

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Viry jako potenciální vektory obilovin

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor: **Martin Lukáč**
Studijní program: B1406 Biochemie
Studijní obor: Biotechnologie a genové inženýrství
Forma studia: Prezenční
Vedoucí práce: **Mgr. Miroslav Valárik, Ph.D.**
Rok: : 2019

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

V Olomouci dne

Rád bych tímto poděkoval svému školiteli, Mgr. Miroslavu Valárikovi, Ph.D., za jeho laskavost, trpělivost a vstřícnost. Jeho vedení udělalo tuto práci nejen možnou a velmi zábavnou, ale i nesmírně přínosnou pro mé budoucí vzdělání.

Také bych rád poděkoval svým kolegům, Bc. Vendule Weissové, za její podporu a ochotu se mnou vydržet v laboratoři dlouhé hodiny, ale také Bc. Svatoplukovi Skoupému, který mi vždy pomohl, když jsem to potřeboval.

V neposlední řadě bych rád poděkoval svým rodičům, kteří mi zajistili, jak jen mohli, relativně bezstarostné a příjemné studium, ať už podporou finanční či psychickou. Lepší rodiče jsem si nemohl přát.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Martin Lukáč
Název práce	Viry jako potenciální vektory u obilovin
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	ÚEB AVČR, Centrum strukturní a funkční genomiky
Vedoucí práce	Mgr. Miroslav Valárik, PhD.
Rok obhajoby práce	2019

Abstrakt V teoretické části této bakalářské práce byla napsána extenzivní rešerše ohledně plodiny *T. aestivum*, možností šlechtění této plodiny a také o viru Barley Stripe Mosaic Virus, který byl použit jako vektor pro tuto plodinu. V praktické části bakalářské práce byl proveden kompletní postup infekce *T. aestivum* virem BSMV; od samotné práce s plasmidy nesoucí tento virus, transformaci *E. coli* i *A. tumefaciens*, agroinfiltrace *N. Benthamiana*, fluorescenční mikroskopie až po samotnou imbibici semen *T. aestivum* virovým homogenátem a následné potvrzení infekce fluorescenční mikroskopii, díky reportérovému genu *gfp*, jež virus obsahoval a exprimoval.

Klíčová slova	Pšenice, vektor, BSMV, barley stripe mosaic virus, VIGS, VOX
Počet stran	54
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Martin Lukáč
Title	Viruses as potential vectors for cereals
Type of thesis	Bachelor
Department	Institute of Experimental Botany, Czech Academy of Sciences, Centre of Structural and Functional Genomics
Supervisor	Mgr. Miroslav Valárik, PhD.
The year of presentation	2019

Abstract

In the theoretical part of the thesis, an extensive research was written on the topic of wheat, the means of its improvement via breeding, and also about Barley Stripe Mosaic Virus, which was used as a vector for this crop. In the practical part of this thesis, the whole infection process was demonstrated; from the work with plasmids containing the virus, transformation of *E. coli* and *A. tumefaciens*, agroinfiltration of *N. benthamiana*, fluorescent microscopy, all the way to imbibition of wheat seeds and confirming of said infection by fluorescent microscopy, thanks to the *gfp* gene the virus contained and expressed.

Keywords	Wheat, vector, BSMV, barley stripe mosaic virus, VIGS, VOX
Number of pages	54
Number of appendices	0
Language	Czech, English

Cíle práce

Cílem teoretické části je vypracovat literární rešerši na téma pšenice, metod šlechtění a také o viru Barley Stripe Mosaic Virus.

Cílem praktické části je tyto znalosti aplikovat, otestovat, zda-li je možné infikovat pšenici virem BSMV, a také připravit materiály na další práci s tímto virem.

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Současný stav řešené problematiky	2
2.1 Pšenice a její význam pro lidstvo	2
2.1.1 Historie	2
2.1.2 Genom pšenice.....	3
2.2 Metody šlechtění plodin	4
2.2.1 Klasické metody	4
2.2.2 Genové inženýrství	7
2.2.3 Viry jako vektory pro genové inženýrství	12
2.3 Barley Stripe Mosaic Virus	14
2.3.1 Historie a význam	15
2.3.2 Role cis-elementů při replikaci a genové expresi	16
2.3.3 Regulace genové exprese.....	17
2.3.4 Struktura a funkce proteinů	18
2.3.5 Využití BSMV v rámci bakalářské práce	22
3. Experimentální část	23
3.1 Materiál.....	23
3.1.2 Biologický materiál	23
3.1.2 Laboratorní vybavení.....	24
3.1.3 Použité chemikálie a roztoky.....	24
3.2 Metody.....	25
3.2.1 Příprava plasmidové DNA.....	25
3.2.2 Elektroporace a kultivace	25
3.2.3 Ověřování konstruktů a extrakce a purifikace plasmidové DNA.....	25
3.2.4 Agarosová gelová elektroforéza:	27
3.2.5 Extrakce a purifikace plasmidů	28
3.2.6 Měření koncentrace plasmidové DNA	29
3.2.7 Elektroporace <i>A. tumefaciens</i>	30
3.2.8 Tvorba konzerv	30
3.2.9 Agroinfiltrace <i>N. benthamiana</i>	31
3.2.10 Fluorescenční mikroskopie – <i>N. benthamiana</i>	31
3.2.11 Příprava virového homogenátu.....	32
3.2.12 Imbibice <i>T. aestivum</i> a kultivace	32
3.2.13 Fluorescenční mikroskopie – <i>T. aestivum</i>	33

4. Výsledky a diskuse	34
4.1 Příprava a ověřování konstruktů.....	34
4.2 Agroinfiltrace <i>N. Benthamiana</i>	36
4.3 Infekce <i>T. Aestivum</i> BSMV-GFP	37
5. Závěr	40
6. Literatura.....	41

1. Úvod

Pšenice setá (*T. aestivum*) je travina z čeledi lipnicovitých, pěstována pro její semena, jejichž zpracované produkty jsou základní potravina pro velkou část světa.

Nároky na výnos pšenice se v posledních letech zvyšují ze dvou důvodů; změna klimatu postupně vede k navýšení průměrné teploty, což vede ke snížení výnosu (Zhao *et al.*, 2017). Další problém je trend růstu populace, v roce 2100 bude předpokládaný počet obyvatel až 16 mld (UN).

Klasické metody šlechtění již nejsou pro tyto účely dostačující, je tedy nutné využít moderní metody molekulární biologie, které ovšem mají výzvy, jež je nutno překonat. Genom pšenice byl rozluštěn teprve nedávno (IWGSC, 2018); mnoho genů má stále neznámou funkci, a pro jejich využití ve šlechtění odolnějších a výnosnějších kultivarů pšenice je nutné jejich funkci objevit.

K tomuto účely slouží funkční genomika, která využívá hlavně metody editace a v převážné míře umlčení genů jako jsou rekombinace, virus induced gene silencing (VIGS), tedy transientní zamezení translace genových transkriptů, či použití enzymů schopných pozměnit primární strukturu DNA např. TALENS, Cas9, zinc finger nukleasy, pro vytvoření knock-out (KO) mutantů.

Tato bakalářská práce se zabývá právě využitím virů jakožto vektorů pro VIGS, případně vektorů pro tyto enzymy.

2. Současný stav řešené problematiky

2.1 Pšenice a její význam pro lidstvo

Jak již bylo zmíněno, pšenice je jedním z klíčových zdrojů potravy pro valnou část světové populace. Jen v roce 2017 byla pšenice pěstována na 218 453 mil. ha, což ji dělá nejvíce pěstovanou plodinou, a výnosy byly až 771 milionů tun, což ji činí třetí nejvýnosnější plodinou, po kukuřici a rýži (Faostat).

2.1.1 Historie pěstování pšenice

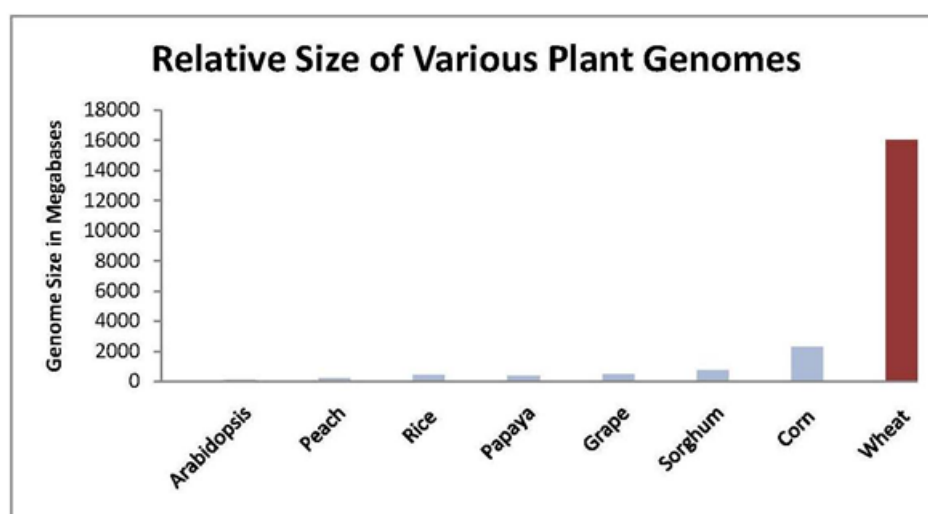
První kultivace Pšenice seté probíhala nejspíše mezi 8 000 – 10 000 lety př.n.l., jakožto součást Neolitické revoluce, tedy přechodu z lovu a sběračství na zemědělství. Avšak již před *T. aestivum* byly využívány druhy pšenice jako diploidní (AA) (einkorn) či tetraploidní (AABB) (emmer) a jejich příbuzenské vztahy naznačují, že původ pšenice je v jihovýchodní části Turecka (Heun *et al.* 1997). V 7 tisíciletí př.n.l. byla pšenice rozšířena do celého blízkého východu, kde se hlavně starověcí Egypťané zasloužili o rozvoj agronomie pěstování a šlechtění pšenice (Feldman, 2001).

Prvotní kultivary pšenice byly vyšlechtěny primárně selekcí z divokých populací; prvotní geny, jež byly selektovány a daly základ moderním kultivarům byly například mutantní gen *Br* (brittle rachis) (Nalam *et al.* 2006), který je zodpovědný za tříštění klasu a uvolnění semen či gen *Tg*, jehož mutace drasticky usnadnila vyláčení semen z klasu (Simons *et al.*, 2006).

Rozšíření pšenice po celém světě proběhlo postupně; do Evropy přes Anatolii do Řecka v 6 tis. př. n. l a následně přes Balkánský poloostrov (5 př. n. l.) do Podunají a zhruba ve stejném období do Itálie, Francie a Španělska. Do Velké Británie a Skandinávie byla pšenice rozšířena ve 3 tis. př. n. l.. Podobným způsobem se pšenice rozšířila přes Írán do střední Ásie, dosahující Číny 1. tis. př. n. l. a ve stejné době byla rozšířena do Afriky přes Egypt. Španělé přivezli pšenici do Mexika v roce 1529 a v Austrálii byla zavezena poprvé v roce 1788; v tomto bodě dobyla pšenice celý svět (Feldman *et al.*, 2001)

2.1.2 Genom pšenice

Genom pšenice je, v porovnání s ostatními plodinami, velmi rozsáhlý a komplexní. Velikost genomu je kolem 15,5 Gb (IWGSC 2018); což je 5x více než genom člověka a několikanásobně více než některé další plodiny (Obr. č. 1). Komplexitu genomu nezpůsobuje jen jeho čirá velikost, ale i skutečnost, že pšenice je alohexaploid, tedy její genom tvoří 3 sady chromosomů ze třech blízce příbuzných předků a také fakt, že 80-90 % genomu pšenice jsou repetitivní sekvence (IWGSC 2018).



Obrázek 1 Srovnání velikosti genomů různých rostlin. Jak je možné vidět, ve srovnání s běžnými plodinami má pšenice mnohonásobně větší velikost genomu. zdroj: coloradowheat.org

Pšeničný genom má celkem 42 chromosomů, které jsou ve třech sadách od třech různých předků (*T. urartu*, *Ae. speltooides*, *Ae. tauschii*), kdy každý přispěl 7 páry chromosomů. Pšenice má chromosomy jak homologní, tak homeologní, tedy s podobným obsahem, avšak nenáležící stejnému chromosomovému páru. Je odhadováno, že pšenice má 107 000 – 108 000 genů (IWGSC, 2018), zatímco například rýže má genů pouze 56 000 (http://rice.plantbiology.msu.edu/analyses_facts.shtml), což je téměř dvojnásobek genů, jejichž funkci je třeba objevit.

V této kapitole byl představen jak význam tak důležitost pšenice seté jakožto zdroj potravy pro lidstvo a jak již bylo zmíněno, jedna z největších výzev zemědělství je zvyšování výnosu plodin pro pokrytí potřeb rostoucí populace.

Pšenice setá v tomto není výjimkou, naopak vzhledem k její oblíbenosti a komplikovanému genomu je v moderním šlechtitelství středem zájmu, což dále ztěžuje fakt, že pšenici je dodnes velmi náročné šlechtit většinou moderních metod (He *et al.*, 2015).

2.2 Metody šlechtění plodin

Jelikož lidstvo, co se zemědělství týče, neustále čelí výzvám, jak ze strany prostředí (patogeny, abiotický stres) tak ze strany nároků člověka (rostoucí populace = nutnost vyšších výnosů), je nutné vylepšovat vlastnosti těchto plodin prostřednictvím šlechtění.

Šlechtění bylo prováděno již od počátku zemědělství, a postupem času se rozšiřovalo o nové a nové metody.

2.2.1 Klasické metody

Tato kapitola se bude věnovat především metodám netransgenním, tedy dochází zde k manipulaci DNA na úrovni genomu, ne na úrovni jednotlivých genů.

2.2.1.1. Selekcce

Tato, pravděpodobně nejstarší metoda, spočívá ve výběru vhodných jedinců z heterogenní populace. Ta je analyzována pro výhodné znaky (výnos, odolnost, snadná sklizeň) a tyto jedinci jsou dále propagováni. V následující generaci populace jsou nyní tyto znaky vykazovány, či alespoň přenášeny všemi jedinci. O několik generací později za používání této metody budou požadované znaky v populaci zafixované.

Moderní forma této metody je tzv. markery-asistovaná selekcce, kdy je využíváno molekulární analýzy pro výběr rostlin nesoucí žádané znaky, ale tyto znaky nemusí být viditelné pouhým okem (např. geny rezistence proti patogenům). Použití molekulárních metod tento proces podstatně urychluje.

2.2.1.2 Křížení

Při této metodě je jedna rostlina nesoucí žádoucí znak opylená druhou rostlinou, s jiným žádoucím znakem. Takto vznikne hybrid nesoucí geny obou rodičů. Gamety této rostliny mohou být následně použity pro další křížení.

Křížení je nejčastěji používáno pro kombinaci výhodných znaků dvou rostlin, avšak proces genetické rekombinace je náhodný, je tedy nutné tento proces provést skutečně mnohokrát aby se dosáhlo hybridu s maximem pozitivních a minimem negativních znaků obou rodičovských rostlin.

2.2.1.3 Mezidruhové křížení

Je vícero způsobů jak je tuto metodu provést; blízkce příbuzné druhy se mohou být opyleny navzájem a tím si vyměnit genetickou informaci, ačkoliv tento jev není příliš častý.

Avšak, za jistých podmínek mohou být geny z jednoho druhu v přírodě integrovány do genomu vzdálených příbuzných; pšenice setá nese některé geny ječmene, lilek brambor se také může křížit se vzdálenými příbuznými např. s *S. acaule* (Kozukue *et al.*, 1999).

