

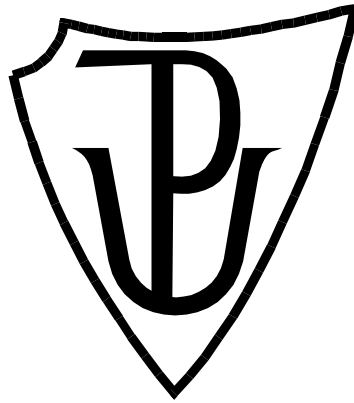
Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2023

Bc. Klára Ajglová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



Regulace exprese rostlinných genů viry

Diplomová práce

Bc. Klára Ajglová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2023

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

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Klára AJGLOVÁ**
Osobní číslo: **R21921**
Studijní program: **N0511A030046 Molekulární a buněčná biologie**
Téma práce: **Regulace exprese rostlinných genů viry**
Zadávající katedra: **Katedra buněčné biologie a genetiky**

Zásady pro vypracování

1. Literární rešerše a struktura genomu rostlinných virů.
2. Příprava expresních a "silencing" virových konstruktů.
3. Transformace rostlin virovou infekcí.
4. Hodnocení fenotypových projevů transformovaných rostlin.
5. Zpracování literární rešerše pro DP, vyhodnocení výsledků a jejich interpretace.

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

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

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

Čermák et al.: A Multi-purpose Toolkit to Enable Advanced Genome Engineering in Plants. *Plant Cell Advance Publication*, 2017, doi:10.1105/tpc.16.00922

Cheuk and Houde : A rapid and efficient method for uniform gene expression using the barley stripe mosaic virus. *Plant Methods*, 2017, DOI 10.1186/s13007-017-0175-5

Vedoucí diplomové práce:

Mgr. Miroslav Valárik, Ph.D.

Ústav Experimentální botaniky, Sokolovská 6, Olomouc

Datum zadání diplomové práce: 26. října 2021
Termín odevzdání diplomové práce: 31. července 2023

L.S.

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

Bibliografické údaje

Jméno a příjmení autora	Bc. Klára Ajglová
Název práce	Regulace exprese rostlinných genů viry
Typ práce	díplomová
Pracoviště	Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UP v Olomouci
Vedoucí práce	Mgr. Miroslav Valárik, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2023

Abstrakt

Blumeria graminis způsobující chorobu padlí travní u hospodářských rostlin je významným škůdcem ječmene a dalších významných plodin. Rostliny si proti tomuto patogenu vyvinuly specifickou imunitu, díky které dokáží zastavit proliferaci patogenu. Tato imunita je představována geny rezistence, které cílí na geny virulence patogenu v rámci hypotézy gen-proti-genu. Geny virulence, které jsou rozpoznávány genem rezistence, jsou označovány jako geny avirulence. Toto rozpoznání vede k hypersenzitivní odpovědi v místě napadení rostlin. Validace genů avirulence má velký význam pro produkci rezistentních odrůd ječmene. Metod validace je celá řada, v této práci je používána metoda VOX a listová abraze.

Klíčová slova

rostlinná imunita, NLR-proteiny, geny rezistence, geny avirulence, *Hordeum vulgare*, *Blumeria graminis*, VOX, *Barley Stripe Mosaic Virus*

Počet stran 66

Počet příloh 0

Jazyk český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Bc. Klára Ajglová
Title	Regulation of plant genes expression mediated by viruses
Type of thesis	master
Department	Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science, Palacký University Olomouc
Supervisor	Mgr. Miroslav Valárik, Ph.D.
The year of presentation	2023
Abstract	<p><i>Blumeria graminis</i>, which causes powdery mildew in agricultural crops, is a significant pest of barley and other important crops. Plants have developed a specific immunity against this pathogen, thanks to which they can stop the proliferation of the pathogen. This immunity is represented by resistance genes which target the virulence genes of the pathogen in terms of the gene-for-gene hypothesis. Virulence genes that are recognized by a resistance gene are referred to as avirulence genes, and this recognition leads to a hypersensitive response at the site of plant infection. Validation of avirulence genes is of great importance to produce resistant barley varieties. There are many validation methods, in this work the VOX method and leaf abrasion are used.</p>
Keywords	plant immunity, NLR-proteins, resistance genes, avirulence genes, <i>Hordeum vulgare</i> , <i>Blumeria graminis</i> , VOX, <i>Barley Stripe Mosaic Virus</i>
Number of pages	66
Number of appendices	0
Language	czech

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

V Olomouci

6. 4. 2023

Bc. Klára Ajglová

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému vedoucímu Mgr. Miroslavu Valárikovi, Ph. D., za cenné rady a odborné vedení. Dále děkuji Mgr. Janu Bartoši, Ph. D., který mi umožnil diplomovou práci na Ústavu experimentální botaniky AV ČR v.v.i. v Olomouci vykonávat.

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	CÍLE PRÁCE	2
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED	3
3.1	Imunitní systém rostlin a interakce s patogeny	3
3.1.1	PAMP-vyvolaná imunita	4
3.1.1.1	Mechanismus PTI	5
3.1.2	Efektorem vyvolaná imunita (ETI).....	5
3.1.2.1	Efektorové proteiny patogenů	6
3.1.2.1.1	Bakteriální efekторы	6
3.1.2.1.2	Efektory oomycet	6
3.1.2.1.3	Efektory hub	7
3.1.2.2	Hostitelské geny rezistence.....	8
3.2	Interakce mezi <i>Blumeria graminis</i> f. sp. <i>hordei</i> a <i>Hordeum vulgare</i>	9
3.2.1	<i>Hordeum vulgare</i>	9
3.2.2	<i>Blumeria graminis</i> f. sp. <i>hordei</i> (<i>Bgh</i>).....	9
3.2.2.1	Životní cyklus <i>Bgh</i>	9
3.2.3	Hypotéza gen-proti-genu	11
3.2.3.1	Geny rezistence v ječmeni	12
3.2.3.2	Geny avirulence <i>B. graminis</i> f. sp. <i>hordei</i>	13
3.3	Způsoby validace patogenních genů avirulence	13
3.3.1	Dvouhybridní kvasinkový systém	13
3.3.2	<i>Agrobacterium</i> -zprostředkovaná transientní exprese genů v <i>Nicotiana benthamiana</i>	14
3.3.3	Virem indukovaná nadexprese genů (VOX).....	15
3.3.3.1	<i>Potato virus X</i>	16
3.3.3.2	<i>Tobacco Mosaic Virus</i>	17
3.3.3.3	<i>Barley Stripe Mosaic Virus</i>	17
3.3.3.4	<i>Foxtail Mosaic Virus</i>	20
4	MATERIÁL A METODY	21
4.1	Biologický materiál	21
4.2	Použité chemikálie, kity a roztoky	21
4.3	Seznam použitých přístrojů a zařízení	23
4.4	Použité experimentální a vyhodnocovací postupy	24
4.4.1	Klonování kandidátních genů do virového vektoru <i>BSMV</i>	24
4.4.1.1	Extrakce a purifikace plazmidové DNA – MiniPrep	26
4.4.1.2	Restrikční štěpení virového vektoru	27
4.4.1.3	Fluorimetrické stanovení koncentrace DNA.....	28
4.4.1.4	Purifikace produktů PCR reakce	28
4.4.2	Transformace buněk <i>Escherichia coli</i> DH5 α elektroporací.....	29
4.4.2.1	Příprava elektrokompetentních buněk.....	29
4.4.2.2	Elektroporace	29
4.4.2.3	Colony PCR pro ověření úspěšnosti transformace.....	30
4.4.2.4	Agarózová gelová elektroforéza PCR produktů.....	31

4.4.2.5	Sekvenace	31
4.4.3	Transformace <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	31
4.4.4	Agroinfiltrace	31
4.4.4.1	Verifikace úspěšnosti agroinfiltrace fluorescenční mikroskopií	33
4.4.5	Optimalizace metod pro transformaci jednoděložných rostlin	33
4.4.5.1	Listová abraze	33
4.4.5.2	Imbibice	34
5	VÝSLEDKY	35
5.1	Příprava virových konstruktů nesoucích <i>AVR</i> geny	35
5.2	Ověření úspěšnosti agroinfiltrace	36
5.3	Ověření úspěšnosti listové abraze a imbibice	38
6	DISKUZE	39
7	ZÁVĚR	43
8	LITERATURA	44

SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

AD	aktivační doména
ALBV	<i>Anthoxanthum Latent Blanching Virus</i>
AVR	avirulence
BAK1	<i>BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1-ASSOCIATED KINASE 1</i>
Bgh	<i>Blueria graminis hordei</i>
bp	páry bází
BSMV	<i>Barley stripe mosaic virus</i>
CC	coiled-coil
CP	obalový protein
CSEPs	kandidátní efektorové proteiny
DAMP	danger-associated molecular pattern
DBD	DNA vazebná doména
ECD	extracelulární doména
EF-TU	expresní faktor TU
ETI	efektorem-vyvolaná imunita
FECT	vektory odvozené od Foxtail mosaic virus
FLS2	<i>FLAGELLIN-SENSING 2</i>
FoMV	<i>Foxtail mosaic virus</i>
GDD	doména tvořená glycinem a dvěma kyselinami asparagovými
GUS	β -glukuronidázový gen
GWAS	genome-wide association study
Hel	helikázová doména
HIGS	hostitelem indukované umlčování genů
HR	hypersenzitivní odpověď
ID	vnitřní doména
iLOV	fotoreverzibilní fluorescenční protein
KD	kinázová doména

LRR	na leucin bohaté repetice
LRSV	<i>Lychnis ringspot virus</i>
LysM	lysinový motiv
MAP	mitogenem aktivovaná protein kináza
MI	Mildew locus
Mt	metyltransferázová doména
NBD	nukleotid vázající doména
NHEJ	nehomologní rekombiace
NLR	nod-like receptor
PAMP	pathogen-associated molecular patterns
PCR	polymerázová řetězová reakce
PRR	pattern recognition receptor
PSLV	<i>Poa semilatent virus</i>
PTGS	posttranskripční genové umlčování
PTI	PAMP-vyvolaná imunita
PVX	<i>Potato virus X</i>
R	rezistence
RALPH	RNase-like proteiny exprimované haustorii
RdRp	RNA-dependentní RNA polymeráza
RLK	receptorová kináza
RLP	receptorový protein
Ror	required for mlo resistance
ROS	kyslíkový radikál
SERK	<i>SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE</i>
sg	subgenomická
SNARE	N-ethylamid-senzitivní proteinový receptor
STAND	signál-přenášející ATPázy s mnoha doménami
T3E	typ III efektorové molekuly

T-DNA	transferová DNA
TGB	triple gene block
TIR	Toll-interleukin 1 receptorová doména
TMV	<i>Tobacco mosaic virus</i>
TTSS	typ-III sekreční systém
UTR	nepřekládaná oblast
VIGS	virem indukované umlčování genů
vir	gen virulence
VOX	virem indukovaná nadexprese genů
VRK	virový replikační komplex
vRNA	virová RNA

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Schéma obranného systému rostlinné buňky.	4
Obrázek 2: Známé strukturní motivy houbových efektorů.	8
Obrázek 3: Životní cyklus <i>Blumeria graminis</i>	11
Obrázek 4: Organizace genomu Barley Stripe Mosaic Virus.	18
Obrázek 5: Produkty PCR amplifikace vzorků izolované plazmidové DNA s AVR inzerty.	35
Obrázek 6: Produkty PCR amplifikace vzorku izolované plazmidové DNA s inzertem <i>AVR_{a3}</i> . .	36
Obrázek 7: Konfokální fluorescenční mikroskopie listů <i>N. benthamiana</i>	37
Obrázek 8: Detekce fluorescenčního signálu reportérového genu <i>iLOV</i> napříč vrstvami (Z-stack).	38

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Schéma pipetování reakční PCR směsi s Q5 HF DNA polymerázou.....	25
Tabulka 2: Seznam primerů a jejich použití.	25
Tabulka 3: Podmínky PCR reakce s Q5 HF DNA polymerázou.	26
Tabulka 4: Reakční směs pro štěpení virového vektoru $\gamma 2:iLOV$ enzymem <i>NcoI</i>	27
Tabulka 5: Příprava pracovního roztoku pro Qubit.	28
Tabulka 6: Tabulka pro přípravu 10 μ l ligační směsi.....	28
Tabulka 7: Schéma pipetování PCR reakční směsi za použití <i>Taq</i> polymerázy.....	30
Tabulka 8: Podmínky PCR reakce s <i>Taq</i> DNA polymerázou	30
Tabulka 9: Příprava agroinfiltračního pufru.	32

1 ÚVOD

Jednoděložná rostlina ječmen (*Hordeum vulgare*) je jednou z nejstarších obilovin a jeho pěstování sahá až do doby před 85 000 lety, tedy do mladší doby kamenné. Tento historický údaj poukazuje na významnost a udržitelnost této plodiny z hlediska obživy. Přibližně 70 % celosvětové produkce ječmene je využito jako krmivo pro dobytek, zbylých ≈30 % je využíváno k výrobě sladu. Z nutričního hlediska je ječmen významným zdrojem proteinů, B vitaminů, minerálů a vlákniny. Je také zdrojem hořčíku a fosforu. Dnes se ječmen řadí z hlediska celosvětové produkce na čtvrtou pozici. Zemědělci však čelí mnoha výzvám, které v průběhu let vyvstávají a zapříčiňují pomalý růst výnosnosti úrod. Mezi faktory ovlivňující výnos se řadí biotický a abiotický stres. Z biotických stresových faktorů jsou nejvýraznější změny klimatu, skleníkové emise, sucho a záplavy. Tyto faktory limitují produkci a vedou k celosvětovému zvyšování cen obilovin. Mezi nejdůležitější biotické stresové faktory patří onemocnění, která způsobují infekční patogeny. Genomy patogenních hub, bakterií a oomycet infikujících rostliny kódují řadu virulentních proteinů, které buď interferují s obranným mechanismem rostlin, nebo ovlivňují rostlinný mechanismus ve svůj prospěch. Houbový patogen *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* je ekonomicky významným škůdcem ječmene, u kterého způsobuje chorobu padlí travní a může tak způsobit ztráty na výnosu a kvalitě až 45 %. *Blumeria graminis* produkuje virulentní proteiny, které mohou interagovat s obranným systémem ječmene. Tento systém představují rostlinné vnitrobuněčné imunitní receptory NLR s nukleotidovou vazebnou doménou, které produkují geny rezistence. Tyto receptory po specifickém rozpoznání patogenu spustí signální dráhu rezistence. Geny, případně jejich produkty pocházející z *Blumeria graminis*, které jsou rozpoznávány proteiny rezistence, se nazývají geny avirulence a geny které nejsou hostitelem rozpoznány a umožňují napadení se označují jako geny virulence. Rozpoznání proteinu avirulence proteinem rezistence vede k hypersenzitivní reakci, která má za cíl zabránit proliferaci patogenu. Studium genů avirulence přináší důležité poznatky v rámci rostlinného šlechtitelství pro produkci rezistentních odrůd ječmene. K identifikaci genů avirulence lze využívat řadu metod reverzní genetiky mezi nimi agroinfiltraci, nebo dnes rapidně se vyvíjející metody zahrnující virové vektory. Tato práce je zaměřena na validaci kandidátních genů avirulence patogenu *Blumeria graminis* pomocí metod agroinfiltrace a virem indukované nadexprese genů (VOX).

2 CÍLE PRÁCE

Cílem teoretické části této diplomové práce byla literární rešerše zahrnující témata rostlinné imunity, rostlinných virů, struktury jejich genomu a interakce s hostitelem.

Cílem experimentální části bylo připravit konstrukty čtyřpodjednotkového virového vektoru *BSMV* s inzerty kandidátních genů avirulence *AVR_{a3}*, *AVR_{kl}*, *AVR_{all}* a *AVR_{mu}* pocházejících z houbového patogenu *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*. Dalším krokem bylo optimalizovat metody pro validaci kandidátních genů avirulence pomocí metod agroinfiltrace, virem indukované nadexprese v ječmeni a listové abraze. V neposlední řadě bylo cílem optimalizovat metodu imbibice.

