheat cv. Fielder. (A) Ear of spring wheat cv. Fielder. (B) Grains and immature embryos. (C) Immature embryos on co-cultivation medium. (D) Immature embryos on selection medium. (E) Detail of plantlets regenerating from callus on regeneration medium. (F) Plantlets on rooting medium.

Barley transformation

- Transformed vectors: 1) pIPKb002::AC4 and 2) pIPKb002::O2
- Immature embryos of spring barley cv. Golden Promise were transformed by *A. tumefaciens* according to Harwood, 2014.
- Selection was performed on medium with 30 mg HygB.
- Regenerated plants transformed by pIPKb002::AC4 were screened by PCR.
- Embryos transformed with pIPKb002::O2 are in callus state for now.

Northern Blot

- Double-haploid plants (T2 generation) of spring barley cv. Golden Promise carrying J1 transgene were selected according to their phenotypes: 1) Dwarf and 2) Tall (Figure 2).
- Progeny of these selected plants - T3DH2 generation – were used to determine, whether siRNA from transgene is derived.
- Total RNA enriched with siRNA fraction was extracted.
- Radioactive probes were prepared with ³²P by nick translation from J1 gDNA.
- Electrophoresis proceeded on 15% denaturing gel with radioactive standard. Semi-dry blotting was performed on vinyl membrane.
- RNA was fixed on membrane by UV light. Hybridization with probes lasted overnight at 42 °C.
- Exposure of membrane lasted 24 hours (Figure 6).



Figure 2. T2DH1 generation of spring barley cv. Golden Promise carrying J1 transgen. (A) Tall phenotype (B) Dwarf phenotype.

References

- Kurlitsin, J. (2005). The IPKb vector set: modular cloning platform for gene transformation. *CSB News Report*.
- Harwood, W. A. (2014). A protocol for high-throughput *Agrobacterium*-mediated barley transformation. In *Cereal Genetics* (pp. 251-260). Humana Press, Toronto, NJ.

Results

WHEAT TRANSFORMATION

Table 1: Number of transformed embryos and regenerated plants.

Vector	Vector no.	Transformed embryos No.	Regenerated plants No.	PCR positive plants No.
pIPKb002::K5	142	65	13	4
pIPKb002::J1	143	70	8	2

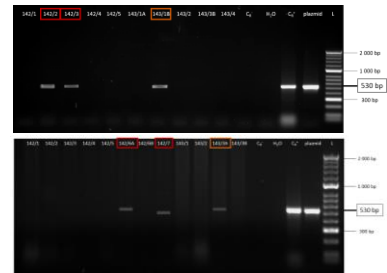


Figure 3. Screening of transformed T0 generation spring wheat cv. Fielder. 142: plants carrying K5 version of WDV rep, 143: plants carrying J1 version of WDV rep. C₊: positive plant control, C₋: negative plant control, C₊: plasmid control.

BARLEY TRANSFORMATION

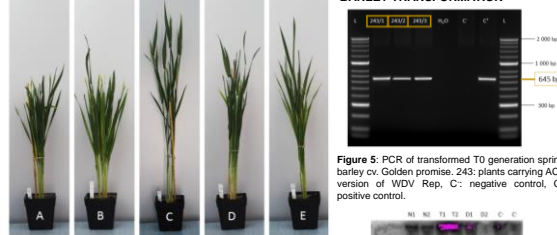


Figure 4. T1 generation of spring wheat cv. Fielder carrying K5/J1 version of WDV Rep. (A) K5: 142/6A (B) K5: 142/7 (C) K5: 142/3 (D) J1: 143/2 (E) J1: 143/3B

NORTHERN BLOT

- PCR derived from replication protein is highly dependent on Rep protein presence. There are no antibodies to WDV Rep protein detection yet, and due to overexpressing promoter RNA silencing can happen. Presence of siRNA derived from transgen was therefore tested.
- None siRNA derived from transgen was detected. Functionality of marked probe is confirmed by it's unspecific binding in the upper part of membrane.

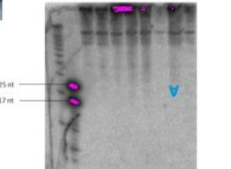


Figure 5. PCR of transformed T0 generation spring barley cv. Golden Promise. 243: plants carrying AC4 version of WDV Rep. C₋: negative control, C₊: positive control.

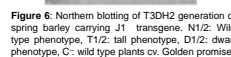


Figure 6. Northern blotting of T3DH2 generation of spring barley carrying J1 transgene. N1/2: Wild type phenotype, T1/2: tall phenotype, D1/2: dwarf phenotype, C₋: wild type plants cv. Golden Promise.

Conclusion

- Wheat and barley regenerated plants of the T0 generation were evaluated by PCR, the efficiency of transformation was determined.
- Presence of siRNA derived from J1 transgen was tested in T3DH2 generation of spring barley cv. Golden Promise by Northern blot.
- Evaluation of transformed plants resistance (T1 and T2 barley and wheat) is tested in CRI in Prague.

Acknowledgements

This work was supported by the project LO1204 from the National Program of Sustainability

CA15223 iPlanta 3rd Conference
February 27th – March 1st, 2018, Lisbon, Portugal