Součástí této metody je i chromosomové inženýrství. Jedná se především o cytogenetickou manipulaci s nerekombinantní DNA (rDNA), kdy se úseky chromosomů blízkých či vzdálených příbuzných rekombinují za pomoci procesu zvaného chromosomální translokace. Sears byl průkopníkem využití této metody pro účely šlechtění, a tím umožnil plodinám nabývání dříve nezískatelných znaků.

V nedávné době se ovšem podařilo tento proces optimalizovat a omezit přenos nežádoucího genetického materiálu a místo toho se zaměřit konkrétně na gen zájmu (Lukaszewski, 2004). Díky této inovaci se chromosomové inženýrství stává více perspektivní, právě díky možnosti přenášet poměrně malé úseky DNA. Několik plodin (kukuřice, sója, rýže, ječmen či brambora) již bylo upraveny pomocí chromosomového inženýrství (Gupta a Tsuchiya, 1991)

2.2.1.4 Somatická hybridizace

Tato metoda spočívá v kultivaci rostlinných buněk, které jsou pěstovány v médiu a byly zbavené buněčných stěn za použití příslušných enzymů (pektinasy, cellulasy, hemicelulasy). Tyto buňky, protoplasty, jsou získány z různých zdrojů a následně jsou technikami jako například elektroporací, navzájem zfúzovány.

Jakmile dojde k fúzi buněk, následný somatický hybrid obsahuje genetický materiál obou rodičů. Tato metoda obchází fyzické bariéry, které se vyskytují u opylení, avšak ne chromosomální inkompatibilitu. Je-li somatický hybrid kompatibilní a

zdravý, je schopen regenerace, tedy tvorby nové buněčné stěny a buněčného dělení a nakonec vyrůst v hybridní rostlinu vykazující znaky obou rodičovských rostlin.

Ačkoliv fúze protoplastů není náročný proces, a většina živočichů a rostlin má buňky schopné tohoto procesu, málokterý organismus je schopen následné regenerace a sexuální reprodukce.

Tato metoda není příliš častá, jelikož vzniklé hybridy příliš nepřesahují to, co je běžně dosažitelné konvenčními metodami šlechtění.

2.2.1.5 Somaklonální variace

Takto se nazývají spontánní mutace, které vzniknou, pokud jsou buňky kultivovány *in vitro*. Od počátku používání této metody bylo zjišťováno, že takto vykultivované rostliny vykazovaly nové znaky. V 80. letech minulého století si tohoto všimli (Larkin a Scowcroft, 1981), kdy došli k závěru, že tento fenomén může být nový zdroj genetické rozmanitosti, a tudíž poskytovat rostliny s cennými znaky pro šlechtitele.

Od té doby se tato metoda používala specificky pro získání regenerantů s potenciálně významnými znaky, u celé škály rostlinných zdrojů. Vzniklo několik nových kultivarů, například u lnu, které byly následně i komerčně prodávány (Krishna *et al.*, 2016).

Tato metoda je sice stále používána, obzvláště v rozvojových zemích, ale ve většině případech byla nahrazena lépe předvídatelnými metodami genetického inženýrství.

2.2.1.6 Chemická a RTG mutageneze

Již v roce 1928 bylo zjištěno, že vystavení plodin radiaci má za následek rozmanité fenotypové variace (Stadler, 1928)

Princip této metody spočívá ve vystavení rostlin/semín fyzikálním (např. γ záření) či chemickým mutagenům (např. EMS) jež má za následek mutace v genomu.

Různé mutageny mají různě devastující účinky na genom; je nutné použít přiměřenou dávku, a zvolit vhodný mutagen aby byla zachována viabilita rostlin.

Pokud je použita přiměřená dávka mutagenů, vyústí to v náhodné mutace, ale nedojde k usmrcení organismu. Typicky je vystaveno mutagenům velké množství

semen, které následně vyklíčí, vyrostou a poskytnou potomstvo. U potomstva je následně zkoumán fenotypový projev pro potenciálně cenné znaky.

Stejně jako u somaklonální variace, většina mutací jsou škodlivé a je pouze otázkou náhody, jestli vzniknou nějaké mutace, které budou užitečné. Kromě dávky a typu mutagenu není jinak možné regulovat množství mutací, natož cílit konkrétní znaky, či geny. Mutageny působí náhodně skrze genom, a ačkoliv je většina mutací neutrální či škodlivá, mohou se vyskytnout i jedinci s mutacemi prospěšnými. Jakmile je identifikována prospěšná mutace, je možné zpětným křížením minimalizovat až odstranit vzniklé škodlivé mutace. A ačkoliv je možné do jisté míry negativní dopady této metody odstranit, s vysokou pravděpodobností ve vzniklém kultivaru budou změny DNA, které zůstanou nepovšimnuty, což by mohlo vést ke komplikacím při dalším šlechtění.

Celosvětově, více než 2 300 kultivarů bylo vytvořeno mutagenezí (Faostat) a zhruba polovina byla vytvořena za posledních 15 let. V USA byly různé plodiny (od pšenice po grepfruit) modifikovány mutagenezí již od 20. let minulého století. V Česku byl takto například vytvořen nový kultivar ječmene Diamant, odolný proti poléhavosti.

2.2.2 Genové inženýrství

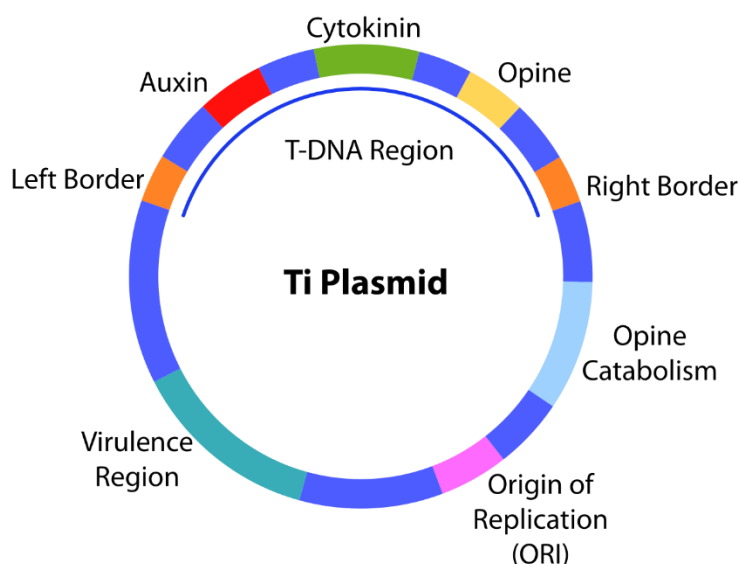
Také známé jako transformace rostlin, jedná se zpravidla o metody vnášení DNA zájmu která se v rostlině dříve nevyskytovala. Tato metoda má dva předpoklady; je nutné izolovat gen zájmu a vytvořit funkční konstrukt nesoucí tento gen a zajistit jeho případnou integraci do genomu (pro stabilní transformaci). Rostlina také musí být schopná regenerace, jelikož většina těchto metod se provádí buďto na pletivových kulturách či protoplastech. Pro většinu kultivarů pšenice je regenerace velmi obtížná; což je jedna z výzev šlechtitelů do budoucna.

V této kapitole zahrnu i viry, jakožto možné vektory pro DNA zájmu do pšenice, i jejich potenciál do budoucna.

2.2.2.1 Agrobacteriem zprostředkovaná transformace

Agrobacterium tumefaciens je půdní bakterie, nejlépe známá za způsobování nádorovitých útvarů v jeho hostitelích, tzv. crown gall tumor. Mechanismus vzniku této choroby je spočívá v tzv. Ti (tumor inducing) plasmidu; cca 200 kb velký plasmid jež obsahuje klíčovou T-DNA oblast (transfer DNA). Ti plasmid obsahuje

tzv. *vir* geny, které jsou zodpovědné právě za přenos T-DNA do poraněné hostitelské rostliny. T-DNA obsahuje geny pro syntézu auxinů a cytokininů, jež fungují jako onkogeny zodpovědné za tvorbu nádorovitých útvarů a také geny pro syntézu opinů, které slouží jako zdroj potravy pro *Agrobacterium*. V 80. letech 20. stol. byly vytvořeny kmeny *A. tumefaciens*, které neměly geny způsobující onemocnění, ale měly schopnost přenášet a integrovat do hostitele DNA.



Obrázek 2 Ti Plasmid *A. tumefaciens*. Jak je na obrázku demonstrováno, T-DNA oblast je ohraničena levou (LB) a pravou (RB) hranicí. Tato oblast obsahuje geny pro syntézu auxinu a cytokininů, jež v hostitelských buňkách fungují jako onkogeny, a také oblast pro syntézu opinů, přičemž opiny slouží jako zdroj energie pro *Agrobacterium*. Mimo T-DNA oblast je oblast ORI, oblast genů pro opinový katabolismus, a také oblast s geny virulence, tedy *vir* geny. zdroj: en.wikipedia.org.

Nahrazením patogenní DNA konstruktem nesoucí rezistenci bylo možné vytvořit nové kmeny *A. tumefaciens*, které jsou schopny integrovat onen gen zájmu do genomu hostitelské rostliny. Pokud by tyto transformované buňky byly regenerovány v celou rostlinu, všechny buňky z této zregenerované rostliny budou stabilně transformované, stabilně nesoucí a exprimující nový gen. *A. tumefaciens* jako prostředek pro transformaci rostlin je zodpovědné za většinu komerčně dostupných geneticky modifikovaných (GMO) plodin.

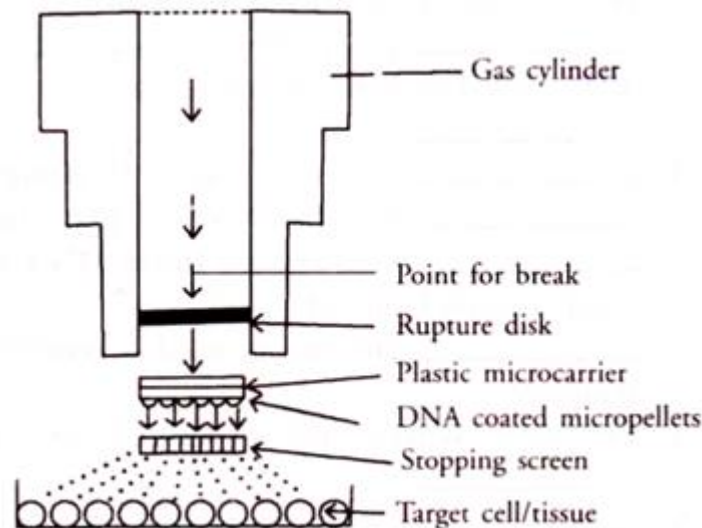
Velká výhoda této metody je fakt, že přirozeně infikuje poměrně širokou škálu dvouděložných rostlin, jedná se tedy o metodu poměrně spolehlivou. Transformovaná DNA je stabilně integrována do genomu a konstrukty, jež *Agrobacterium* transformuje mohou být poměrně velké.

Zásadní nevýhodou je neschopnost *A. tumefaciens* infikovat většinu kultivarů pšenice, a také je zapotřebí schopnost rostliny zregenerovat z prostoplastů nebo tkáňové kultury, kde se transformace standardně provádí. (Bradshaw, 2018)

2.2.2.2 Genové dělo

První pokusy s touto metodou byly provedeny již v roce 1988 (Klein *et al.*, 1988) a první experiment byl proveden použitím výbušné složky pro vystřelení dsDNA navázanou na wolframové částice ve vysoké rychlosti do cílového rostlinného materiálu, kde byla DNA uvolněná do buňky a mohla se integrovat do rostlinného genomu (Slater *et al.* 2008).

Tato metoda byla postupem času optimalizována, a nyní jsou komerčně vyráběné, Heliem poháněné přístroje – genové děla – běžně používané pro transformaci rostlin.



Obrázek 3 Schéma genového děla, zdroj: www.biologydiscussion.com. Princip této metody spočívá v návázání DNA zájmu na mikroskopické kuličky inertního kovu (zlato, wolfram). Tyto kuličky (mikropelety) se vloží na tzv. mikronosičovou membránu (microcarrier), která se nachází nad tzv. stopping screen, jež slouží k zastavení mikronosiče, zatímco propustí mikropelety na rostlinný materiál. Nad tímto se nachází ruptur disk, jež vypustí (protržením) He pod vysokým tlakem až poté, co tlak přesáhne určitou hodnotu, a tím vystřelí makro i mikropelety pod dostatečně vysokým tlakem pro penetraci rostlinné tkáně, kde následně může dojít k expresi konstruktů a případné integraci konstruktů do genomu rostlinné tkáně.

Většina rostlinné tkáně pro tyto experimenty jsou pletivové kultury, u kterých je po transformaci vyvolána embryogeneze, avšak je možné transformovat i listy dospělých rostlin, je-li třeba pouze ověřit konstrukt.

Ačkoliv je tato metoda používána primárně pro transformaci nukleárního genomu, je možné transformovat i plastidy pro transformované chloroplasty, pro vysokou genovou expresi a syntézu proteinů, ale také pro zamezení šíření těchto genů mezi ostatní rostlinné druhy.

Touto metodou je možné transformovat velmi širokou škálu rostlinných druhů, včetně pšenice a tato transformace je poměrně rychlá a nenáročná, avšak je zde nutnost regenerace transformovaných buněk, je-li cílem mít transformovanou rostlinu.

2.2.2.3 Elektroporace

U této metody dochází k použití elektrického výboje, který umožní protoplastům přijmout makromolekuly z roztoku, ve kterém se vyskytují. Za použití příslušných enzymů dochází k narušení, až kompletnímu odstranění buněčné stěny rostlinné buňky a tedy ke vzniku protoplastu. Vložením konkrétní DNA molekuly do tekutého média s protoplasty a následném elektrickém impulsu dojde k destabilizaci buněčné membrány, což umožní DNA vstoupit do buňky. Tyto transformované buňky mohou následně zregenerovat své buněčné stěny a za ideálních podmínek regenerovat na celou rostlinu a zplodit potomstvo. Omezení této metody spočívá v neschopnosti regenerace mnoha rostlinných kultivarů a druhů.