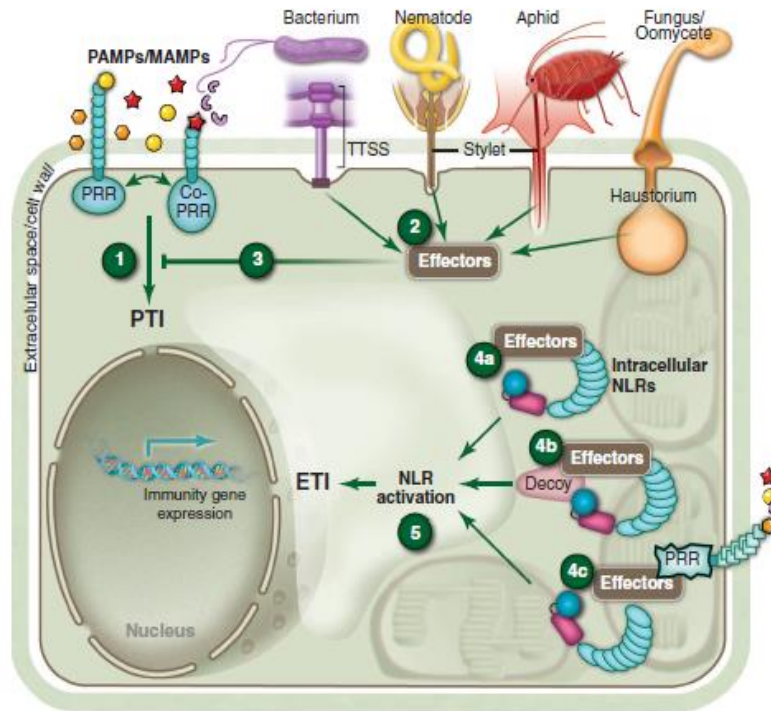
3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Imunitní systém rostlin a interakce s patogeny

Rostliny jsou neustále vystavovány široké škále patogenů, ale zůstávají rezistentní vůči většině mikrobiálních škůdců (Bettgenhaeuser *et al.*, 2021), které je provázejí již od doby, kdy vystoupily na souš před 400–500 milióny let (Dangl *et al.*, 2013). Zachycení environmentálních signálů a schopnost poskytnutí adekvátní odpovědi jsou nezbytné pro přežití organismů. Na rozdíl od živočichů, rostliny nedisponují specializovanými buňkami imunitního systému, proto se spoléhají na reakce vnitřních imunitních mechanismů a schopnost každé buňky odhalit nebezpečí a spustit mechanismy rezistence vůči škůdcům, kterými mohou být viry, bakterie, houby atd. (Maekawa *et al.*, 2011).

Patogeny nejdříve musí překonat hostitelské bariéry, jako je např. vosková vrstva nebo silná buněčná stěna. K průniku do hostitele a ke svému množení využívají patogeny různých životních strategií. Patogenní bakterie do hostitele vstupují jako součást vody či plynu, nebo skrze poranění a následně proliferují v mezibuněčných prostorech (apoplastu). Nematoda a amfidy napadají rostlinné buňky pomocí bodce. Houby mohou vstupovat přes buněčnou stěnu nebo vytvářejí hyfy na povrchu, uprostřed nebo napříč rostlinnou buňkou. Patogenní a symbiotické houby často disponují speciálními orgány k výživě. Těmito orgány jsou haustoria, která pronikají skrze hostitelskou plazmatickou membránu. Všechny zmíněné skupiny patogenů vylučují do hostitelské rostliny efektorové molekuly, nazývané též faktory virulence, které jsou zodpovědné za oslabení hostitelské rostliny a za vznik infekce (Jones a Dangl, 2006).

Rostliny disponují dvěma skupinami obranných systémů (Obr. 1), které mohou detekovat patogeny. První skupina je označována jako PAMP-vyvolaná imunita (PTI) a je založena na rozpoznání specifických molekulárních struktur na povrchu buněk patogenu (Pathogen-associated molecular pattern, PAMP), které jsou rostlinnou buňkou vyhodnoceny jako nebezpečné signály. Druhou skupinou je efektor-vyvolaná imunita (Effector-triggered Immunity, ETI), která se u některých patogenů vyvinula k překonání PTI. ETI zahrnuje rozpoznání specializovaných patogenních efektorových proteinů, které jsou vylučovány patogenem do hostitele a podněcují patogenní virulenci (Jones a Dangl, 2006).



Obrázek 1: Schéma obranného systému rostlinné buňky.

Patogeny všech tříd životních stylů (barevně odděleny a popsány) produkují při kolonizaci rostlin pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) a microbe-associated molecular pattern (MAMPs). Rostliny zachytávají PAMPs a MAMPs pomocí extracelulárních pattern recognition receptors (PRR) a zahajují PAMP-vyvolanou imunitu (PTI) (1). Patogeny produkují efektorové proteiny jak do prostoru apoplastu (není na obrázku znázorněno), tak dovnitř buňky (2) a inhibují PTI (3). Intracelulární rostlinné NLR receptory (Nod-Like Receptors) mohou rozpoznat efektorové proteiny třemi způsoby (4a – 4c), z nichž všechny vedou k vyvolání ETI (5). Prvním způsobem je přímá interakce ligandu s receptorem (4a). Druhou variantou je rozpoznání díky efektorovým proteinem vyvolané změně speciálního proteinu, který slouží jako návnada (Decoy) a strukturně imituje cíl efektorového proteinu (4b). Třetí způsob zahrnuje rozpoznání díky efektorovým proteinem vyvolané změně v hostitelském proteinu, který je cílem virulence např. cytosolická doména PRR (4c). Převzato z práce Dangl *et al.* (2013).

3.1.1 PAMP-vyvolaná imunita

První obrannou linií rostlin je detekce patogenů pomocí PTI (Zipfel, 2008). PTI zahrnuje receptory zvané pattern recognition receptors (PRRs) na vnější straně hostitelské buňky, které rozpoznávají mikrobiální buněčné struktury – PAMPs. Mezi PAMPs řadíme např. bakteriální flagelin nebo houbový chitin, které jsou esenciálními složkami patogenu (Dodds a Rathjen, 2010).

Rozpoznání PAMPs pomocí PRRs vede k vyvolání PTI imunity, která může zastavit kolonizaci rostliny patogenem (Jones a Dangl, 2006). Rostliny jsou schopny detekce i vlastních endogenních částí, které jsou uvolňovány při kolonizaci patogenem, například části buněčné stěny, nebo fragmenty kutikuly. Tyto částice označujeme jako danger-associated molecular patterns (DAMPs) (Dodds a Rathjen, 2010).

3.1.1.1 Mechanismus PTI

Vnitrobuněčné odpovědi vyvolané PTI zahrnují rychlý tok iontů napříč plazmatickou membránou, MAP kinázovou aktivitu, produkci kyslíkových radikálů (Reactive oxygen species, ROS), rapidní změny genové exprese a zesílení buněčné stěny. Na rozdíl od živočišných PRR, které jsou lokalizovány, jak na povrchu, tak uvnitř buněk, jsou rostlinné PRR lokalizovány výhradně na buněčném povrchu (Zipfel, 2008). Rodina PRR receptorů zahrnuje receptorové kinázy (RLK) a receptorové proteiny (RLP), ty jsou první překážkou pro patogen. RLK-PRRs obsahují variabilní N-koncovou extracelulární doménu (ECD), transmembránový segment (TM) a konzervovanou cytoplazmatickou kinázovou doménu (KD). ECD domény detekují ligand a aktivují KD, to má za následek imunitní signalizaci. RLP-PRR nedíseponují KD doménami, proto často spolupracují s RLK-PRR (Wang a Chai, 2020).

RLK-PRR jsou členěny do několika skupin na základě ECD. Největší skupinou jsou receptorové kinázy tvořené repetitivními bohatými na leucin (LRR-RKs). Do této skupiny se řadí například FLAGELLIN-SENSING 2 (FLS2) a EF-TU přítomné u *Arabidopsis thaliana*, které rozpoznávají PAMPs peptidových epitopů flagelinu a elongačního faktoru při obraně proti bakteriím. Další skupinou jsou RLK s lysinovým motivem (LysM-RLK), které rozpoznávají polysacharidové PAMPs jako například chitin. Poslední skupina zahrnuje extracelulární RLK s extracelulárními lektinovými doménami. U RLP-PRR rozlišujeme skupiny jako jsou např. LRR-RLP a LysM-RLP (Wang a Chai, 2020). RLP-PRR mají podobnou strukturu jako RLK, ale postrádají intracelulární cytoplazmatickou kinázovou doménu (Macho a Zipfel, 2014).

Většina PRR vyžaduje ke své funkci LRR-RK BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1-ASSOCIATED KINASE 1 (BAK1). BAK1 je řazena do podrodiny LRR typu II, která zahrnuje 14 členů, z nichž 5 je pojmenováno SERK1–5 (SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 1–5) (Zipfel, 2008). BAK1 nehraje přímou roli v detekci patogenů, ale vytváří heterokomplexy s jinými PRRs. Heterokomplex je fosforylován 30–60 sekund po detekci patogenu. Fosforylace heterokomplexu vede k následné imunitní signalizaci. BAK1 je označována za centrální regulátor rostlinné imunity a jako takový je proto často cílem efektorových molekul patogenu (Dodds a Rathjen, 2010).