2.2.2.4 CRISPR-Cas9 nukleasa

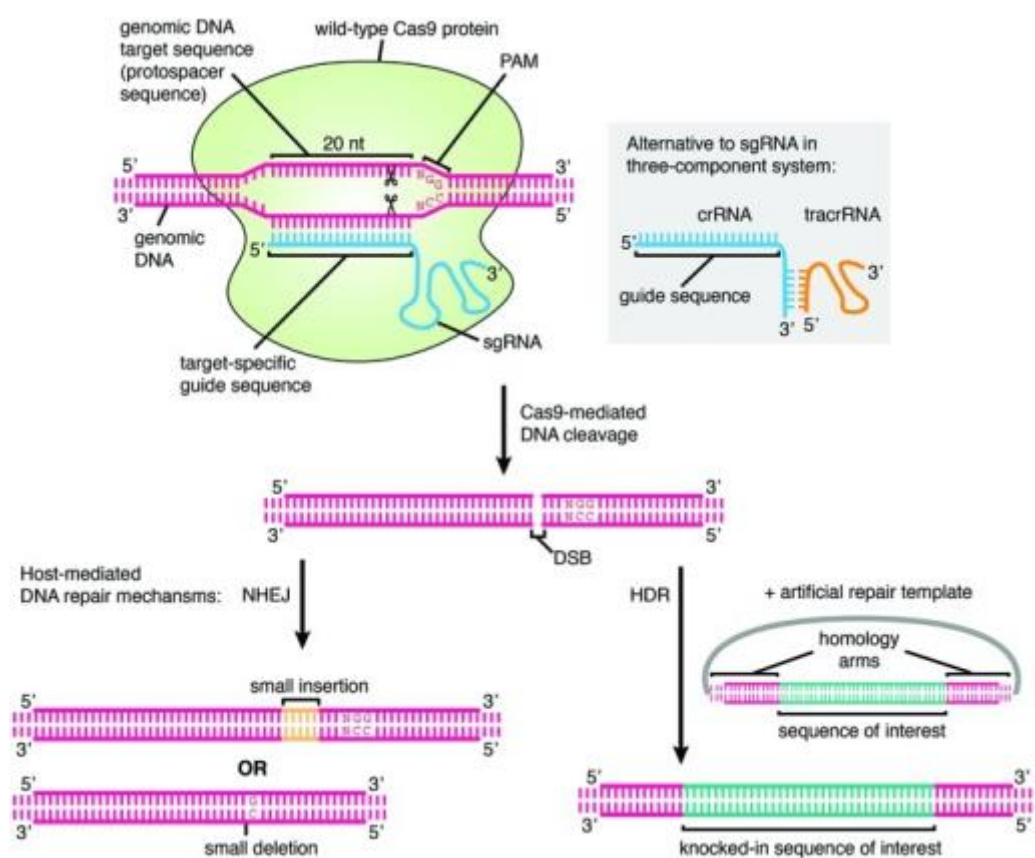
Type II Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat (CRISPR/Cas9) je systém, poprvé objeven v bakterii *Streptococcus pyogenes*, který umožňuje na specifickém místě v genomu způsobit dvouvláknový zlom. Jeho původní funkce byla adaptivní imunitní systém bakterií a archeí, který je chránil před cizorodou (většinou virovou) dsDNA, štepěním na specifických místech.

V roce 2012 byl tento systém adaptován, aby mohl štepit konkrétní místa zájmu v genomu (Jinek *et al.*, 2012)

Tento systém se skládá z monomerického proteinu, Cas9 a chimérické guide RNA (gRNA), která se váže na cílovou DNA sekvenci, jež má být štěpena. Chimérická RNA kombinuje CRISPR RNA (crRNA) pro cílovou specifitu a trans-aktivující CRISPR RNA (tracrRNA), která strukturu stabilizuje a aktivuje Cas9, aby bylo možné štěpení dsDNA sekvencí, zvané protospacery.

Sekvenční specifita je zajištěna 20nt sekvencí v gRNA, z níž tzv. „seed“ sekvence o cca 12 nt je považována za obzvláště důležitou pro párování mezi RNA a cílovou DNA. Přítomnost „protospacer-adjacent motif“ (PAM) po směru sekvence od cílové DNA je esenciální pro štěpení Cas9. PAM je buďto 5'-NGG-3' či méně často 5'-NAG-3'.

Cas9 i funkční gRNA mohou být do buněk dopraveny přímo či mohou být připraveny transgenní rostliny s Cas9 i gRNA na rozdílných chromosomech od cíleného lokusu, aby bylo možné je odstranit segregací.



Obrázek 4 Mechanismus editace genomu pomocí CRISPR-Cas9. Zde jsou popsány dva typy opravných mechanismů poškozené DNA; non-homologous-end-joining (NHEJ), jež často vytváří malé indely a homology directed-repair (HDR), která umožňuje vytvářet tzv. knock-in mutanty zdroj: <https://openi.nlm.nih.gov/>

Účinek Cas9 spočívá ve tvorbě dvouvláknových zlomů, jež jsou buněčnými mechanismy opraveny velmi často chybně (obr. č. 4), čímž většinou dochází k posunutí otevřeného čtecího rámce a k efektivnímu vyřazení genu (KO).

Tato metoda je považována za velmi oblíbenou a přesnou formu editace genomu, jež může značně urychlit šlechtění plodin vlivem předvídatelných a relativně precizních mutací v již elitních kultivarech.

Několik znaků může být modifikováno najednou, jelikož může být použito zároveň několik gRNA s rozdílnými sekvencemi, které vytvoří s Cas9 komplexy editující různé lokusy téměř současně.

Zářným příkladem budiž Wang (*et al.*, 2014), jež současně zacílil tři lokusy odolnosti proti padlí (*MLO*) v hexaploidní pšenici, čímž úspěšně vyřadil tři *MLO* homoalely, a vytvořil rostliny s rezistencí proti padlí (Bradshaw, 2018).

2.2.3 Viry jako vektory pro genové inženýrství

Rostlinné viry jsou velmi rozmanité, nebuněčné organismy, které se vyznačují subcelulárním parazitismem pro svou reprodukci. Ačkoliv je druhů virů velké množství a to obnáší i rozdíly v replikaci, jejich obecný replikační mechanismus spočívá v infekci hostitele svou genetickou informací (můžou být DNA i RNA v různých formách) a následném využití buněčné mašinerie svého hostitele pro svou reprodukci a šíření mezi buňkami.

Těchto vlastností, tedy plošného šíření v buňkách hostitele a vysoké exprese virových proteinů začali postupem času využívat vědci pro vysokou transientní expresi DNA zájmu v hostitelských rostlinách. Tímto vznikly metody transientní (v některých případech i stabilní) transformace, jež posunuly disciplínu funkční genomiky na další úroveň.

V této kapitole budou shrnuty tři hlavní metody využití viru jakožto nositele genetické informace zájmu pro účely funkční genomiky.

2.2.3.1 Virus-mediated overexpression

Též zkracována na VOX, v této metodě se do genomu viru vloží gen zájmu a následně je tento modifikovaný virus přenesen do hostitele. Transgenní vir se šíří celou rostlinou a posléze ve vysoké míře exprimuje gen zájmu, kdy je možné sledovat vliv tohoto proteinu na hostitelskou rostlinu. Poměrně často se tato metoda využívá pro studium genů rezistence v rostlinách. Ačkoliv je tato metoda oproti stabilní transformaci podstatně rychlejší, hlavní limitující faktor této metody je

poměrně malá kapacita většiny virových vektorů, ačkoliv v poslední době se funkční kapacita těchto virových vektorů v případě pšenice navýšila až na 2,5 kb (Houde a Cheuk, 2017).

2.2.3.2 Virus-induced gene silencing

Neboli VIGS, tato metoda využívá RNA-umličovacích mechanismů hostitelské rostliny. Do genomu RNA viru je vložen fragment genu hostitele (většinou pár set bp) v sense či antisense orientaci, ale je možné též vytvořit RNAi konstrukt, tedy gen imitující *mir* geny hostitele, avšak specificky cílený na konkrétní gen.

V bodě, kdy je RNA viru v dvouvláknové konformaci (dsRNA viry či replikující se ssRNA viry), je tato RNA napadána DCL proteiny, které RNA rozštěpí na 21-23bp fragmenty, které jsou následně dále integrovány do RISC komplexů, a komplementárně nasedají (a dále štěpí) virovou RNA.

Jelikož je ve virové RNA zahrnut i fragment genu hostitele, RISC komplexy s touto naštěpenou RNA následně napadají komplementární transkripty hostitelské mRNA a dochází k štěpení, a tedy umlčování tohoto cílového genu formou PTGS.

Tato metoda je velmi praktická z hlediska funkční genomiky pro studium absence konkrétních proteinů a jejich vlivu na funkci rostliny.

Ačkoliv je tato metoda velmi rychlá, nesdílí zásadní nevýhodu s VOX, jelikož tyto inserty bývají oproti VOX podstatně menší. (Yuan *et al.*, 2011)

2.2.3.3 Host-induced gene silencing

Zkráceno na HIGS, princip je částečně podobný VIGS, avšak do genomu viru se vkládá gen konkrétního patogenu hostitele, např. *B. graminis*. Virus, který napadne rostlinu poskytuje rostlině siRNA, kterou je možno použít proti samotnému patogenu. Ačkoliv tato metoda funguje a umožňuje studium hostitel-patogen, mechanismy výměny siRNA mezi patogenem a hostitelem dosud nejsou plně známé. (Qi *et al.*, 2019)

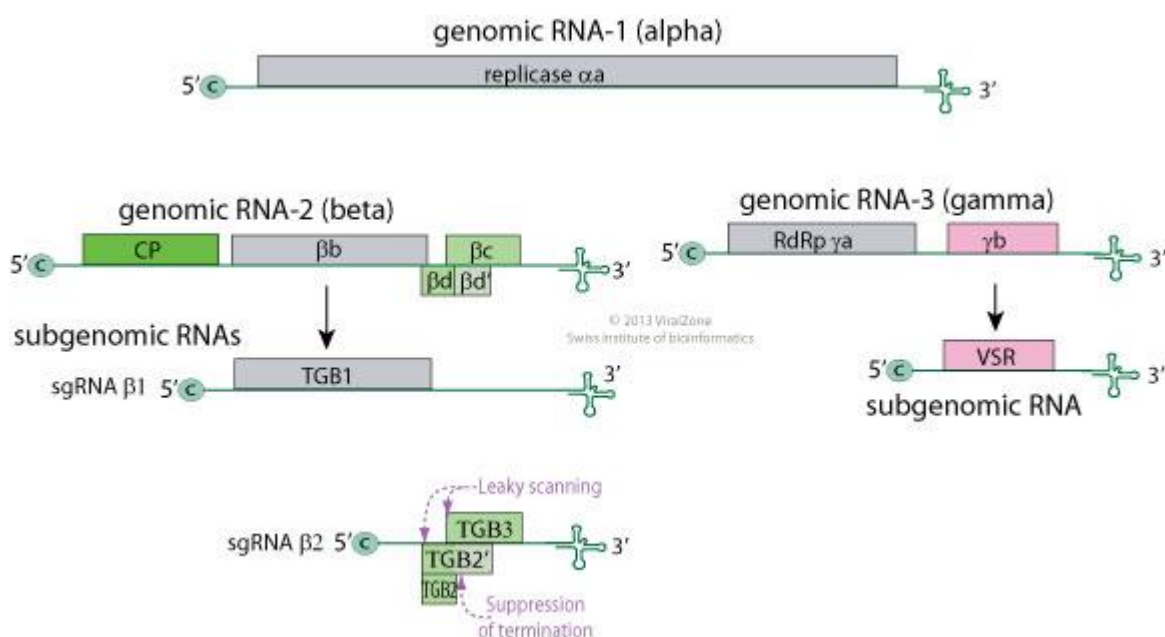
V této kapitole byl stručně shrnut princip virální replikace a jejího využití pro funkční genomiku v rostlinách. Pro účely funkční genomiky v pšenici je na výběr mnoho virových vektorů, nicméně po rozsáhle rešerši bylo shledáno, že pro účely této bakalářské práce bude nejvhodnější Barley Stripe Mosaic Virus, kterému se bude věnovat následující kapitola.

2.3 Barley Stripe Mosaic Virus

Tato kapitola se bude zabývat virem Barley Stripe Mosaic Virus. Bude zde probrána jeho historie, významu, ale především genomu, jelikož pro účely editace genomu tohoto viru je znalost genomu (včetně nepřekládaných (UTR) oblastí) kritická.

Jedná se o virus patřící do rodiny *Virgaviridae*, virion se skládá ze tří lineárních jednovláknových RNA v pozitivním směru (ss(+))RNA podjednotek o velikosti 3,8 kilobází (kb) (α), 3,3 kb (β) a 2,9-3,3 kb (γ) (Gustafson *et al.*, 1986; Gustafson *et al.*, 1987; Gustafson *et al.*, 1989). 5' nepřekládaná oblast (UTR) se vyznačuje G čepičkou (Savenkov *et al.*, 1998) a ve virionu je celkem 7 otevřených čtecích rámců (ORF), kódující proteiny Gustafson *et al.*, 1986, Gustafson *et al.*, 1989).

Většina proteinů je kódována přímo z genomické gRNA, avšak proteiny Triple Gene Block (TGB) jsou kódovány ze subgenomických RNA značených subgenomická (sg)RNA β 1 a sgRNA β 2 (Zhou *et al.*, 1996), což také platí pro protein γ b, jež je kódován ze sgRNA γ .



Obrázek 5 Popis genomu jednotlivých podjednotek BSMV. Je možné zde vidět jednotlivé podjednotky, α , β a γ a jednotlivé proteiny a také subgenomické RNA (sgRNA) které tyto podjednotky kódují. Je zde také vysvětlen mechanismus transkripce TGB proteinů zdroj: expasy.org

Přenos viru mezi hostiteli se děje primárně dvěma způsoby a to vertikálně, přenosem semen či horizontálně mechanicky např. třením listů (Hagborg, 1954). Virus nemá žádného známého přenašeče. Další možná metoda přenosu je šíření pylem (Jackson *et al.*, 1989), což by mohla být efektivní metoda pro rozšíření viru na nová místa, avšak v polních studiích ani v laboratoři nebyla přítomnost viru v pylu prokázána, tudíž se pravděpodobně nejedná o významný faktor pro přenos viru. (Slack *et al.*, 1975)

Třebaže nebylo nashromážděno dostatek informací ohledně míst replikace pro BSMV, dochází při jeho infekci k zásadním změnám morfologie chloroplastů, včetně formace aberantních proplastidů, narušení gran a ke vzniku malých vezikul na povrchu chloroplastů (Jackson a Lane, 1981; McMullen *et al.*, 1978). Další výzkum za použití dsRNA-specifických antiser potvrdil, že proplastidové vesikuly v kořenech infikované pšenice obsahují dsRNA, která je pravděpodobně spojena s replikací BSMV.

2.3.1 Historie a význam

První zmínky o BSMV byly již v roce 1924 (Jackson a Lane, 1981), kde bylo spekulováno, že nakažené rostliny ječmene mají nákazu virového původu. Mimo nákazu ječmene se také prokázalo, že BSMV je schopen infikovat a rozmnožovat se v ovsi a pšenici, třebaže s menší účinností než-li v ječmeni (Jackson a Lane, 1981), avšak nedávné studie za použití citlivějších metod naznačují nejen větší distribuci ale i mnohem větší dopad BSMV, než se původně předpokládalo (Koklu, 2004; Kumari *et al.*, 2006; Najjar *et al.*, 2000).

Již brzké studie tohoto viru poukázaly na velkou diversitu rodu *Hordeivirus*, jednotlivé izoláty se lišily v symptomech, účinnosti přenosu semen a schopnosti infikovat širokou škálu. Dále tyto (a pozdější) studie poukázaly na fakt, že virus je zodpovědný za poměrně rozsáhlé ztráty na výnosu ječmene po celém světě, což je mj. způsobenou jeho schopností se plošně šířit (Carroll, 1986). Jelikož je přenos semen hlavní faktor rozmnožování u BSMV, citlivé diagnostické metody umožňují selekci infikovaných semen a jejich následné odstranění ze zásob, čímž se zamezuje dalšímu šíření. (Carroll, 1980; Carroll, 1986). Právě díky tomuto se v zemích s moderními zemědělskými metodami výskyt BSMV zásadně snížil, avšak

v zaostalejších zemích je tento virus stále problém (Najar *et al.*, 2000, Kumari *et al.*, 2006).

2.3.2 Role cis-elementů při replikaci a genové expresi

Ačkoliv byly 5' a 3' UTR již osekvenované, nejsou jejich funkce stále plně známé. Jak již bylo zmíněno, 5' UTR se vyznačuje m⁷Gpp čepičkou, což bylo poprvé zjištěno purifikací BSMV RNA (Agranovsky *et al.*, 1979) a následně potvrzeno sekvenční analýzou 5' konců jednotlivých gRNA (Gustafson *et al.*, 1986; Gustafson *et al.*, 1989; Gustafson *et al.*, 1987). Experimentální použití m⁷Gpp analogu blokuje translaci, což dále tuto hypotézu potvrzuje (Agranovsky *et al.*, 1992). Dále se ukázalo, že G čepičky jsou esenciální pro infekci BSMV RNA transkriptů transkribovaných z cDNA klonů a dále se výskyt těchto ukázal i u sgRNA. (Petty *et al.*, 1989, Zhou a Jackson, 1996a) Můžeme tedy usoudit, že pro funkci BSMV je G čepička esenciální.

Po 5' G čepičce následují v jednotlivých RNA 5' UTR 89-90nt sekvence které si nejsou mezi sebou nijak sekvenčně podobné (Gustafson *et al.*, 1986; Gustafson *et al.*, 1989; Gustafson *et al.*, 1987; Hagborg, 1954). Tyto sekvence pravděpodobně fungují jako cis-elementy které regulují translaci a relativní míru syntézy nových gRNA (Jackson *et al.*, 1991). Velikou zajímavostí je fakt, že prvních 70 nt izolátu BSMV CV17 RNA_γ je identických s příslušnou RNA_α. Příčina tohoto jevu se přisuzuje pravděpodobné rekombinaci mezi těmito dvěma podjednotkami (Edwards *et al.*, 1992). Studie tohoto izolátu a podjednotky RNA_γ izolátu Type, který má homologní 366 nt tandemovou repetici, jež zvyšuje velikost αa proteinu, poskytují přesvědčivé důkazy že RNA delece, duplikaci či rekombinace hrají zásadní roli v evoluci Hordeivirů (Edwards *et al.*, 1992; Gustafson *et al.*, 1987).

Zatímco 5' UTR se vyznačují G čepičkami, 3' UTR gRNA mají sekundární strukturu a biochemické vlastnosti shodné s tRNA (Agranovsky *et al.*, 1992; Jackson *et al.*, 1989, Savenkov *et al.*, 1998; Solovyev *et al.*, 1996). Tyto tRNA sekvence jsou u všech RNA podjednotek shodné.

tRNA oblasti a kódující sekvence jsou od sebe rozděleny krátkou (cca 20nt) polyA sekvencí, kdy první dva A jsou součástí UAA terminační kodonu u posledního genu. (Jackson *et al.*, 1989, Solovyev *et al.*, 1996)

Ačkoliv se polyA sekvence vyskytuje u všech izolátů BSMV, důkazy naznačují, že není esenciální pro replikaci. BSMV RNA α a γ s rekombinantní RNA β molekulou s chybějící polyA sekvencí se replikovaly s téměř stejnou účinností jako wild type (WT) RNA β bez regenerace adenylátových zbytků. Další data ukázala, že BSMV RNA, kde byla polyA sekvence odstraněna RNAsou nebyla infekční, avšak po ligaci s tRNA strukturou byla schopna infikovat ječmen. (Tyulkina *et al.*, 1987). Třebaže tyto RNA s odstraněnou polyA sekvencí byly infekční a systemicky se šířily rostlinou, extrahované vzorky virů měly polyA sekvenci zregenerovanou, což může naznačovat, že polyA sekvence poskytuje evoluční výhodu v rámci systémového pohybu.

2.3.3 Regulace genové exprese

5' UTR regiony předcházející ORF jednotlivých RNA jsou specifické pro každou podjednotku (Jackson *et al.*, 1989; Savenkov *et al.*, 1998; Solovyev *et al.*, 1996), avšak je známo pouze malé množství informací ohledně jejich role v genové expresi. Zdá se, že účinnost translace příslušných proteinů závisí právě na translační účinnosti příslušných 5' UTR jednotlivých gRNA (Jackson *et al.*, 1991). 5' UTR RNA γ některých izolátů BSMV kódují krátký ORF který přispívá k patogenicitě a vaskulárnímu pohybu virionů (Petty *et al.*, 1990). Tyto ORF nejspíše ovlivňují fenotyp snížením translační účinnosti γ a proteinu tím, že translace je iniciována AUG kodónem krátkého ORFu což znemožňuje 40S podjednotkám nasednout na γ a iniciační kodón. Předpokládá se, že agresivnější fenotypy vznikají nukleotidovými substitucemi které tyto iniciační kodony modifikují (Petty *et al.*, 1990).

Tři překrývající se TGB pohybové proteiny a γ b proteiny jsou exprimovány z sgRNA které se vytvoří během infekce. TGB proteiny jsou translatovány ze dvou 3' koterminálních sgRNA, přičemž větší sgRNA tvoří TGB1 zatímco menší (a méně četná) sgRNA tvoří TGB2 a 3, místy za vzniku TGB2'. Experimenty s BSMV v protoplastech naznačují, že sgRNA β 1 a sgRNAB2 jsou exprimovány v poměru zhruba v poměru 10:1 v infikovaných protoplastech, zatímco sgRNA γ je konstantně exprimována na vysoké úrovni (Johnson *et al.*, 2003; Zhou a Jackson, 1996b). Nejčetnější protein, TGB1, je exprimován z 5' proximálního ORF sgRNA β 1 a je zhruba 10x četnější než-li TGB2. Malý p23 protein je taktéž exprimován translačním pročením stop kodónu, ale tento protein není považován jako důležitý pro infekci. Konečný poměr jednotlivých TGB proteinů vlivem transkripční a translační regulace

je zhruba 100:10:1 pro TGB1:TGB2:TGB3. Ačkoliv se TGB geny vyskytují v několika jiných virech, porovnání TGB promotorů s těmito viry neukázalo žádnou evoluční příbuznost v sekvenci či sekundární struktuře.

Delineace hranic sgRNA promotorů byly určeny v protoplastech pomocí mutací, delecí a posouváním promotorů v gRNA β a gRNA γ (Johnson *et al.*, 2003). Bylo zjištěno, že sgRNA β promotory sídlí proti směru od počátku místa transkripce. BSMV sgRNA β 1 se vyskytuje od -29 po -2 od počátku místa transkripce, a tato oblast je shodná pro vnítní cis-element nutný pro replikaci RNA β (Zhou a Jackson, 1996a). sgRNA β 2 sídlí na místech -32 až -17 od start kodonu příslušné RNA. Aktivita sgRNA β 2 je dále umocněná hexanukleotidem vyskytujícím se na místech -64 až -59 od počátku transkripce. sgRNA γ promotor se liší od RNA β promotorů tím, že zasahuje až do AUG γ b proteinu. Tento promotor zabírá pozice -21 až +2 od místa transkripce, a zjevně se nevyskytuje v oblastech ovlivňující replikaci či neobsahuje enhancer sekvenci.

2.3.4 Struktura a funkce proteinů

O struktuře proteinů exprimovaných BSMV bylo nashromážděno již mnoho dat. Bylo prokázáno, že všechny tři genomické RNA jsou esenciální pro infekci rostlin, a že RNA α a γ se mohou replikovat v protoplastech (Petty *et al.*, 1990). Tyto objevy naznačují, že RNA β je zodpovědná za pohyb virionů, a další experimenty prokázaly, že β a protein (CP) je postradatelný pro systemickou infekci a že pohyb mezi buňkami a pohyb cévami nevyžaduje účast virionů (Petty a Jackson, 1990). Nicméně, každý z TGB proteinů je nepostradatelný pro lokální i systemický pohyb v rostlinách (Lawrence a Jackson; 2001, Petty a Jackson, 1990), až na p23 protein. Analýzy RNA γ delečních mutantů prokázaly, že γ b protein není nezbytný pro systemický pohyb, ačkoliv jeho absence poskytuje fenotypy s omezenou replikací a pohybem (Petty *et al.*, 1990). Další výzkum prokázal, že γ b silně potlačuje umlčování genů, což vysvětluje jeho efekt na patogenezí viru. (Bragg a Jackson; 2004, Yelina *et al.*, 2002).

2.3.4.1 α a a γ a geny

α a a γ a proteiny jsou oba esenciální součástí RdRp zodpovědné za replikaci. Afinitní chromatografii bylo zjištěno, že α a protein frakcionuje s histidin-označeným γ a získaného z nakaženého ječmene; vypadá to tedy, že tyto proteiny spolu úzce

interagují. (D. Lawrence a A. Jackson, nepublikované výsledky). Tento komplex vykazuje BSMV RNA specifickou polymerasovou aktivitu a netvoří blízké interakce s jinými proteiny BSMV. Tyto data, doplněné experimenty s mutagenézí, naznačují, že tyto dva proteiny jsou jediné komponenty asociované s replikací a poskytují biochemické důkazy, že tyto dva proteiny interagují *in vivo*, formující replikasový komplex. Je možné, že součástí tohoto komplexu jsou i některé hostitelské proteiny, avšak tyto proteiny doposud nebyly identifikovány. Hordeivirové aa proteiny jsou zhruba o velikosti 130kD a obsahují N-terminální methyltransferasovou a C-terminální helikasovou doménu, které jsou příbuzné s RdRp proteiny Sindbis-podobným virům (Koonin *et al.*, 1993).

Methyltransferasová doména nejspíše funguje jako poskytovatel m⁷Gpp čepičky, a helikasová doména je pravděpodobně zodpovědná za rozvolnění dsRNA během replikace a transkripce. Mimo jiné, pantová doména o délce asi 80 *aa* mezi methyltransferasovou a helikasovou doménou patrně poskytuje flexibilitu pro fyzikální interakci obou domén. (Savenkov *et al.*, 1998)

Ya protein je zodpovědný za tvorbu polymerasové podjednotky, jehož hlavním znakem je GDD polymerasový motiv vyskytující se na C-konci proteinu. Velikost γ RdRp BSMV se liší mezi 71-87 kD, přičemž největším faktorem je 350-380nt duplikace tandemových repetitivních RNA γ , které pravděpodobně byly zapříčiněny RNA rekombinací. (Gustafson *et al.*, 1987; McFarland *et al.*, 1983).

2.3.4.2 CP Protein

Obalový protein (CP) o velikosti 22 kDa je překládán přímo z gRNA β a je nejčastější ze všech virových proteinů v infikovaných rostlinách (Gustafson *et al.*, 1981). CP interaguje s gRNA za vytvoření tyčovitých částic, které obsahují 3 nt na jednotku CP, což vychází na cca 24 jednotek CP na jedno otočení šroubovice.

Bylo prokázáno, že CP není esenciální pro infekci a šíření v dvou hostitelích (*H. vulgare* a *N. Benthamiana*) či druhu *Chenopodium*, kde jsou tvořeny lokální léze. (Lawrence a Jackson; 2001, Petty *et al.*, 1990). Mimo jiné, infekce CP mutantů jsou zdánlivě agresivnější než u WT, a fenotyp infekce je o poznání výraznější a déle trvající v ječmeni. Rostliny nakažené CP mutanty jsou zakrnělé a nedostávají se do zotavovací fáze, která se běžně vyskytuje u ječmene nakaženým wtBSMV.

CP, podle všeho, nemá schopnost potlačovat RNAi aktivity hostitele (H-S. Lim, M. deBoer, J. Bragg & A. Jackson, nepublikované výsledky), což naznačuje, že mimo tvorbu virionů může CP snižovat míru replikace skrze mechanismy zpětné vazby, než-li přes potlačování RNA umlčování.

Během ukončení replikačního cyklu se velké množství CP jednotek váže ke gRNA za tvorby virionů, kde mj. CP může v tomto bodě zastávat i roli regulátoru replikace a mezibuněčného pohybu, což je také naznačováno neschopností CP mutantů vstoupit do chronické fáze infekce. (Petty *et al.*, 1990)

2.3.4.3 TGB proteiny

Jedná se o rodinu genů, mnohdy s překrývajícími se ORF, které zajišťují mezibuněčný pohyb. TGB proteiny navzájem v různých poměrech interagují a tvoří tím komplexy se schopností navázat se na dsRNA a přenést jednotlivé podjednotky skrze plasmodesmata do dalších buněk.

2.3.4.3.1 TGB1

Tento protein, o velikosti cca 58 kD, je jeden ze tří činitelů mezibuněčného pohybu BSMV. N-terminální polovina se vyznačuje dvěma pozitivně nabitými oblastmi bohatými na lysinové a argininové zbytky, které jsou nejspíše zodpovědné za pohyb na velkou vzdálenost (Solovyev *et al.*, 1999). Za zmínku také stojí C-terminální oblast, kde se vyskytuje helikasová doména se sedmi konzervovanými motivy (I, IA, II, III, IV, V a VI), která je podobná Superfamily I helikasám kódovanými RNA-dependentními RNA polymerasami alpha-podobným virům (Gorbalenya a Koonin, 1993; Koonin *et al.*, 1993, Morozov, 2003). TGB1 se vyznačuje několika schopnostmi: vázat na sebe ssRNA i dsRNA (Donald *et al.*, 1997; Kalinina *et al.*, 2001), fungovat jako RNA helikasa (Kalinina *et al.*, 2002), NTPasa (Donald *et al.*, 1997; Kalinina *et al.*, 2001) a také schopnost tvořit homologní interakce (Lim *et al.*, 2008). RNA sekvenční specifita nebyla při studiích potvrzena, ani zaznametálná afinita TGB1 k DNA. TGB1 protein u BSMV se vyznačuje několika místy s RNA vazebnou aktivitou (Donald *et al.*, 1997), které se dají rozdělit na dva typy; kooperativní navázání s helikasovou oblastí u C-konce a nekooperativní vázání spojené s N-terminální doménou (Donald *et al.*, 1997).

2.3.4.3.2 TGB2

TGB2 je exprimován z sgRNA β 2 a vyznačuje se zhruba 10x menší četností než-li TGB1, kvůli menší hojnosti sgRNA β 1 oproti sgRNA β 2. TGB2 proteiny obsahují dva hydrofobní transmembránové úseky a centrální hydrofilní smyčku, která odděluje hydrofobní zbytky. Topologní model předpokládá, že hydrofobní regiony se integrují do membrán za tvorby struktur ve tvaru U, která směřuje konce proteinu na cytoplasmatickou stranu membrány, se silně konzervovanou centrální částí proteinu vystavenou lumenu ER (Solovyev *et al.*, 1996).

2.3.4.3.3 TGB3

TGB3 je kódován 3' proximálním ORF sgRNA β 2 a je překládám „leaky scanning“ 40S ribosomální podjednotek po AUG TGB2, jež má suboptimální podmínky pro iniciaci translace. Tento mechanismus produkuje TGB2 a TGB3 zhruba v poměru 10:1 během *in vitro* translace, ale relativní koncentrace těchto proteinů nebyly *in vivo* přesně určeny, jelikož TGB3 se obtížně detekuje v infikovaných buňkách (Zhou a Jackson, 1996b). Protein TGB3 obsahuje dvě membránu překlenující domény, o kterých se předpokládá, že způsobují topologií, ve které N- i C- konce vyčnívají do lumenu ER a smyčková oblast směřuje do cytoplasmatické strany ER.

2.3.4.4 yb gen

Tento protein, kódovaný 3' proximálním ORF na podjednotce y je hlavní příčina patogeneze BSMV. Je obzvláště bohatý na cysteinové zbytky a velikostně se vyskytuje v rozmezí 16-20 kD (Koonin *et al.*, 1991).

γ b protein byl exprimován a purifikován v *E. coli* a bylo prokázáno, že má schopnost se vázat na ss RNA (Donald a Jackson, 1996) a na zinek *in vitro* (Bragg *et al.*, 2004). Většina cysteinových zbytků se vyskytují na N-terminálním konci proteinu a jsou shlukovány do dvou motivů zinkových prstů, C1 a C2, které obklopují základní motiv (BM) bohatý na lysinové a argininové zbytky. Všechny tři tyto regiony mají na sobě nezávislou schopnost vázat se na zinek a BM zprostředkovává nespecifickou RNA-vazebnou aktivitu. Mimo jiné, coiled-coil struktura u C konce umožňuje autointerakci, které ovlivňují patogenitu a jsou potřebné pro potlačení hostitelských RNA silencing mechanismů (Bragg a Jackson; 2004).