Struktura a funkce PAMPs a PRR jsou často konzervativní napříč genovými rodinami. PTI je účinná proti neadaptovaným patogenům v jevu zvaném nehostitelská rezistence (non-host resistance) (Dodds a Rathjen, 2010). Jedná se o komplexní sadu obranných mechanismů, které společně fungují proti široké škále patogenů (Jørgensen a Wolfe, 1994).

3.1.2 Efektorem vyvolaná imunita (ETI)

ETI je druhou třídou obranných mechanismů rostlin, která zahrnuje rozpoznání specializovaných patogenních efektorů vylučovaných patogenem do hostitelské rostliny. Tyto efektorové proteiny jsou příčinou patogenní virulence a rozvinuly se u patogenů k překonání PTI. Rozpoznání efektorových

proteinů vede k efektorům vyvolané imunitě (ETI) (Jones a Dangl, 2006). Efektorové proteiny však mohou být rozpoznávány rostlinnými geny rezistence (*R*), v takovém případě jsou rozpoznávané efektorové proteiny označovány jako proteiny avirulence (*AVR*), které jsou exprimovány z příslušných genů avirulence (Petit-Houdenot a Fudal, 2017).

Vývojový mechanismus ETI je založen na koevoluční dynamice mezi patogenem a hostitelskou rostlinou, což vede k velké variabilitě efektorových proteinů, proto je ETI aktivní při styku s adaptovanými patogeny. Jak se bude patogen bránit, závisí zejména na elicitorech molekulách, které jsou specifické každé infekci (Dodds a Rathjen, 2010). ETI poskytuje rychlejší a silnější odpověď než PTI a má často za následek lokalizovanou buněčnou smrt zvanou hypersenzitivní odpověď (HR) v místě napadení hostitele (Jones a Dangl, 2006).

3.1.2.1 Efektorové proteiny patogenů

Většina efektorových proteinů je pro každý patogen jedinečná, a dokonce i blízké příbuzné patogeny mají jen malou podobnost svých efektorových proteinů. Tato skutečnost pravděpodobně odráží jejich velmi rychlou evoluci, která byla zapříčiněna, jak potřebou patogenu překonat obranný systém hostitele, tak nutností hostitele na toto přizpůsobení reagovat. Studium a snaha o identifikaci efektorových proteinů probíhá intenzivně u tří skupin patogenů, kterými jsou bakterie, oomycety a houby (Panstruga a Dodds, 2009).

3.1.2.1.1 Bakteriální efekty

Jednotlivé fytopatogenní druhy bakterií kódují 20–30 efektorových proteinů, které jsou vylučovány přímo do hostitelské cytoplazmy pomocí jehlovité struktury, též zvané typ-III sekreční systém (TTSS). Bakteriální efekty se nazývají typ III efektorové molekuly (T3E) a jsou rozpoznávány hostitelskými NLR receptory. T3E vyvolávají modifikace hostitelských proteinů, a právě tyto modifikace jsou detekovány rostlinnými NLR, které následně aktivují ETI (Khan *et al.*, 2016). Mezi kmeny bakterií využívající TTSS řadíme například *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Ralstonia*, *Erwinia* a *Pantoea*. Všechny tyto kmeny kolonizují apoplast hostitele a vyvolávají buněčnou smrt v různých fázích patogeneze (Alfano a Collmer, 2004).

3.1.2.1.2 Efekty oomycet

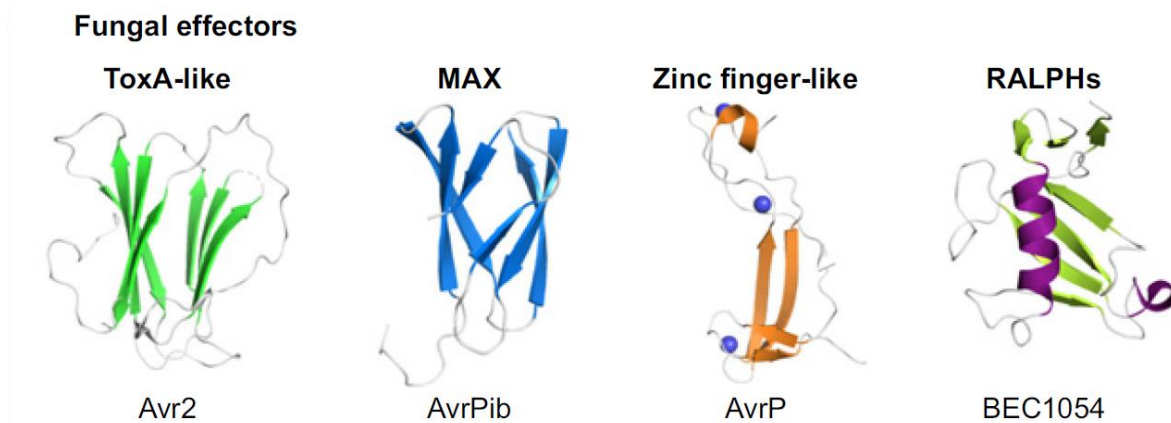
Efektorové proteiny oomycet obsahují konzervovaný motiv složený ze dvou aminokyselinových řetězců RXLR-(D)EER, kde X reprezentuje jakoukoliv aminokyselinu (Panstruga a Dodds, 2009). RXLR doména je nezbytná pro transport efektoru do buňky (Dodds a Rathjen, 2010). Před RXLR doménou na N-konci se nachází signální peptid, který je důležitý pro nasměrování efektorového proteinu k endoplazmatickému retikulu hostitele (Catanzariti *et al.*, 2007). Kromě ATR13 všechny dnes známé efekty oomycet vytvářejí tři- α -helixovou strukturu, která se nazývá WY doména. WY doména se

může vyskytovat soliterně, nebo ve formě dimeru či jako tandemová repetice (Mukhi *et al.*, 2020). U SFI3 efektoru patogenu *Phytophthora infestans* bylo prokázáno, že WY doména se vyskytuje v *trans* uspořádání, a toto uspořádání se jeví jako důležité pro interakci s hostitelem, pro buněčnou lokalizaci a v neposlední řadě pro virulenci (He *et al.*, 2019). Celkem bylo u *Phytophthora infestans* genomovým sekvenováním odhaleno 563 RXLR kandidátních efektorových genů (Haas *et al.*, 2009).

3.1.2.1.3 Efektory hub

Houbové efektory mohou být hrubě rozděleny na extracelulární efektory a cytoplazmatické efektory. Extracelulární efektory jsou vylučovány do apoplastu nebo xylému hostitele, zatímco cytoplazmatické efektory jsou směřovány do hostitelské buňky. Zvláštní případ pozorujeme u plísně rýže (*Magnaporthe oryzae*), která nevyklučuje přímo efektorové proteiny, nýbrž doposud neznámé sekundární metabolity (Stergiopoulos a de Wit, 2009).

Na rozdíl od efektorových proteinů oomycet nesdílí efektory patogenních hub (Obr. 2) žádné společné strukturní motivy, kromě sekrečních signálních peptidů na N-konci (Mukhi *et al.*, 2020). *Magnaporthe oryzae* kóduje skupinu sekvenčně různorodých malých sekrečních proteinů, které jsou exprimovány zejména během biotrofní fáze infekce. Tyto proteiny jsou tvořeny β -sendvičovou strukturou, která je strukturně podobná s ToxB efektozem *Pyrenophora tritici-repentis*, a proto byly efektory *Magnaporthe oryzae* pojmenovány MAX efektory (*Magnaporthe* AVRů a ToxB-like) (de Guillen *et al.*, 2015). Zcela jinou strukturu bychom našli u efektoru rzi Inové AvrP, jehož třídídimenzionální struktura odhalila motivy tvořené zinkovými prsty, které hrají zásadní roli ve virulenci patogenu (Zhang *et al.*, 2017). Efektory *Blumeria graminis* mají strukturní podobnost s ribonukleázami, proto se také někdy označují jako RNase-like proteiny exprimované haustorii (RALPH). RALPH obsahují disulfidickou vazbu stejně jako ribonukleázy (Pennington *et al.*, 2019). Poslední známou strukturou je struktura zvaná ToxA-like u *Fusarium oxysporum* (Mukhi *et al.*, 2020).