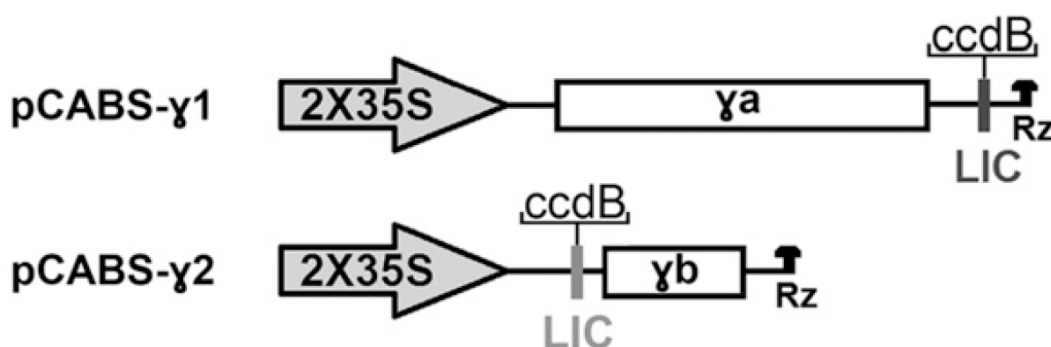
Subcelulární umístění γ b proteinů bylo prokázáno centrifugací a mikroskopii fluorescenčních γ b fúzních proteinů (Lawrence a Jackson; 2001). Proteiny většiny

izolátů mají C-terminální SKL sekvenci, která proteiny směřuje na peroxisomy, ale absence tohoto signálního tripeptidu neovlivňuje infekční fenotyp (Yelina *et al.*, 2005), jelikož například u izolátů ND18 a CV17 tento tripeptid chybí. Můžeme tedy usoudit, že cílení peroxisomů není esenciální pro aktivitu γ b proteinu.

2.3.5 Využití BSMV v rámci bakalářské práce

V této kapitole byly popsány jednotlivé podjednotky, jejich geny i UTR oblasti, včetně oblastí subgenomických. Ačkoliv je BSMV vir, který je použit v této bakalářské práci, konkrétní modifikace viru, se kterým je tato práce prováděna je konstrukt vytvořený (Houde a Cheuk 2017), který má y podjednotku rozdělenou na dvě části. Tyto γ 1 a γ 2 podjednotky byly vytvořeny tím, že příslušné geny byly odstraněny a na jejich místě bylo vytvořeno restrikční místo pro enzym ApaI.

Tím vznikly dvě nová restrikční místa, oproti původnímu konstrukt, kde ve 3' UTR oblasti y podjednotky bylo restrikční místo pro ApaI s kapacitou cca 400 bp (Houde a Cheuk 2017). Tyto restrikční místa mají až 2,5 kbp v případě γ 1 podjednotky a 800 bp pro γ 2.



Obrázek 6 Vizualizace genomu BSMV γ 1 a γ 2 dle Houdeho a Cheuka, 2017. Je zde jasně demonstrováno, že původní podjednotka byla rozdělena na dvě odstraněním jednotlivých genů a dané místo byla zaplněno *ccdB* kasetou ohraničenou restrikčními místy pro ApaI.

V této kapitole se detailně probral původ, význam a hlavně genom BSMV a také byl popsán izolát, s nímž byla tato bakalářská práce provedena.

3. Experimentální část

3.1 Materiál

3.1.2 Biologický materiál

3.1.2.1 Plasmidová DNA

Pro účely této bakalářské práce byly použity plasmidy pCaBS viz tabulka č. 1, nesoucí DNA sekvenci jednotlivých BSMV podjednotek. Tyto konstrukty obsahují 2x35S promotor pro vysokou nadexpresi v dvouděložných rostlinách, následované jednotlivými sekvencemi BSMV podjednotek.

Tabulka 1 Seznam pCaBS plasmidů

Název plasmidu	Zdroj
pCaBS- α	Yuan <i>et. al</i> 2011
pCaBS- β	Yuan <i>et. al</i> 2011
pCaBS- γ 1	Houde a Cheuk 2017
pCaBS- γ 2	Houde a Cheuk 2017
pCaBS- γ 1GFP	Houde a Cheuk 2017
pCaBS- γ 2GFP	Houde a Cheuk 2017
pCaBS- γ 1ccdB	Houde a Cheuk 2017
pCaBS- γ 2ccdb	Houde a Cheuk 2017

3.1.2.2 Bakteriální kmeny

Pro účely selekce a zmnožení plasmidové DNA byly použity dva různé kmeny bakterie *Escherichia coli*, DH10 pro běžnou amplifikaci (Invitrogene) a DB3.1 pro kultivaci bakterií s plasmidy nesoucí gen *ccdB* (Addgene). Pro účely agroinfiltrace bylo použito *Agrobacterium tumefaciens*, kmen EHA105 (Addgene).

3.1.2.3 Rostlinný materiál

Hlavním kultivarem zájmu této bakalářské práce byl kultivar DH397 (Jakobson *et al.*, 2012), jež je dihaploidní linie vzniklá křížením kultivaru Tähti x 8.1 a obsahuje lokus rezistence na chromosomu 4AL z *Triticum militinae*. Dále byly použity kultivary Chinese Spring (JIC, Norwich UK) a Tähti (Kadri Järve, TTU, Tallin, Estonsko).

Pro účely namnožení virových částic a ověření jejich funkce bylo použito *Nicotiana benthamiana*.

3.1.2 Laboratorní vybavení

Termocyklér (C1000 Touch™, Bio-Rad), NanoDrop (ND1000 spectrophotometer, Thermo Scientific), Horizontální elektroforetická cela (2B, Separation systems Inc.), Zdroj stejnosměrného napětí (EC 1000 XI power supply, Thermo scientific), Zdroj stejnosměrného napětí (MP-500V, Major Science), dokumentační zařízení Ingenius (Syngene, Cambridge, GB), Stolní centrifuga (Plate fuge, Benchmark scientific), Stolní centrifuga (5415 Eppendorf), Sálková centrifuga Jouan C4i (Thermo Scientific), Mrazicí box (Nord Line -20°C), Mrazicí box (Thermo Scientific -80°C), Elektroporátor (KRD Technologies), Fluorescenční mikroskop (Olympus IX81), Třepačka (Thermo Scientific), Mikrobiologický Termostat BT 120 (Labo MS s.r.o.), Fytotron (Weiss Gallenkamp), Třecí miska s tloučkem, Petriho misky, Třepačka s houpavým pohybem (Heidolph Duomax 1030), Spektrofotometr jednopaprskový (Ultrospec 10, AP Czech)

3.1.3 Použité chemikálie a roztoky

Ethidium Bromide (PCR ethidium bromide, Top Bio), agarosa (Agarose I™, VWR Amresco Life Science), Cresol RED (Cresol red indicator, Riedel-de Haën), reakční pufr pro PCR (100 mM Tris-HCl; pH = 8,8; 15 mM MgCl₂; 500 mM KCl; 1% Triton x-100), Taq DNA polymerasa (Finzyme), dNTPs (Sigma Aldrich), 5x TBE (Tris-Borate-EDTA; pH = 8,3; Sigma Aldrich), markery relativní molekulové hmotnosti (1kb+ gene ruler 20 ng/μl; 50bp gene ruler 20 ng/μl; Thermo scientific), Ethanol (96%), Ethanol (70%), destilovaná voda, GET pufr (50mM glukosa; 10mM EDTA; 25 mM Tris-HCl; pH = 8), TE pufr (10 mM TRIS; 1mM EDTA; pH = 8), alkalický SDS (0,2 M NaOH; 1% SDS v/v; voda), neutralizační roztok (KAc 5M 60 ml / 100ml; ledová CH₃COOH 11,5 ml / 100 ml; voda 28,5 ml; pH = 4,8-5,3), fenol, chloroform isoamylalkohol 24:1, kanamycin (1 μg/ml), rifampicin (0,5 μg/ml), 7,5M NH₄Ac, 3M NaAc (pH = 5,5), koinfiltrační pufr (10mM MES, 100μM As, 10mM MgCl₂), 2YT médium (kaseinový enzym 1,6 g/100 ml; kvasinkový autolyzát 1g /100 ml; NaCl 0,5 g/100 ml; agar 1,6 g / 100 ml), S.O.C. médium (Thermo Fisher), 20 mM NaHPO₄ (pH = 7,2)

3.2 Metody

3.2.1 Příprava plasmidové DNA

Jednotlivé plasmidy byly zaslány prof. Houdem z Université du Québec à Montréal ve formě vyschlých kapek na filtračním papíru s vyznačenými zónami výskytu jednotlivých plasmidů. Jednotlivé oblasti filtračního papíru nesoucí plasmidy byly vystříženy, macerovány v 50 μ l TE pufru v 1,5ml mikrozkuvkách.

3.2.2 Elektroporace a kultivace

Aby bylo možné ověřit, zda-li je v plasmidech požadovaný konstrukt, bylo nutné nejprve transformovat bakterie těmito plasmidy v elektroporátoru (KRD Technologies). Tímto byl získán stálý zdroj plasmidů pro účely ověřování konstruktů, či extrakce namnožené plasmidové DNA.

Pro elektroporaci byly použity *E. coli*, kmeny DH10 a pro inserty s *ccdB* geny DB3.1.

Postup:

1. 2 μ l ligačního produktu bylo umístěno do 50 μ l média s elektrokompetentními *E. coli*, řádně promícháno, a ponecháno 10 minut.
2. Směs byla přenesena do předem vychlazené kyvety
3. Kyveta byla vložena do elektroporační komory (KRD Technologies) s ledem a byla provedena při 330 V
4. Směs byla odpipetována z kyvety a přenesena do 500 μ l teplého S.O.C. média
5. Médium bylo ponecháno v třepačce při 37°C a 225 rpm po dobu 90 minut.
6. Po uplynutí 90 minut bylo médium vylito a rozhojekováno na agarové misky s Kc (1 μ l/1 ml) a ponecháno v inkubátoru při 37 °C přes noc
7. Narostlé kolonie byly přepasážovány na nové Kc misky

3.2.3 Ověřování konstruktů a extrakce a purifikace plasmidové DNA

Pro potvrzení, že vyselektované kolonie nesou daný konstrukt, tedy sekvenci virových podjednotek BSMV, byla použita metoda Colony Polymerase Chain Reaction (Colony PCR).

Primery byly použity dle Yuan *et al.*, 2011, viz tabulka č. 2

Tabulka 2 Primery pro PCR pro ověření přítomnosti BSMV konstruktů

Název primeru	Cílová sekvence	Sekvence primeru (5'-3')
BS-22 (F)	BSMV α	GTATGTAAGTTGCCTTTGGGTG
BS-23 (F)	BSMV β	GTAAAAGAAAAGGAACAACCCTG
BS-24 (F)	BSMV γ	GTAAAAGAAAAGGAACAACCCTG
BS-32 (R)	BSMV $\alpha+\beta+\gamma$	TGGTCTTCCCTTGGGGGAC

Reakční směs byla připravena v objemu 20 μ l dle údajů v tabulce č. 3 a následně vložena do termocyklieru za podmínek v tabulce č. 4.

Tabulka 3 Příprava reakční směsi pro PCR

Reagencie	Koncentrace (ve 20 μ l roztoku)
Taq DNA polymeráza	0,4 U
Cresol RED	1X
Reakční pufr	1X
Primer Forward	1 μ M
Primer Reverse	1 μ M
dNTPs	200 μ M
DNA	Bakterie na špičku pipety
Deionizovaná voda	Doplnit do objemu

Tabulka 4 Nastavení termocyklieru pro PCR

Fáze		Teplota (°C)	Doba trvání	Počet cyklů
Denaturace		95	5 min	1
Syntéza	Denaturace	95	30 s	30
	Annealing	55	30 s	
	Polymerace	72	120 s	
Dosyntetizování		72	10 min	1
Udržování		12	∞	1

3.2.4 Agarosová gelová elektroforéza:

Agarosová gelová elektroforéza byla použita pro ověření úspěšnosti Colony PCR a tedy pro potvrzení přítomnosti konstruktů v PCR produktu. Elektroforéza byla prováděna v 0,8% agarosovém gelu, pro barvení DNA byl využit ethidium bromid (0,5 mg/ml, Promega). Obarvená DNA byla vizualizována na dokumentačním zařízení Ingenius (Syngene, Cambridge, UK).

Postup:

1. Připravit 0,8% roztok agarosy v 0,5 x TBE pufru, rozvařit v mikrovlnné troubě.
2. Gel nechat chladnout na magnetické míchačce, po zchladnutí na cca 50 °C gel přelít do elektroforetické komůrky.
3. Vložit hřebínky a nechat gel tuhnout po dobu nejméně 30 min při pokojové teplotě.
4. Gel vložit do elektroforetické komůrky naplněné 0,5x TBE puforem, vyjmout hřebínky.
5. Do první jamky každé řady napipetovat 100 ng standardu molekulové hmotnosti (1kb+ gene ruler, Thermo scientific)..
6. Do dalších jamek nanášet 1-2 µl vzorku smíchaného s loading puforem.

7. Připojit elektroforetickou komoru ke zdroji elektrického napětí, nastavit elektrické napětí dle vzdálenosti elektrod, standardně 5 V/cm mezi elektrodami.
8. Po ukončení separace odpojit zdroj stejnosměrného napětí, vyjmout gel z elektroforetické komůrky a vložit do barvicí komory s Ethidium bromidem (0,5 mg/ml).
9. Gel barvit cca 15 min. (v závislosti na tloušťce gelu) výsledek vyhodnotit pomocí dokumentačního zařízení a zaznamenat.

3.2.5 Extrakce a purifikace plasmidů

Po ověření úspěšnosti transformace a tedy potvrzení, že plasmidy nesoucí sekvence virových podjednotek se v daných koloniích *E. coli* skutečně nachází, bylo nutné extrahovat a purifikovat plasmidy, aby bylo možné s nimi dále pracovat (modifikovat, transformovat).

Pro kultivaci byly vybrány kolonie jednotlivých plasmidů, které měly nejsilnější signál na elektroforéze.

Postup:

1. *E. coli* příslušných kmenů byly kultivovány v 100 ml LB médiu s Kc (1 μ l/ml) přes noc v třepačce (Thermo Scientific) při 37°C a 225 rpm.
2. Médium s bakteriemi bylo vloženo do 100 ml kyvet a centrifugováno (Jouan C4i, Thermo Scientific) 4 min při 2800 g a 4 °C.
3. Supernatant byl odstraněn a bakterie byly rozsuspendovány v 4 ml GET pufru
4. Následně byl přidán alkalický SDS (2V GET), roztok byl inkubován 30 min. na ledu
5. Po 30 minutách byl přidán neutralizační roztok (3/4 V GET), roztok byl opatrně promíchán a následovala 30min inkubace na ledu
6. Po inkubaci byl roztok centrifugován při 10 000 g po dobu 10 min při 4 °C.
7. Vzniklý supernatant byl přes vlhkou gázu přelit do 100ml kyvet.
8. Bylo přidáno 0,6V celkového objemu isopropanolu, 30 min inkubace.
9. Centrifugace při 10 000 g po dobu 10 min při 4 °C.
10. Supernatant byl vylit a kyveta byla promyta 500 μ l 70% EtOH.
11. 70% EtOH vylit a kyveta byla znovu promyta 500 μ l 96% EtOH.
12. 96% EtOH byl vylit a kyveta byla ponechána vyschnout po dobu 30 min.
13. Pellet byl rozsuspendován v 500 μ l TE pufru, roztok přesunut do 1,5ml mikrozkušavky.