Obrázek 2: Známé strukturní motivy houbových efektorů.

Zobrazeny jsou strukturní motivy ToxA-like (Avr2), strukturní motiv MAX (AvrPib), motiv zinkových prstů (AvrP) a RALPH (BEC1054). Převzato z práce Mukhi *et al.* (2020).

3.1.2.2 Hostitelské geny rezistence

Efaktorové proteiny, které umožňují patogenům překonat PTI jsou v hostiteli rozpoznávány specifickými geny rezistence. Většina genů rezistence kóduje proteinové receptory rodiny NLR, které jsou schopny rozpoznat strukturu nebo účinky patogenních efektorů v hostiteli (Jones a Dangl, 2006). Rostlinné NLR jsou často polymorfní mezi jednotlivými rostlinami v hostitelské populaci. Množství genů kódujících NLR v takové populaci definuje repertoár detekovaných polymorfních efektorů. NLR rodiny receptorů jsou řazeny do STAND (signál-přenášející ATPázy s mnoha doménami) P-loop ATPáz z rodiny AAA+, jejichž funkce jsou velice komplexní. NLR obsahují velmi variabilní N-koncovou doménu, centrální nukleotidy-vázající doménu (NBD), po níž typicky následuje C-koncová LRR doména, proto se tyto proteiny označují také jako NB-LRR (Maekawa *et al.*, 2011). NBD jsou asociovány s připojenými α -helikázovými doménami, která je také známa jako apoptotická ATPázová (Ap-ATPase) doména (Jones a Dangl, 2016). Jako signální centra fungují coiled-coil (CC) nebo Toll-interleukinové 1 (IL-1) receptorové domény (TIR). Počet NLR kódovaných genomem vyšších rostlin se pohybuje mezi přibližně 150 (*Arabidopsis*) a 460 (rýže) (Maekawa *et al.*, 2011).

Během absence patogenu jsou NB-LRR udržovány ve stavu, kdy jsou schopny detekovat signál, ale nacházejí se v tzv. auto-inhibovaném stavu. Tento stav pomáhají udržovat LRR domény a chaperony HSP90 spolu se svými ko-chaperony, nebo mohou být NB-LRR regulovány cílenou degradací proteinů. Jakmile je přijat LRR doménou signál o přítomnosti specifického efektorového proteinu uvnitř hostitele, dojde ke změně konformace NB-LRR proteinu z uzavřené na otevřenou a k aktivaci NB-LRR proteinu (Takken a Goverse, 2012).

NB-LRR proteiny mohou rozpoznávat patogenní efektoři přímo fyzickou asociací, nebo nepřímo skrze pomocný protein, který je součástí NB-LRR proteinového komplexu. Po aktivaci NLR dochází k masivní tvorbě ROS, nárůstu cytosolického Ca^{2+} a ke změně transkripce. Tyto změny vedou k rychlé smrti hostitelské buňky v místě napadení patogenem (Maekawa *et al.*, 2011). Lokalizovaná buněčná

smrt se také označuje jako hypersenzitivní odpověď (HR) (Bonas, 1998). Kromě tohoto mechanismu používají rostliny k řízení imunitní odpovědi také fytohormony a sekreci specifických proteinů (Maekawa *et al.*, 2011).

3.2 Interakce mezi *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* a *Hordeum vulgare*

Padlí travní je významným onemocněním, které postihuje přes 650 jednoděložných a více než 9 000 dvouděložných rostlin. Za touto nemocí stojí houba *Blumeria graminis* (Saur *et al.*, 2019a). Napadení touto houbou jen zřídka způsobuje úmrtí rostliny, nicméně tato nemoc způsobuje významnou ztrátu kvality a produktivity v rozsahu 20–40 % (Boddy, 2016). Padlí travní postihuje i hospodářsky významnou obilovinu ječmen.

3.2.1 *Hordeum vulgare*

Hordeum vulgare ssp. *vulgare* je domestikovanou formou divoké formy ječmene *H. vulgare* ssp. *spontaneum*, která již před 10 000 lety sloužila jako jeden z hlavních zdrojů obživy pro tehdejší populaci. Domestikace ječmene je datována právě do doby před 10 000 lety (Sato, 2020). V celosvětovém měřítku je ječmen čtvrtou nejhojněji pěstovanou obilovinou hned po kukuřici (*Zea mays*), pšenici (*Triticum aestivum*) a rýži (*Oryza sativa*) (FAOSTAT, 2022).

Ječmen je jednoděložná samosprašná rostlina s diploidním genomem, který je tvořen sedmi chromozomy ($2n=2x=14$). Společně s dalšími obilovinami jako je pšenice, rýže a jejich divocí příbuzní spadá do přibližně 12 milionů let starého rodu tritikálií z čeledi lipnicovitých (*Poaceae*) (Sato, 2020). Velikost genomu ječmene činí 5,1 Gbp (The International Barley Genome Sequencing Consortium, 2012) s více než 80% zastoupením repetitivních elementů (Sato, 2020). Předpokládaný počet genů ječmene je nejméně 30 400 genů (The International Barley Genome Sequencing Consortium, 2012).

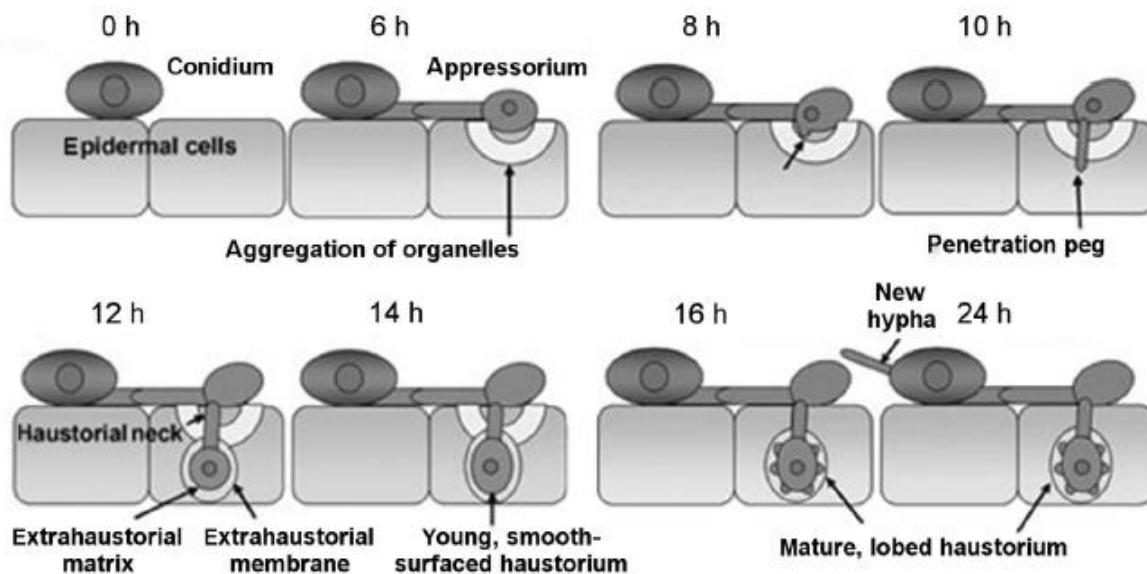
3.2.2 *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* (*Bgh*)

Houby způsobující padlí travní jsou řazeny do kmene vřeckovýtrusých hub (*Ascomycota*) a do řádu Erysiphales. U ječmene je příčinou padlí *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* (*Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*), obligátní biotrof, který výhradně napadá epidermální listovou tkáň hostitelů z čeledi lipnicovitých (*Poaceae*) (Schiffer *et al.*, 1997). Velikost genomu *Bgh* byla osekvenováním haploidního genomu izolátu DH14 stanovena na přibližně 120 Mbp (Spanu *et al.*, 2010). *Bgh* je častým předmětem výzkumu, a proto jsou jeho vývojová stádia a životní cyklus velmi dobře prostudovány.

3.2.2.1 Životní cyklus *Bgh*

Buňky a spory hub řádu Erysiphales jsou tvořeny buněčnou stěnou a vedle jiných organel obsahují také jádro, vakuoly a Woroninova tělíska. Pro *Bgh* je charakteristické rozmnožování pomocí konidií

s primárním klíčným vláknem a typickým appressoriem (Glawe, 2008). Pomocí konidií se *Bgh* rozmnožuje nepohlavně. Konidie jsou vejcovité hyalinní spory o velikosti 10–15 μm na 30–40 μm , které jsou uvolňovány z apikální strany zrajících konidioforů (Zhang *et al.*, 2005). Infekce začíná, jakmile konidium přistane na citlivém hostiteli. Ihned poté dochází k tvorbě klíčného vlákna, které se prodlužuje a vytváří hyfy s appressorii a penetračními háčky, a následně se mění v haustorium. Appressoria jsou krátké postranní výběžky hyf, z nichž dochází k tvorbě penetračních háčků, ty slouží k proniknutí přes hostitelskou buněčnou stěnu pomocí změn turgorového tlaku a enzymatickou aktivitou. Haustorium vzniká prodloužením penetračního háčku po jeho vniknutí do buňky hostitele a je významnou strukturou pro parazitický způsob obživy houby, jelikož umožňuje přísun živin z hostitele do houby. K dozrávání spor a vzniku infekce dochází velmi rychle. Již během 60 sekund od střetu s hostitelským povrchem uvolňují konidie *Bgh* tekutý extracelulární materiál s kutinázami a esterázami k upevnění patogenu k hostiteli. Po 30–60 minutách dochází k tvorbě primárního klíčného vlákna, které produkuje tzv. kutikulární háček. Kutikulární háček houbě slouží k proniknutí přes kutikulární vrstvu, ale ne přes buněčnou stěnu hostitele a společně s extracelulárním materiálem zvyšuje přilnutí patogenu k hostiteli. Při interakci s ječmenem akumuluje *Bgh* redoxně aktivní 3-hydroxykynurenin, jehož funkce zatím není zcela objasněna, avšak předpokládá se, že by mohla zajišťovat provázání houby s hostitelským povrchem. *Bgh* dále vylučuje katalázy, které zabezpečují ochranu před ROS, které produkuje hostitel (Hückelhoven, 2005). K tvorbě appressoria dochází během cca 10 hodin po infekci a za další asi dvě hodiny dochází k tvorbě penetračního háčku, který proniká přes buněčnou stěnu. Během této doby se jako odpověď na napadení houbou vytváří kopulovitě ložisko zvané papilla s materiálem tvořícím buněčnou stěnu (Glawe, 2008). Tvorba papilly je součástí PTI obranného mechanismu rostliny (Jørgensen a Wolfe, 1994). Jestliže je patogen úspěšný v překonání PTI, dochází k prodloužení penetračního háčku do buňky hostitele invaginací do cytoplazmy, kde následně dochází k jeho zvětšování a vzniku haustoria. Haustorium je obklopeno extracelulární matrix a necytoplazmatickým gelovým materiálem, který napomáhá k ochraně patogenu před obrannými mechanismy hostitele. Hyfy, které houba produkuje, se opakovaně mnohonásobně větví a formují kruhové kolonie. Produkce konidií nastává během několika dní po napadení hostitele. Konidiofory jsou tvořeny na povrchu hostitele z vegetativních hyf. První kompletní buňka konidioforu se nazývá bazální buňka, kterou postupně překrývají další buňky, ze kterých postupně dozrávají konidie (Glawe, 2008).



Obrázek 3: Životní cyklus *Blumeria graminis*.

Po dopadu konidie na rostlinnou tkáň dochází ke kličení konidie a tvorbě appressoria (fáze 0–6 h), ze kterého vyrůstá penetrační háček, který proniká do epidermální buňky (fáze 8–10 h). Následně se začíná tvořit nabobtnalý, na povrchu hladký, protáhlý váček na špičce penetračního háčku, haustorium (fáze 12–14 h). Jádro se přesouvá z appressoria do haustoria a mezi appressoriem a haustoriem se následně vytváří přepážka. Po 24 hodinách (fáze 16–24 h) je již plně vytvořeno haustorium s matrix a vnější extrahaustoriální membránou (16–24 h). Převzato z práce Boddy (2006).

Kromě nepohlavního rozmnožování využívá *Bgh* i rozmnožování pohlavního pomocí askospor, které jsou uvolňovány z plodnic zvaných kleistothécia. Kleistothécia jsou vytvářena na stárnoucím listu hostitele a mohou přežít v dormantním stádiu i nepříznivé environmentální podmínky, kterými mohou být zimní období nebo období extrémního sucha a vysokých teplot, která hostitel překonává ve formě semen (Zhang *et al.*, 2005). Pohlavní rozmnožování *Bgh* začíná tvorbou gametangií. Samčí gametangia nesou název antheridia a samičí askogonia. Mezi samčí a samičí gametangiální buňkou dochází k plasmogamii, tedy ke splynutí buněk. Buněčné jádro antheridia se přesune do askogonia a dojde k procesu zvanému dikaryotizace, jehož výsledkem je buňka se dvěma jádry. Po dikaryotizaci jsou dikaryontní buňky obalovány jednojadernými buňkami, které jsou základem askogonia a dochází tak k tvorbě plodnice. Z dvoujaderných buněk se vytvářejí vřeska, ve kterých dochází ke karyogamii, meióze a následné tvorbě haploidních askospor. Askospory se z kleistothécia oddělují vertikálně poté, co začne působit turgorový tlak, který vzniká důsledkem přijímání vody kleistothécií (Glawe, 2008).

3.2.3 Hypotéza gen-proti-genu

U ječmene existují kromě jiných i obranné mechanismy účinné pouze proti specifickým izolátům *Bgh*. Specifická rezistence závisí na páru genů, které spolu interagují. Je nezbytné, aby došlo k interakci genu rezistence hostitele a korespondujícího genu avirulence patogenu. Reakce mezi genem *R* a genem *AVR*,

kteřá vede k obraně rostliny před patogenem je označována jako hypotéza gen proti genu, která byla poprvé popsána Haroldem H. Florem v roce 1946 (Keen, 1990).

3.2.3.1 Geny rezistence v ječmeni

Studium interakcí mezi ječmenem a *Bgh* odhalily přítomnost více než 85 dominantních nebo semidominantních lokusů *R* genů proti *Bgh* (*Ml* – *Mildew locus*) (Jørgensen a Wolfe, 1994). Nejpočetnější třídou lokusů genů rezistence proti padlí travnímu v ječmeni je lokus *Mla* (*Mildew locus a*). Tento lokus kóduje více než 30 různých specifických genů rezistence (*Mla1–Mla32*) produkujících NB-LRR proteiny (NLR). Většina z těchto genů byla přenesena na kultivovaný ječmen z divokého příbuzného ječmene *Hordeum spontaneum* v průběhu šlechtění (Schulze-Lefert a Vogel, 2000). Kromě *Mla* jsou v ječmenném genomu přítomny i jiné varianty *Ml* klastrů genů rezistence a tyto varianty jsou členěny do 11 skupin: *Mlat*, *Mla*, *Mlk*, *Mlnn*, *Mlra*, *MIGa* a *Mlp* na chromozomu 5 (Jørgensen a Wolfe, 1994), *Mlh* na chromozomu 6 (Jørgensen a Wolfe, 1994), *Mlg* a *Mlo* na chromozomu 4 (Görg *et al.*, 1993; Büschges *et al.* 1997), *MILa* na chromozomu 2 (Giese *et al.*, 1993) a *Mlh* na chromozomu 6 (Jørgensen a Wolfe, 1994). *Mla* klastr je lokalizován na krátkém rameni chromozomu 5 blízko telomerického konce. Vzhledem ke své vysoce variabilní povaze je *Mla* klastr skvělým modelem pro zkoumání specifických rozpoznávacích mechanismů v rámci gen-proti-genu interakce mezi ječmenem a obligátní patogenní houbou (Wei *et al.*, 1999). Řada z testovaných *Mla* potřebuje ke své funkci pomocné geny *Rar1* a *Rar2* (*required for mla resistance*), existují však studie, že *Mla1* a *Mla7* fungují nezávisle na těchto genech (Schulze-Lefert a Vogel, 2000). Bylo prokázáno, že k expresi *Ml* genů dochází v odlišných fázích infekce. Například *Mla1* a *Mla12* mohou rozpoznávat patogenní AVR proteiny během tvorby haustoria. Naproti tomu *Mlg* se účastní obranných mechanismů již při tvorbě appressoria a penetračních háčeků (Görg *et al.*, 1993).