14. Do mikroskopavek byl přidán fenol (1/2V celkového objemu), mikroskopavky byly protřepány.
15. Do mikroskopavek byl přidán chloroform:isoamylalkohol (1/2V celkového objemu) v poměru 24:1, mikroskopavky byly protřepány.
16. Mikroskopavky byly centrifugovány při 15 000 g po dobu 2 min, poté byla odpipetována horní fáze a vložena do nové mikroskopavky.
17. Krok 15-16 byl 2x zopakován.
18. Do roztoku byla přidána 1/10V 3M NaAc (pH = 5,5), roztok byl promíchán.
19. Následně byl přidán 2V 96% EtOH a roztok byl vložen na 1h do chladicího boxu (-20°C).
20. Centrifugace při 10 000 g po dobu 10 min při 4 °C.
21. Supernatant byl vylit a kyveta byla promyta 300 µl 70% EtOH.
22. 70% EtOH vylit a kyveta byla znovu promyta 300 µl 96% EtOH.
23. 96% EtOH byl vylit a kyveta byla ponechána vyschnout po dobu 30 min.
24. Pellet byl rozsuspendován v 50 µl TE pufru, roztok přesunut do řádně označených 1,5ml mikroskopavek.

3.2.6 Měření koncentrace plasmidové DNA

Po extrakci a purifikaci plasmidové DNA bylo nutné stanovit koncentraci a čistotu roztoků s plasmidovou DNA, aby bylo možné ji vhodně naředit pro další postupy.

Postup:

1. Na čistou destičku stroje NanoDrop byl napipetován 1 µl TE pufru pro účely blanku.
2. Spektrofotometr byl zkalibrován blankem ($\lambda = 260 \text{ nm}$).
3. Na utřenou destičku stroje NanoDrop byl postupně napipetován 1 µl jednotlivých roztoků s izolovanou plasmidovou DNA.
4. Byly změřeny koncentrace jednotlivých roztoků s plasmidovou DNA.
5. Roztoky s plasmidovou DNA byly následně zředěny do pracovních objemů a znovu byla změřena jejich koncentrace.

3.2.7 Elektroporace *A. tumefaciens*

Pro účely agroinfiltrace *N. benthamiana* bylo nutné nejprve transformovat samotné *A. tumefaciens*. Pro účely elektroporace (KRD Technologies) byl použit kmen EHA105.

Postup:

1. 2 μ l ligačního produktu bylo napipetováno do 50 μ l média s elektrokompetentními *A. tumefaciens*, řádně promícháno, a ponecháno 10 minut.
2. Směs byla napipetována do předem vychlazené kyvety
3. Kyveta byla vložena do elektroporační komory s ledem a byla provedena elektroporace při 330 V
4. Směs byla odňata z kyvety a přenesena do 500 μ l teplého S.O.C. média
5. Médium bylo ponecháno v třepačce při 28°C a 225 rpm po dobu 90 minut.
6. Po uplynutí 90 minut bylo médium vylito na agarové misky s Rif (0,5 μ l/1 ml) a Kc (1 μ l/1 ml), ponecháno v inkubátoru při 28°C po dobu dvou dnů
7. Po dvou dnech byly narostlé kolonie přepasážovány na nové Rif + Kc misky

3.2.8 Tvorba bakteriálních konzerv

A. Tumefaciens nesoucí plasmidy se sekvencí BSMV α , BSMV β , BSMV γ 1, BSMV γ 2, BSMV γ 2 GFP je možné využít i bez další modifikace. Bylo tudíž usouzeno, že pro úsporu času je vhodné vytvořit z těchto bakterií konzervy.

Tyto konzervy je nyní možné kdykoliv využít pro agroinfiltraci, čímž se obchází nutnost při potřebě agroinfiltrovat opakovaně transformovat *A. tumefaciens*.

Postup:

1. *A. tumefaciens* nesoucí příslušné plasmidy byly kultivovány v 3 ml LB média s Kc a Rif přes noc v třepačce (Thermo Scientific) při 28°C a 225 rpm.
2. Následující den bylo do 3 ml média s bakteriemi přidáno 300 μ l 100% glycerolu.
3. Médium bylo napipetováno do 2ml mikrozkušavek a uloženo v -80°C mrazícím boxu.

3.2.9 Agroinfiltrace *N. benthamiana*

Pro vytvoření virových částic je nutné přenést sekvenci virů z plasmidu do genomu dvouděložné rostliny, kde 2 x 35S promotor zajistí velmi silnou nadexpresi této sekvence a následně tvorby virových částic pomocí této mRNA.

Pro účely tvorby virových částic byla vybrána rostlina *N. benthamiana*, jelikož je snadné na této rostlině provést agroinfiltraci a BSMV je schopen se v této rostlině množit.

Pro snadné potvrzení přítomnosti virových částic byla vybrána podjednotka γ 2-GFP, jež umožní snadnou vizualizaci pomocí fluorescenční mikroskopie.

Postup:

1. *A. tumefaciens* nesoucí příslušné plasmidy (α , β , γ 1, γ 2-GFP) byly kultivovány v 100ml LB médiu s Rif + Kc přes noc ve 28°C při 225 rpm.
2. Následující den byly buňky zcentrifugovány (Jouan CR4i) při 2800 g po dobu 10 min.
3. Médium bylo odlito a buňky byly resuspendovány v agroinfiltračním pufru a koncentrace byla upravena tak, aby $OD_{600}=0,7$.
4. Stejně objemy všech kultur byly smíchány v poměru 1:1 a ponechány v třepačce při 28°C při 225 rpm po dobu 3-5 h.
5. Abaxiální strany listů *N. benthamiana* byly napíchnuty jehlou a následně infiltrovány za použití 1ml stříkačky.
6. Agroinfiltrované oblasti byly označeny kroužkem.
7. Rostliny byly ponechány ve tmě přes noc při pokojové teplotě.
8. Následující den byly rostliny vloženy do fytotronu (Weiss Gallenkamp) za fotoperiody 16 h/8 h, 24 °C a vlhkosti 60 % po dobu 8-15 dnů.

3.2.10 Fluorescenční mikroskopie – *N. benthamiana*

Po 3 dnech růstu ve fytotronu bylo možné ověřit přítomnost virových částic v agroinfiltrovaných *N. benthamiana* pomocí reportérového genu *gfp*, jež byl exprimován BSMV podjednotkou γ 2-GFP.

Postup:

1. Rostliny *N. benthamiana* byly vybrány z fytotronu a byly vyřezány čtverečky cca 5x5 mm, zhruba 1 cm od místa agroinfiltrace.
2. Stejně velká oblast byla vyřezána u kontrolní rostliny, aby bylo možné rozlišit, zda-li se stejný signál nevyskytuje i u kontroly.

3. Vzorčky byly vloženy na řádně označené podložené sklo, zality malým množstvím vody a přikryty podložním sklíčkem, na které byla přidána kapka imerzního oleje.

4. Vzorčky byly sledovány pod mikroskopem (Olympus IX81) při zvětšení 40x10 a vlnové délce laseru $\lambda = 395$ nm (excitační maximum GFP).

3.2.11 Příprava virového homogenátu

Pokud byla transformace úspěšná, transformované buňky nyní exprimují mRNA jež poslouží k translaci virových proteinů, které následně tyto mRNA zpracovávají na virové částice. Tyto částice jsou schopné infekce *T. aestivum*.

Postup:

1. Po 8-15 dnech kultivace byly agroinfiltrované oblasti *N. benthamiana* vyříznuté skalpelem
2. Listy byly zality 20 mM NaHPO₄ pufrem v poměru 0,5 g listu / 1 ml pufru
3. Směs byla rozdrvena tloučkem ve třecí misce
4. Vzniklý homogenát byl uložen do mrazícího boxu (-20°C)

3.2.12 Imbibice *T. aestivum* a kultivace

Pro infekci virem BSMV byla považována za nejvhodnější metoda imbibice.

Imbibovány byly tři kultivary: Chinese Spring, Tähti, DH397.

10 semen od každého kultivaru bylo ponecháno jako kontroly.

Postup:

1. Homogenát byl zředěn kohoutkovou vodou v poměru 1:100
2. Do 3 Petriho misek bylo vloženo po 10 semenech, které byly 2 dny uchovávány v lednici ve tmě v Petriho miskách s mokrou buničinou
3. Semena byly zality zředěným homogenátem do poloviny jejich výšky, zabaleny do alobalu, a ponechány 2 dny na třepačce ve tmě, při pokojové teplotě a 2 rpm.
4. Po dvou dnech byla klíčící semena přenesena do květináčů do fytotronu za fotoperiody 16 h/8 h, 24 °C a vlhkosti 60 % po dobu 7-14 dnů

3.2.13 Fluorescenční mikroskopie – *T. aestivum*

T. aestivum, jež po imbibici vyrostly byly následně mikroskopovány za účely potvrzení exprese GFP a tudíž potvrzení infekce BSMV.

Postup

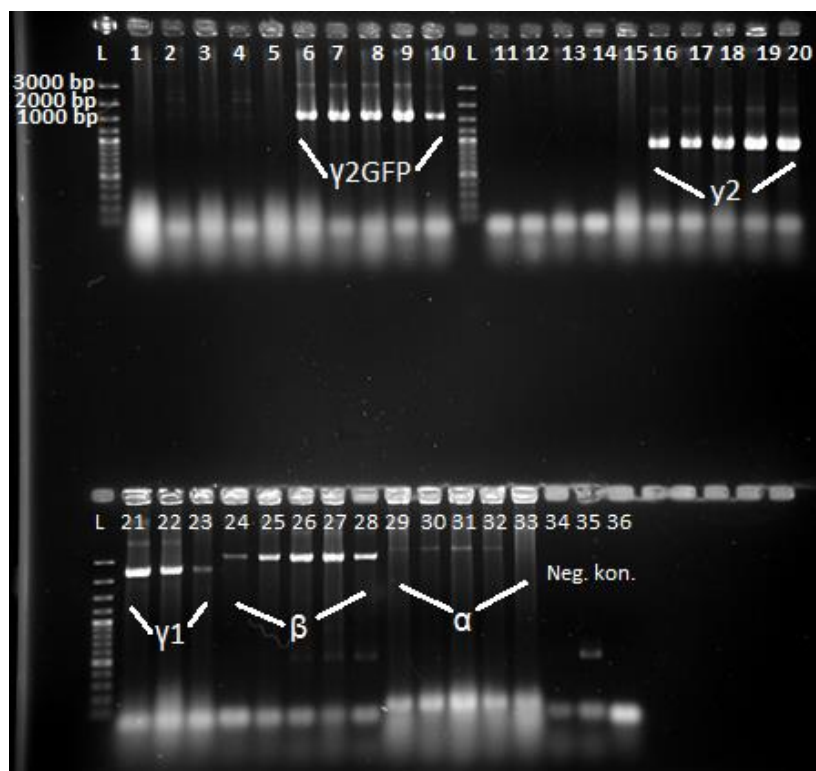
1. Z hypokotylů *T. aestivum* byla odříznuta skalpelem oblast o velikosti 5x3 mm, stejný postup byl zvolen u kontrolních rostlin.
2. Vzorky byly vloženy na podložní sklíčko, zality malým množstvím vody a přikryty krycím sklem, na které byla přidána kapka imerzního oleje.
3. Vzorky byly sledovány pod mikroskopem při zvětšení 40x10 a vlnové délce laseru $\lambda = 395$ nm (excitační maximum GFP) a také pod vlnovou délkou $\lambda = 532$ nm (excitační maximum Cy3) pro vyvrácení falešně pozitivního výsledku.

4. Výsledky a diskuse

4.1 Příprava a ověřování konstruktů

Prvním krokem této práce bylo potvrzení toho, že plasmidy skutečně nesou požadovanou sekvenci a namnožení těchto plasmidů v dostatečném objemu pro následující práci.

Jak již bylo zmíněno, jedním z prvních kroků pro potvrzení přítomnosti konstruktů byla Colony PCR a následná agarosová elektroforéza, viz obr. č. 7. Velikost produktů odpovídala očekávané velikosti virových sekvencí, viz tabulka č. 5.



Obrázek 7 Elektroforetogram PCR produktů jednotlivých pCaBS plasmidů nesoucí sekvence BSMV, L symbolizuje velikostní marker

Jak je možné vidět, u podjednotek BSMV α (29-33), β (24-28), γ_1 (21-23), γ_2 (16-20) a γ_2 GFP (6-10) je pozitivní signál, u negativních kontrol není žádný. Můžeme tedy jasně usoudit, že u PCR produktů s pozitivním signálem se konstrukt vyskytuje a je možné jej použít pro další práci. Dle tabulky č. 5 můžeme také vidět, že PCR produkty odpovídají očekávané velikosti sekvencí BSMV.

Tabulka 5 Očekávaná velikost PCR produktů z literatury porovnána s výsledky elektroforézy

Očekávaná velikost PCR produktů		Velikost PCR produktu
BSMV α	3809 bp	✓
BSMV β	3262 bp	✓
BSMV γ 1	2381 bp	✓
BSMV γ 2	875 bp	✓
BSMV γ 2GFP	1597 bp	✓

U této elektroforézy byla potvrzena přítomnost plasmidů zájmu v bakteriích nesoucí sekvenci BSMV α , BSMV β , BSMV γ 1, BSMV γ 2, BSMV γ 2GFP.

Ostatní konstrukty byly úspěšně potvrzené následně, BSMV γ ccdB podjednotky po kultivaci v *E. coli* kmen DB3.1, avšak u elektroforézy samotných plasmidů bylo zjištěno, že pCaBS-BSMV γ 1GFP je menší než se očekávalo; očekávána velikost plasmidu se lišila o velikost sekvence BSMV γ 1GFP; jednalo se tedy o prázdný vektor.

Po extrakci a purifikaci plasmidové DNA byla naměřena koncentrace jednotlivých roztoků s plasmidovou DNA, a také ověřena jejich čistota. Viz tabulka č. 5

Tabulka 6 Koncentrace izolované a purifikované plasmidové DNA jednotlivých podjednotek

Koncentrace plasmidové DNA	
BSMV α	1471 ng/ μ l
BSMV β	3980 ng/ μ l
BSMV γ 1	2561 ng/ μ l
BSMV γ 2	2809 ng/ μ l
BSMV γ 2GFP	1629 ng/ μ l
BSMV γ 1ccdB	3185 ng/ μ l
BSMV γ 2ccdB	2045 ng/ μ l

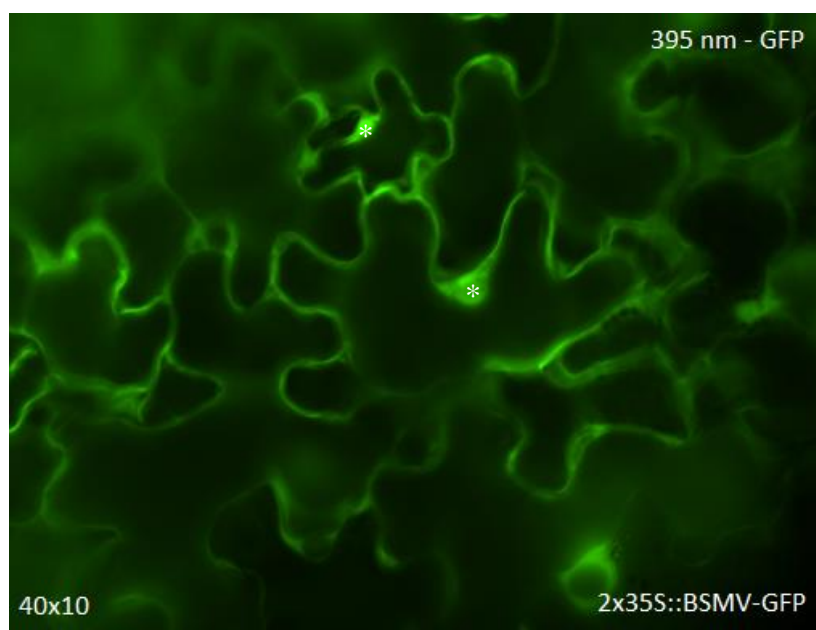
Poměr $\lambda = 260/280$ nm při měření v spektrofotometru jakožto indikátor čistoty DNA byl vždy okolo hodnoty 1,8, což naznačovalo, že extrahovaná DNA je čistá a tudíž vhodná na další práci.

Konzervy *A. tumefaciens*, které byly připraveny, byly použity pro kultivaci *A. tumefaciens* určené pro agroinfiltraci. Kultury s příslušnými antibiotiky bez problémů narostly i při opakovaných experimentech. Je tedy možné usoudit, že tvorba konzerv byla úspěšná a je možné je použít na mnoho dalších experimentů, případně obnovit.

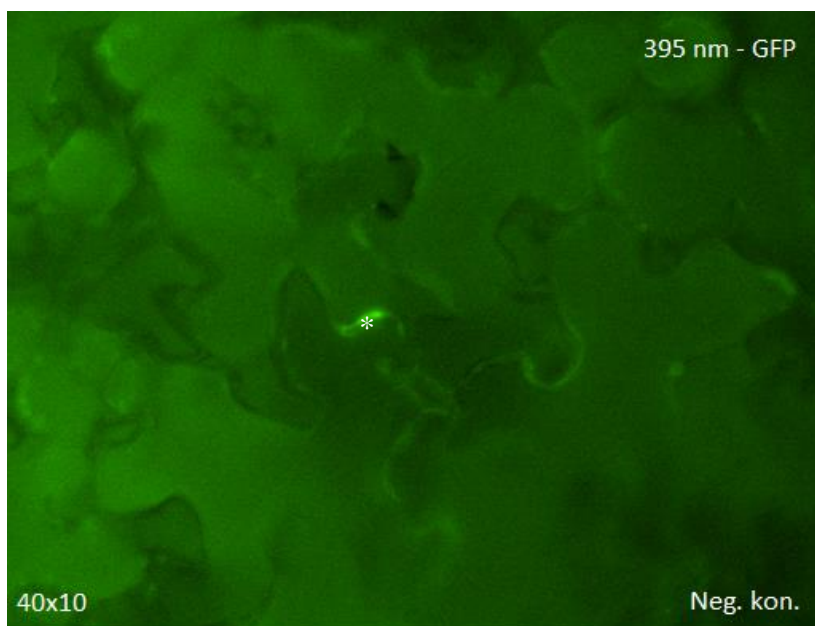
4.2 Agroinfiltrace *N. Benthamiana*

Agroinfiltrace *N. Benthamiana* konstruktem 2x35S::BSMV se prokázala jako úspěšná. Toto potvrdila fluorescenční mikroskopie agroinfiltrovaných listů a následně byla provedena i negativní kontrola pro vyvrácení falešně pozitivního výsledku.

Tímto bylo prokázáno, že tento postup je úspěšný pro infekci tabáku virem BSMV a v infikovaných rostlinách se nyní množily virové částice. Vizuálně se snímek shodoval se snímky Houdeho a Cheuka (2017); také zde dochází k výskytu GFP primárně na buněčných stěnách. Mimo silný GFP signál vykazovaly agroinfiltrované oblasti také silnou chlorózu; symptom typický pro infekci BSMV.



Obrázek 8 Snímek agroinfiltrovaného listu *N. benthamiana* infikovaného BSMV-GFP, * slouží jako ukazatel pozitivního signálu



Obrázek 9 Snímek listu *N. benthamiana*, sloužícího jako negativní kontrola, * je ukazatelem nespecifického signálu

4.3 Infekce *T. Aestivum* BSMV-GFP

Po úspěšném namnožení virových částic bylo možné těmito částicemi infikovat pšenici. Ačkoliv cílovým kultivarem byl cv. DH397, bylo experimentováno i s cv. Tähti a Chinese Spring.

Semena vykazovala různou klíčivost a imbibice podle všeho také měla na klíčivost semen vliv, viz tabulka č. 7. Houde a Cheuk (2017) toto potvrdili, jelikož ředění virového homogenátu 1:100 vykazovalo, dle nich, oproti vyšším koncentracím minimální efekt na klíčivost.

Jak již bylo zmíněno, bylo vysazeno 10 semen infikovaných a 10 kontrolních od každého kultivaru, přičemž ne každé imbibované semeno vykazovalo pozitivní signál, tedy pravděpodobně nebylo infikované.

Tabulka 7 Klíčivost semen různých kultivarů, imbibovaných i neimbibovaných

Klíčivost (10 semen)	DH397	Tähti	Chinese Spring
Kontroly	9	8	5
Imbibované	6	7	2
Imbibované s + signálem	4	2	0
Účinnost imbibice (%)	40	20	0

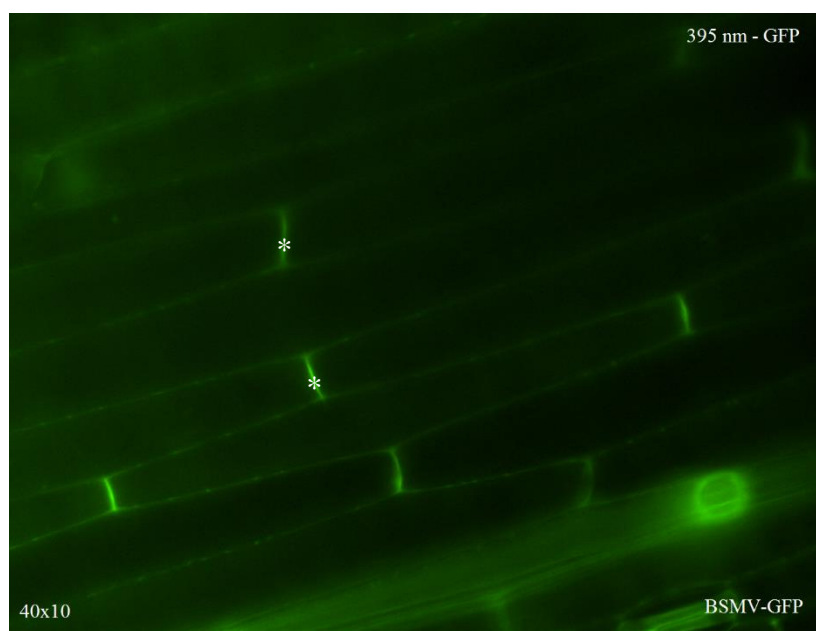
Z tabulky č. 7 je možné vidět, že kultivar Chinese Spring měl problém s klíčivostí, a také nebylo možné jej vůbec infikovat. Táhťi měl klíčivost velmi dobrou, ale míra účinnost infekce byla nižší (20 %). Cílový kultivar DH397 avšak vykazoval jak vysokou klíčivost, tak vysokou míru náchylnosti k infekci (40 %).

Houde et Cheuk (2017) byli schopni infikovat kultivary NIL 107, NIL 108 a Atlas 66. Zde bylo dokázáno, že lze infikovat i kultivary DH397 a Táhťi.

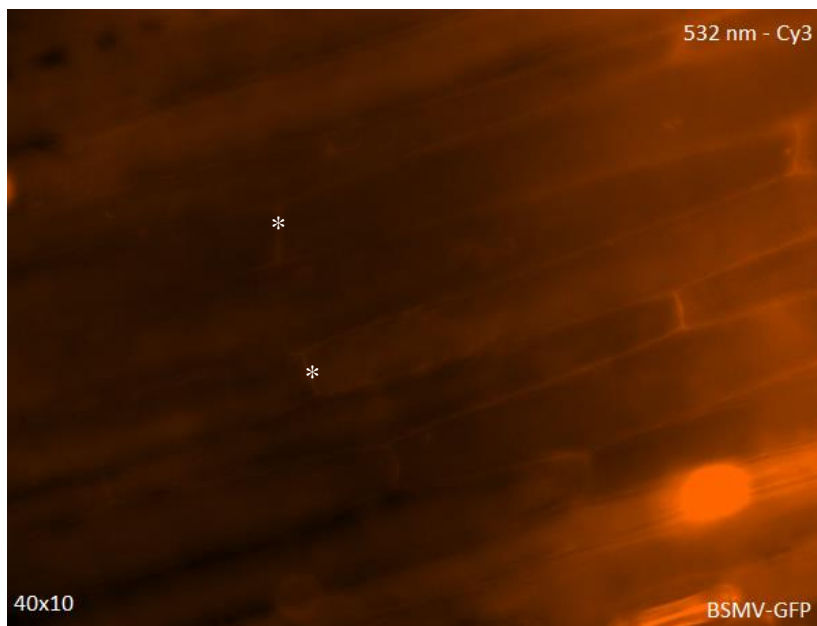
Výskyt viru byl potvrzen fluorescenční mikroskopií; na rozdíl od *N. Benthamiana* pšenice nevykazovala v průběhu svého růstu oproti kontrolám žádné symptomy. Koncentrace virových částic tedy pravděpodobně byla podstatně nižší a fenotyp pšenice nebyl nijak postižen.

Co je zajímavé poznamenat je fakt, že oproti původní publikaci (Houde a Cheuk, 2017) byla exprese GFP zdánlivě slabší, což může být způsobeno menší náchylností těchto kultivarů k infekci BSMV, či použitím mikroskopu s horším rozlišením.

Je možné vidět, že GFP se vyskytuje převážně na buněčných stěnách (obr č. 10), což se shoduje s výsledky Houdeho a Cheuka (2017). Příčina tohoto jevu je neznámá; je např. možné že koncentrace GFP je u buněčných stěn pouze vyšší a tudíž zaznamatelná. Je také možné že pohyb virionů má vliv na lokalizaci GFP, které jej směřují k buněčným stěnám.



Obrázek 10 Kotyledon *T. aestivum* cv. DH397 infikován BSMV-GFP, * slouží jako indikátor pozitivního signálu



Obrázek 11 Kotyledon *T. aestivum* cv. DH397 infikován BSMV-GFP, * je na stejném místě jako u fotografie s GFP filtrem což jasně dokazuje, že se nejedná o falešně pozitivní GFP signál. GFP se tedy v pletivech skutečně exprimuje a je tedy potvrzeno, že pšenice je BSMV-GFP skutečně infikována.

Bylo tedy možné, s jistými modifikacemi, replikovat výsledky Houdeho a Cheuka (2017) na nových kultivarech s laboratorním vybavením a podmínkami na tomto pracovišti.

5. Závěr

V této práci bylo prokázáno, že je možné replikovat výsledky infekce *T. aestivum* modifikovaným BSMV s reportérovým genem *gfp* na nových kultivarech (Houde a Cheuk 2017).

Byly také připraveny materiály pro následnou práci s tímto virem; vytvořeny konzervy *A. tumefaciens* s plasmidy nesoucí konstrukt s virovými podjednotkami, vyextrahována čistá plasmidová DNA ve vysoké koncentraci a také odzkoušeny metody které vedly ke zdárnému konci tohoto experimentu.

Jak již bylo zmíněno na začátku, účelem této bakalářské práce bylo tuto metodu optimalizovat a připravit na následující práci, která se bude zabývat optimalizací virového vektoru pro účely VIGS, VOX či genové editace v pšenici.

Tohoto se může dosáhnout zvýšením funkční kapacity virového vektoru; je možné nahradit gen *gfp* za menší, avšak účinnější reportérový gen *iLOV* (Chapman *et al.*, 2008), jelikož je důvod se domnívat, že čím větší je konstrukt, tím horší je replikace a mezibuněčný pohyb (Houde a Cheuk, 2017).

Funkční kapacitu je také možné navýšit vytvořením restričních míst na dalších podjednotkách. Již dříve bylo prokázáno, že je možné vytvořit restriční místo s kapacitou až 505 bp na BSMV β podjednotce (Kawalek *et al.*, 2012).

Další možností je optimalizace konstruktů určených pro VIGS, místo fragmentu genu hostitele v antisense orientaci (typický postup pro VIGS) je potenciálně možné vytvořit v restričním místě BSMV γ 1 či γ 2 ORF, jež bude daný fragment genu exprimovat, tudíž zvýší koncentraci interferující RNA. Další možností je vytvořit RNAi konstrukt, tedy ORF napodobující *mir* geny v hostitelských rostlinách, jež by také mohlo navýšit úspěšnost VIGS.

Finálním cílem tohoto projektu je exprese CRISPR-Cas9 enzymu pro účely tvorby KO mutantů ve všech pletivech pšenice za pomoci tohoto viru, avšak jsou zde problémy s kapacitou viru, jelikož inzert o velikosti ověřených Cas9 enzymů by způsobil nestabilitu příslušné podjednotky a genom viru by se fragmentoval. Je tedy snadnější z krátkodobého hlediska dosáhnout účinného VIGS a z dlouhodobého hlediska vyčkat na objev Cas9 enzymů s vysokou přesností a menší DNA sekvencí.

6. Literatura

1. Agranovsky A.A., Karasev A.V., Novikov V.K., Lunina N.A., Loginov S., Tyulkina L.G. (1992): Poa semilatifolius virus, a hordeivirus having no internal polydisperse poly(A) in the 3 non-coding region of the RNA genome. *Journal of General Virology* **73**, 2085–2092.
2. Agranovsky A., Dolja V., Kagramanova V., Atabekov J. (1979): The presence of a cap structure at the 5'-end of barley stripe mosaic virus RNA. *Virology* **95**, 208–210.
3. Bonjean A.P., Angus W.J. (2001): *The world wheat book: a history of wheat breeding. Technique & Documentation* - Lavoisier, Paris, France, 1201 stran.
4. BRADSHAW J. E. (2018): PLANT BREEDING: past, present and future. Springer, 693 stran.
5. Bragg J.N., Lawrence D.M., Jackson A.O. (2004): The N-Terminal 85 Amino Acids of the Barley Stripe Mosaic Virus β Pathogenesis Protein Contain Three Zinc-Binding Motifs. *Journal of Virology* **78**, 7379–7391.
6. Bragg J.N., Jackson A.O. (2004): The C-terminal region of the Barley stripe mosaic virus β protein participates in homologous interactions and is required for suppression of RNA silencing. *Molecular Plant Pathology* **5**, 465–481.
7. Carroll T.W. (1986): Hordeiviruses Biology and Pathology. *The Plant Viruses* 373–395.
8. Carroll T.W. (1980): Barley Stripe Mosaic Virus: Its Economic Importance and Control. *Plant Disease* **64**, 136.
9. Chapman S., Faulkner C., Kaiserli E., Garcia-Mata C., Savenkov E. I., Roberts A. G., Oparka K. J., Christie J. M. (2008): The photoreversible fluorescent protein iLOV outperforms GFP as a reporter of plant virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 20038–20043.
10. Cheuk A., Houde M., (2017): A New Barley Stripe Mosaic Virus Allows Large Protein Overexpression for Rapid Function Analysis. *Plant Physiology* **176**, 1919–1931.
11. Donald R.G., Lawrence D.M., Jackson A.O. (1997): The barley stripe mosaic virus 58-kilodalton β protein is a multifunctional RNA binding protein. *J. Virol.* **71**, 1538–1546.
12. Donald R.G.K., Jackson A.O. (1996): RNA-binding activities of barley stripe mosaic virus β fusion proteins. *Journal of General Virology* **77**, 879–888.
13. Edwards M., Petty I., Jackson A. (1992): RNA recombination in the genome of Barley stripe mosaic virus. *Virology* **189**, 389–392.
14. Faostat Home Page: <http://www.fao.org/faostat/en/#home> (4.3.2019)
15. Gorbalenya A.E., Koonin E.V. (1993): Helicases: amino acid sequence comparisons and structure-function relationships. *Current Opinion in Structural Biology* **3**, 419–429.