Zvláštním lokusem je lokus *Mlo*, který je spojen s *Mlo* rezistencí. Původně byla tato rezistence popsána u mutanta na padlí rezistentního ječmene v roce 1942 a následně byla v 70. letech 20. století identifikována na ječmenných kultivarech pocházejících z Etiopie. Rezistence *Mlo* nefunguje na bázi hypotézy gen-proti-genu, je monogenní, účinná proti všem izolátům *Bgh* a zabezpečuje trvalou ochranu hostitele (Jørgensen, 1992). *Mlo* protein má velikost přibližně 60 kDa a je kotven v plazmatické membráně sedmi transmembránovými helixy s N-koncem orientovaným extracelulárně a C-koncem intracelulárně (Devoto *et al.*, 1999). Na *mlo*-vyvolané rezistenci se podílejí podobně jako u *mla* rezistence další dva geny, *Ror1* a *Ror2* (*required for mlo resistance*) (Freialdenhoven *et al.*, 1996). Tyto geny jsou důležité pro produkci ROS při napadení patogenem. Pozičním klonováním bylo odhaleno, že *Ror2* kóduje solubilní na N-ethylamid-senzitivní proteinový receptor (SNARE). *Ror2* je umístěn na plazmatické membráně, kde funguje jako cílový membránový SNARE (t-SNARE) při fúzi vezikul. Gen *Ror1* je lokalizován v pericentromerickém prostoru dlouhého ramene ječmenného chromozomu 1H

a kóduje třídu XI ječmenného myosinu Myo11A, k jehož akumulaci dochází během infekce (Acevedo-Garcia *et al.*, 2022).

3.2.3.2 Geny avirulence *B. graminis* f. sp. *hordei*

Bgh vylučuje během kolonizace hostitele širokou škálu efektorových proteinů, z nichž jen malá část je rozpoznávána proteiny rezistence a můžeme o nich tedy hovořit jako o proteinech avirulence (Rouxel a Balesdent, 2010). Doposud bylo u *Bgh* odhaleno 491 kandidátních efektorových proteinů (CSEPs), z nichž byla u 248 z nich predikována přítomnost signálního proteinu, která je pro AVR proteiny typická. Jsou známy dva hlavní typy efektorových proteinů, které *Bgh* vylučuje. První skupinu tvoří kratší proteiny o délce 100–150 aminokyselin, které jsou hojně exprimovány haustorii. Druhou skupinu představují proteiny s délkou 300–400 aminokyselin a s nižšími hladinami exprese. Přibližně 97 % CSEPs je produkována houbovými haustorii, nebo epifytickou tkání, tedy částí houby, která je na povrchu hostitele. Bylo potvrzeno, že celá řada CSEPs má strukturní podobnost se dvěma dobře popsányými ribonukleázami, kterými jsou T1 nacházející se u *Aspergillus oryzae* a U2 vyskytující se u *Ustilago sphaerogena*. Navzdory podobnosti s ribonukleázami se však u CSEPs ribonukleázová aktivita nevyskytuje z důvodu absence aktivního místa (Pedersen *et al.*, 2012).

Jestliže dojde k úspěšnému rozpoznání AVR proteinu proteinem R, dojde k hypersenzitivní reakci (HR). HR je charakteristická smrtí hostitelských buněk v místě napadení a je doprovázena vlnami akumulace peroxidu vodíku. První vlna nastává ještě před samotnou hypersenzitivní reakcí, kdy se ROS akumulují subcelulárně přímo pod houbovým appressoirem, aby následně během druhé vlny zaplnily infikovaný epidermální prostor (Schulze-Lefert a Vogel, 2000).

3.3 Způsoby validace patogenních genů avirulence

V rámci bioinženýrských přístupů jsou celosvětově významné plodiny, mezi nimi i ječmen, upravovány introgresí molekulárně izolovaných genů rezistence. Takto upravené plodiny jsou odolnější vůči patogenům a minimalizují se tak ztráty. Stejně tak studium a identifikace AVR genů přináší důležité poznatky pro bioinženýrství. Identifikace a validace AVR genů je náročnou disciplínou, která využívá řadu různých metod (Saur *et al.*, 2019b).

3.3.1 Dvouhybridní kvasinkový systém

Dvouhybridní kvasinkový systém je metoda ke studiu protein-proteinových interakcí, která byla poprvé popsána v práci Fieldse a Songa (1989), kteří k tomuto účelu použili kvasinku *Saccharomyces cerevisiae*. Kvasinka nese transkripční aktivátor GAL4, který je nezbytný pro zahájení exprese enzymů metabolismu galaktózy. GAL4 je protein o velikosti 881 aminokyselin a sestává se dvou oddělitelných domén, kterými jsou N-koncová doména vážící se ke specifické DNA sekvenci (DBD) a C-koncová aktivační doména (AD), která je nezbytná k aktivaci transkripce. Jestliže je jedna z těchto domén

nefunkční, nebo chybí úplně, nedochází k zahájení transkripce, tohoto faktu využívá dvouhybridní kvasinkový systém. Principem metody je fúze DBD a AD domén s proteiny X a Y. DBD svázaná s X se nazývá „návnada“ (bait) a AD ve vazbě s Y je označována jako „kořist“ (prey). Jestliže dojde k interakci mezi proteiny X a Y, dostanou se tyto proteiny, a tedy i obě domény do těsné blízkosti a transkripce je zahájena. Funkční promotor umožňuje růst kvasinek na specifickém médiu, nebo změnu zbarvení kolonie (Fields a Song, 1984).

Hlavní výhodou dvouhybridního kvasinkového systému je možnost studia protein-proteinových interakcí v živých kvasinkových buňkách, dalšími výhodami jsou jednoduchost metody a možnost použití pro studium široké škály proteinových interakcí. Nevýhodami jsou zejména falešně negativní či falešně pozitivní výsledky. Falešně negativní výsledky jsou zaznamenávány zejména u proteinových interakcí zahrnujících membránové proteiny, takové interakce bývají zpravidla pomocí tohoto systému nedetekovatelné (Brückner *et al.*, 2009).

Pomocí dvouhybridního kvasinkového systému je možné studovat schopnost konkrétního proteinu rezistence ječmene interagovat s efektorovým proteinem z *Bgh*. Nevýhodou této metody je, že při experimentu nejsou v kvasince přítomny žádné jiné rostlinné proteiny, které mnohdy mohou hrát klíčovou roli v rozpoznání efektorového proteinu (Bauer *et al.*, 2021). Pomocí dvouhybridního kvasinkového systému byla potvrzena interakce mezi genem avirulence *Bgh* a genem rezistence ječmene například pro geny *Mla22* a *AVRa22* v práci Bauer *et al.* (2021) a dále pro *Mla13* a *AVRa13*, nebo *Mla7* a *AVRa7* v práci Saur *et al.* (2019a).

3.3.2 Agrobacterium-zprostředkovaná transientní exprese genů v *Nicotiana benthamiana*

Agrobacterium tumefaciens je půdní gram-negativní bakterie, která způsobuje nádorová onemocnění jabloní a vinné révy. Bakterie se běžně vyskytuje na kořenech rostlin a obvykle získává živiny z hostitele. Jakmile dojde ke zranění nebo poškození rostliny, dochází k jejímu napadení bakterií a objevují se první symptomy onemocnění. Tvorba nádoru závisí na přítomnosti přibližně 200kb Ti plazmidu, jehož transferová DNA (T-DNA) o velikosti přibližně 20 kb je přenášena z bakterie do jádra hostitelské buňky, kde je začleňována do jaderného genomu. T-DNA kóduje geny potřebné pro biosyntézu proteinů zapojených v tvorbě hormonů auxinu a cytokininu. T-DNA dále kóduje onkogeny zodpovědné za buněčnou proliferaci a tvorbu nádorů a také geny pro opiny a agropiny. T-DNA se integruje do genomu ohraničená krátkými 24bp repeticemi. Repetice vytvářejí hranice T-DNA a jsou rozpoznávány enzymovým komplexem VirD2. Enzymový komplex VirD2 je exprimován z *vir* genů a vytváří jednovláknové zlomy v DNA Ti plazmidu. Tímto způsobem je uvolňováno jedno vlákno T-DNA, které dále vstupuje jaderným pórem do jádra, kde je přepsáno do dvouvláknové podoby. Integrace do hostitelského genomu probíhá procesem nehomologní rekombinace (NHEJ) (Bradshaw, 2016).