16. Gupta P.K., Tsuchiya T. (1991): Chromosome Engineering in Plants, Volume 2B 1st Edition. Elsevier Science.
17. Gustafson G., Larkins B.A., Jackson A., (1981): Comparative analysis of polypeptides synthesized in vivo and in vitro by two strains of barley stripe mosaic virus. *Virology* **111**, 579–587.
18. Gustafson G., Armour S.L. (1986): The complete nucleotide sequence of RNA β from the type strain of barley stripe mosaic virus. *Nucleic Acids Research* **14**, 3895–3909.
19. Gustafson G., Hunter B., Hanau R., Armour S., Jackson A. (1987): Nucleotide sequence and genetic organization of barley stripe mosaic virus RNA- γ . *Virology* **158**, 394–406.
20. Gustafson G., Armour S., Gamboa G.C., Burgett S.G., Shepherd J.W. (1989): Nucleotide sequence of barley stripe mosaic virus RNA α : RNA α encodes a single polypeptide with homology to corresponding proteins from other viruses. *Virology* **170**, 370–377.
21. Hagborg W.A.F. (1954): Dwarfing Of Wheat And Barley By The Barley Stripe-Mosaic (False Stripe) Virus. *Canadian Journal of Botany* **32**, 24–37.
22. He Y., Wang Q., Zeng J., Sun T., Yang G.-X., He G.-Y. (2015): Current status and trends of wheat genetic transformation studies in China. *Journal of Integrative Agriculture* **14**, 438–452.
23. Heun M., (1997): Site of Einkorn Wheat Domestication Identified by DNA Fingerprinting. *Science* **278**, 1312–1314.
24. Jackson A.O., Hunter B.G., Gustafson G.D., (1989): Hordeivirus Relationships and Genome Organization. *Annual Review of Phytopathology* **27**, 95–121.
25. Jackson A. (1989): Hordeivirus Relationships And Genome Organization. *Annual Review of Phytopathology* **27**, 95–121.
26. Jackson A., Petty I., Jones R., Edwards M., French R. (1991): Molecular genetic analysis of barley stripe mosaic virus pathogenicity determinants. *Canadian Journal of Plant Pathology* **13**, 163–177.
27. Jakobson I., Reis D., Tiidema A., Peusha H., Timofejeva L., Valárik M., Kládiová M., Šimková H., Doležel J., Järve K. (2012): Fine mapping, phenotypic characterization and validation of non-race-specific resistance to powdery mildew in a wheat–Triticum militinae introgression line. *Theoretical and Applied Genetics* **125**, 609–623.
28. Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J. A., and Charpentier E. (2012): A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science* **337**, 816–821.
29. Johnson J.A., Bragg J.N., Lawrence D.M., Jackson A.O. (2003): Sequence elements controlling expression of Barley stripe mosaic virus subgenomic RNAs in vivo. *Virology* **313**, 66–80.

30. Kalinina N.O., Solovyev A.G., Schiemann J., Chernov B.K., Ustinova S.V., Prokhorov V.V., Klinov D.V., Stroganova T.A., Zamyatin A.A., Yelina N.E., Rakitina D.A., Morozov S.Y. (2001): RNA-binding properties of the 63 kDa protein encoded by the triple gene block of poa semilatifolius hordeivirus. *Journal of General Virology* **82**, 2569–2578.
31. Kalinina N., Rakitina D., Solovyev A., Schiemann J., Morozov S. (2002): RNA Helicase Activity of the Plant Virus Movement Proteins Encoded by the First Gene of the Triple Gene Block. *Virology* **296**, 321–329.
32. Kawalek A., Dmochowska-Boguta M., Nadolska-Orczyk A., Orczyk W. (2012): A new BSMV-based vector with modified β molecule allows simultaneous and stable silencing of two genes. *Cellular and Molecular Biology Letters* **17**.
33. Koonin E.V., Boyko V.P., Dolja V.V. (1991): Small cysteine-rich proteins of different groups of plant RNA viruses are related to different families of nucleic acid-binding proteins. *Virology* **181**, 395–398.
34. Koonin E.V., Dolja V.V., Morris T.J., (1993): Evolution and Taxonomy of Positive-Strand RNA Viruses: Implications of Comparative Analysis of Amino Acid Sequences. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **28**, 375–430.
35. Kozukue N., Misoo S., Yamada T., Kamijima O., Friedman M. (1999) Inheritance of Morphological Characters and Glycoalkaloids in Potatoes of Somatic Hybrids between Dihaploid Solanum acaule and Tetraploid Solanum tuberosum. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**, 4478–4483.
36. Krishna H., Alizadeh M., Singh D., Singh U., Chauhan N., Eftekhari M., Sadh R.K. (2016): Somaclonal variations and their applications in horticultural crops improvement. *3 Biotech* **6**.
37. Kumari S.G., Muharram I., Makkouk K.M., Al-Ansi A., El-Pasha R., Al-Motwkel W.A., Kassem A.H. (2006): Identification of viral diseases affecting barley and bread wheat crops in Yemen. *Australasian Plant Pathology* **35**, 563.
38. Köklü, G. (2004): Occurrence of cereal viruses on wheat in Tekirdag, Turkey. *Phytoprotection* **85**, 19.
39. Larkin P.J., Scowcroft W.R. (1981): Somaclonal variation — a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theoretical and Applied Genetics* **60**, 197–214.
40. Lawrence D.M., Jackson, A.O. (2001): Requirements for cell-to-cell movement of Barley stripe mosaic virus in monocot and dicot hosts. *Molecular Plant Pathology* **2**, 65–75.
41. Lim H.-S., Bragg J.N., Ganesan U., Lawrence D.M., Yu J., Isogai M., Hammond J., Jackson A.O. (2008): Triple Gene Block Protein Interactions Involved in Movement of Barley Stripe Mosaic Virus. *Journal of Virology* **82**, 4991–5006.
42. Lukaszewski A.J., Rybka K., Korzun V., Malyshev S.V., Lapinski B., Whitkus R. (2004): Genetic and physical mapping of homoeologous recombination points involving wheat chromosome 2B and rye chromosome 2R. *Genome* **47**, 36–45.

43. McFarland J.E., Brakke M., Jackson A., (1983): Complexity of the Argentina mild strain of barley stripe mosaic virus. *Virology* **130**, 397–402.
44. McMullen C.R. (1978) Aberrant Plastids in Barley Leaf Tissue Infected with Barley Stripe Mosaic Virus. *Phytopathology* **68**, 317.
45. Morozov S.Y. (2003): Triple gene block: modular design of a multifunctional machine for plant virus movement. *Journal of General Virology* **84**, 1351–1366.
46. Najar A., Makkouk K.M., Kumari S.G. (2000): First Record of Barley yellow striate mosaic virus, Barley stripe mosaic virus, and Wheat dwarf virus Infecting Cereal Crops in Tunisia. *Plant Disease* **84**, 1045–1045.
47. Nalam V.J., Vales M.I., Watson C.J.W., Kianian S.F., Riera-Lizarazu O. (2005): Map-based analysis of genes affecting the brittle rachis character in tetraploid wheat (*Triticum turgidum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* **112**, 373–381.
48. Petty I.T., Edwards M.C., Jackson A.O. (1990): Systemic movement of an RNA plant virus determined by a point substitution in a 5 leader sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **87**, 8894–8897.
49. Petty I.T., French R., Jones R.W., Jackson A.O. (1990): Identification of barley stripe mosaic virus genes involved in viral RNA replication and systemic movement. *The EMBO Journal* **9**, 3453–3457.
50. Petty I., Hunter B., Wei N., Jackson A. (1989): Infectious Barley stripe mosaic virus RNA transcribed in Vitro from full-length genomic cDNA clones. *Virology* **171**, 342–349.
51. Petty I., Jackson A. (1990): Mutational analysis of barley stripe mosaic virus rna β . *Virology* **179**, 712–718.
52. Qi T., Guo J., Peng H., Liu P., Kang Z., Guo J. (2019): Host-Induced Gene Silencing: A Powerful Strategy to Control Diseases of Wheat and Barley. *International Journal of Molecular Sciences* **20**, 206.
53. Savenkov E.I., Solovyev A.G., Morozov S.Y. (1998): Genome sequences of poa semilantent and lychnis ringspot hordeiviruses. *Archives of Virology* **143**, 1379–1393.
54. Appels R., Eversole K., Stein N., Feuillet C., Keller B., Rogers J., Pozniak C.J., Choulet F., Distelfeld A., Poland J., Ronen G., Sharpe A.G., Barad O., Baruch K., Keeble-Gagnère G., Mascher M., Ben-Zvi G., Josselin A.-A., Himmelbach A., Balfourier F., Gutierrez-Gonzalez J., Hayden M., Koh C., Muehlbauer G., Pasam R.K., Paux E., Rigault P., Tibbits J., Tiwari V., Spannagl M., Lang D., Gundlach H., Haberer G., Mayer K.F.X., Ormanbekova D., Prade V., Šimková H., Wicker T., Swarbreck D., Rimbart H., Felder M., Guilhot N., Kaithakottil G., Keilwagen J., Leroy P., Lux T., Twardziok S., Venturini L., Juhász A., Abrouk M., Fischer I., Uauy C., Borrill P., Ramirez-Gonzalez R.H., Arnaud D., Chalabi S., Chalhoub B., Cory A., Datla R., Davey M.W., Jacobs J., Robinson S.J., Steuernagel B., Ex F.V., Wulff B.B.H., Benhamed M., Bendahmane A., Concia L., Latrasse D., Bartoš J., Bellec A., Berges H., Doležel J., Frenkel Z., Gill B., Korol A., Letellier T., Olsen O.-A., Singh K., Valárik M., Vossen E.V.D., Vautrin S., Weining S., Fahima T., Glikson V., Raats D., Čihalíková J., Toegelová H., Vrána J., Sourdille P., Darrier B., Barabaschi D., Cattivelli L., Hernandez P., Galvez S., Budak H., Jones J.D.G., Witek K., Yu G., Small I., Melonek J., Zhou R., Belova T., Kanyuka K., King R., Nilsen K., Walkowiak

S., Cuthbert R., Knox R., Wiebe K., Xiang D., Rohde A., Golds T., Čížková J., Akpinar B.A., Biyiklioglu S., Gao L., N'Daiye A., Kubaláková M., Šafář J., Alfama F., Adam-Blondon A.-F., Flores R., Guerche C., Loaec M., Quesneville H., Condie J., Ens J., Maclachlan R., Tan Y., Alberti A., Aury J.-M., Barbe V., Couloux A., Cruaud C., Labadie K., Mangenot S., Wincker P., Kaur G., Luo M., Sehgal S., Chhuneja P., Gupta O.P., Jindal S., Kaur P., Malik P., Sharma P., Yadav B., Singh N.K., Khurana J.P., Chaudhary C., Khurana P., Kumar V., Mahato A., Mathur S., Sevanthi A., Sharma N., Tomar R.S., Holušová K., Plíhal O., Clark M.D., Heavens D., Kettleborough G., Wright J., Balcárková B., Hu Y., Salina E., Ravin N., Skryabin K., Beletsky A., Kadnikov V., Mardanov A., Nesterov M., Rakitin A., Sergeeva E., Handa H., Kanamori H., Katagiri S., Kobayashi F., Nasuda S., Tanaka T., Wu J., Cattonaro F., Jiumeng M., Kugler K., Pfeifer M., Sandve S., Xun X., Zhan B., Batley J., Bayer P.E., Edwards D., Hayashi S., Tulpová Z., Visendi P., Cui L., Du X., Feng K., Nie X., Tong W., Wang L. (2018): Shifting the limits in wheat research and breeding using a fully annotated reference genome. *Science* **361**.

55. Simons K.J., Fellers J.P., Trick H.N., Zhang Z., Tai Y.-S., Gill B.S., Faris J.D. (2005): Molecular Characterization of the Major Wheat Domestication Gene Q. *Genetics* **172**, 547–555.

56. Slack S.A. (1975): Spread of Seed-Borne Barley Stripe Mosaic Virus and Effects of the Virus on Barley in California. *Phytopathology* **65**.

57. Slater A., Scott N.W., Fowler M.R. (2008): Plant biotechnology the genetic manipulation of plants. Oxford University Press, Oxford, 400 stran.

58. Solovyev A., Savenkov E., Agranovsky A., Morozov S. (1996): Comparisons of the Genomic Elements and Coding Regions in RNA β Components of the Hordeiviruses Barley Stripe Mosaic Virus, Lychnis Ringspot Virus, and Poa Semilatifolius Virus. *Virology* **219**, 9–18.

59. Solovyev A., Savenkov E., Grdzelišvili V., Kalinina N., Morozov S., Schiemann J., Atabekov J. (1999): Movement of Hordeivirus Hybrids with Exchanges in the Triple Gene Block. *Virology* **253**, 278–287.

60. Stadler L.J. (1928): Genetic Effects of X-Rays in Maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **14**, 69–75.

61. Tresh J.M. (1982): HANDBOOK OF PLANT VIRUS INFECTIONS: COMPARATIVE DIAGNOSIS.

62. Tyulkina L., Karpova O., Rodionova N., Atabekov J. (1987): Site-specific cleavage and religation of viral RNAs I. Infectivity of barley stripe mosaic virus RNA religated from functionally active segments and restoration of the internal poly(A) tract in progeny. *Virology* **159**, 312–320.

63. UN Home Page: <https://www.un.org/en/> (5.4.2019)

64. Wang Y., Cheng X., Shan Q., Zhang Y., Liu J., Gao C., Qiu, J.-L. (2014): Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nature Biotechnology* **32**, 947–951.

65. Yelina N.E., Savenkov E.I., Solovyev A.G., Morozov S.Y., Valkonen J.P.T. (2002): Long-Distance Movement, Virulence, and RNA Silencing Suppression Controlled by a

Single Protein in Hordei- and Potyvirus: Complementary Functions between Virus Families. *Journal of Virology* **76**, 12981–12991.

66. Yelina N.E. (2005): Localization of Poa semilatifolia virus cysteine-rich protein in peroxisomes is dispensable for its ability to suppress RNA silencing. *Journal of General Virology* **86**, 479–489.

67. Yuan C., Li C., Yan L., Jackson A.O., Liu Z., Han C., Yu J., Li D. (2011): A High Throughput Barley Stripe Mosaic Virus Vector for Virus Induced Gene Silencing in Monocots and Dicots. *PLoS ONE* **6**.

68. Zhao C., Liu B., Piao S., Wang X., Lobell D. B., Huang Y., Huang M., Yao Y., Bassu S., Ciaffaglia P., Durand J.-L., Elliott J., Ewert F., Janssens I. A., Li T., Lin E., Liu Q., Martre P., Müller C., Peng S., Peñuelas J., Ruane A. C., Wallach D., Wang T., Wu D., Liu Z., Zhu Y., Zhu Z., Asseng, S (2017): Temperature increase reduces global yields of major crops in four independent estimates. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **114**, 9326–9331.

69. A) Zhou H., Jackson A. (1996): Expression of the Barley Stripe Mosaic Virus RNA β “Triple Gene Block.” *Virology* **216**, 367–379.

70. B) Zhou H., Jackson A.O. (1996): Analysis of cis-Acting Elements Required for Replication of Barley Stripe Mosaic Virus RNAs. *Virology* **219**, 150–160.