Metody zahrnující transformaci pomocí *Agrobacteria* byly poprvé publikovány v roce 1984 v pracích De Blocka *et al.* (1984) a Horsche *et al.* (1984). U této metody je využíváno schopnosti T-DNA inkorporovat se do rostlinného genomu. Z důvodu velké velikosti Ti plazmidu a nepřítomnosti jedinečných restričních enzymů, které by štěpily pouze T-DNA nelze klonovat gen zájmu přímo do T-DNA oblasti, proto byla vyvinuta řada jiných přístupů. Nejčastěji využívaným přístupem je klonování genu zájmu do T-DNA regionu, který je však umístěn na jiném replikonu než *vir* geny, jsou tak vytvářeny T-DNA binární vektory (Gelvin, 2003).

Tranzientní *Agrobacterium*-zprostředkované nadexprese NLR-AVR páru v *Nicotiana benthamiana* nebo *Nicotiana tabacum* je velmi často využíváno k validaci AVR či NLR genů, jelikož již několik dní od transformace rostliny NLR a AVR konstrukty umožňuje přímou vizualizaci buněčné smrti na listech (Saur *et al.*, 2019b). Validace AVR genů *Bgh* pomocí této metody se objevuje například v práci Saur *et al.* (2019a), nebo Lu *et al.* (2016). Dále byla tato metoda využita například ke studiu NLR genů u ječmene v práci Bai *et al.* (2012) a také v práci Cesari *et al.* (2016) ke studiu NLR genů pšenice zapojujících se v rezistenci na rez (*Puccinia graminis* f. sp. *tritici*).

Agrobacterium tumefaciens je velmi užitečný vektor k dopravení cizorodých genů do dvouděložných a jednoděložných rostlin. Mezi hlavní výhody tohoto systému se řadí zejména vysoká efektivita transformace a nízké náklady na provedení (Nadolska-Orczyk *et al.*, 2000).

3.3.3 Virem indukovaná nadexprese genů (VOX)

Metody tranzientní transformace rostlin využívající viry jako vektory nabízí velkou řadu výhod a jsou čím dál častěji využívány jako alternativy nevirových systémů zejména za účelem produkce rekombinantních proteinů v rostlinách. Hlavní výhodou virových systémů je, že DNA sekvence vložená do virového vektoru se v rostlině replikuje a systematicky šíří, to má za následek vysoké hladiny transgenního produktu (Jones *et al.*, 2009).

Řada virových vektorů byla odvozena z rostlinných virů. Existuje široká škála rostlinných virů, většina z nich však sdílí pozoruhodnou vlastnost, která je odlišuje od řady živočišných virů a tou je jejich kompaktnost a malá velikost. Většina genomů rostlinných virů má délku mezi 3–7 kb. Největší genom má virus *Closterovirus*, jehož délka dosahuje přibližně 20 kb. Důvodem malé velikosti virových genomů jsou překrývající se čtecí rámce a multifunkčnost proteinů, které často ovlivňují životní cyklus viru více než jedním způsobem. Virové vektory jsou vytvářeny z infekčních klonů rostlinných virů tak, že celková délka genetické informace viru je zaklonována do plazmidu s eukaryotickým promotorem. Přítomnost eukaryotického promotoru umožňuje transformaci rostlin těmito vektory bez nutnosti vytváření in vitro RNA transkriptů, což je náročný a drahý proces (Canto, 2016). Nejčastěji jsou virové vektory založeny na virech s (+)-sense RNA jako například *Tobacco Mosaic Virus* (Marillonnet *et al.*, 2004), *Potato*

Virus X (Chapman *et al.*, 1992), *Barley Stripe Mosaic Virus* (Haupt *et al.*, 2001) a v neposlední řadě také *Foxtail Mosaic Virus* (Bouton *et al.*, 2018).

3.3.3.1 *Potato virus X*

Potato virus X (PVX) je členem druhu Potexvirů z rodiny *Alphaflexiviridae* a je jedním z nejdéle známých virů brambor. Poprvé byl PVX zmíněn v práci Loughnane a Murphyho v roce 1938 a jako virový vektor byl poprvé použit v práci Chapman *et al.* (1992). Primárními hostiteli PVX jsou brambory (*Solanum tuberosum*) a další lilkovité rostliny, dále PVX infikuje širokou škálu dvouděložných rostlin, mezi nimi i např. *Nicotiana tabacum*. PVX na svých hostitelích způsobuje mírné mozaikovitě onemocnění. Nejčastěji se šíří pylem, semeny, kontaminovaným zemědělským vybavením, nebo kontaktem listů či kořenů infikované rostliny s jinou rostlinou (Verchot, 2021).

Genom PVX sestává z jedné jednovláknové molekuly (+)-sense RNA, která má délku přibližně 6 400 bp. RNA je opatřena metylguanositovou čepičkou na 5' konci a poly(A) řetězcem na 3' konci. Genom tvoří pět čtecích rámců kódujících RNA-dependentní RNA polymerázu (RdRp), tři proteiny potřebné pro pohyb viru z buňky do buňky známé jako triple gene block (TGB) a obalový protein (CP), který je kódován jedním jediným genem. TGB proteiny jsou stejně jako CP nezbytné pro pohyb PVX. TGB1 je kódován prvním čtecím rámcem a funguje jako helikáza, supresor RNA umlčovacího komplexu a v neposlední řadě i jako translační aktivátor (Tilsner *et al.*, 2013). Viriony jsou poměrně krátké (470–580 nm) s vláknitou strukturou. Při vstupu do buňky se PVX viriony rozbalují pomocí fosforylace N-koncové části CP, která je vystavena buněčným enzymům. Uvolněná RNA je translatována a exprimuje se RdRp, která umožňuje replikaci a syntézu subgenomické RNA. Replikace probíhá v útvech zvaných X-tělíska, která jsou patrná v blízkosti jádra. RdRp je hlavním proteinem exprimovaným z genomické RNA viru, ostatní proteiny jsou exprimovány ze subgenomických (sg)RNA, které se nacházejí blíže ke 3' konci. RdRp je protein o velikosti 166 kDa a je tvořen konzervovaným metyltransferázovým motivem nezbytným pro přidání metylguanositové čepičky, dále obsahuje centrální helikázu a RNA polymerázový katalytický motiv na C-konci. Nepřekládané oblasti (UTR) na 5' a 3' konci virového genomu obsahují *cis*-regulační elementy, které kontrolují genovou expresi a replikaci (Verchot, 2021).

Virový vektor PVX umožňuje stabilní expresi inzertů menších než 700 bp, větší inzerty bývají z vektoru ztraceny (Avesani *et al.*, 2007). PVX je důležitým modelem pro studium a charakterizaci procesu na homologii závislého posttranskripčního genového umlčování (PTGS), které cílí na virovou RNA a degraduje ji. PTGS rozpoznává vysoce strukturované virové genomy nebo meziproducty replikace, ty mohou být rozloženy rostlinným aparátem dsRNA-specifickým Dicerem k produkci siRNA molekul. Tyto studie zahrnují využití expresního vektoru PVX, který nese cizorodé cDNA, které jsou využívány pro monitorování produkce siRNA a degradaci mRNA (Verchot, 2021).

3.3.3.2 *Tobacco Mosaic Virus*

Onemocnění tabáková mozaika způsobované tímto virem bylo poprvé charakterizováno Mayerem v roce 1886 a samotný virus byl předmětem intenzivního studia od 30. let 20. století. *Tobacco Mosaic Virus (TMV)* infikuje své hostitele skrze drobná poranění, tedy mechanicky. Přenos *TMV* přenašeči, semeny či pylem není znám (Palukaitlis a Zaitlin, 1986).

Viriony *TMV* mají tyčinkovitý tvar a jejich genetická informace je uložena ve formě jednovláknové (+)-sense RNA (Pogue *et al.*, 1998), která má délku 6 395 nukleotidů (Goelet *et al.*, 1982) a kóduje čtyři známé funkční proteiny, kterými jsou 126 a 183 kDa velké s replikací asociované proteiny, pohybové proteiny a proteiny formující strukturu kapsidy nebo obalový protein. Aby došlo k úspěšné infekci hostitele spolupracují tyto multifunkční proteiny s řadou dalších komponent hostitele. Hostitelská membrána a cytoskelet hostitelské buňky jsou důležité pro infekci *TMV*. *TMV* se během tří minut od vniknutí do hostitele zbavuje obalového proteinu z kapsidy a nastává translace virové RNA (vRNA), která formuje malá granula v cytoplazmě. Granula následně splývají s endoplazmatickým retikulem, které transportuje vRNA do perinukleárního prostoru, kde je utvářeno místo replikace *TMV*, virový replikační komplex (VRK). VRK obsahuje vRNA, pohybové proteiny, replikační proteiny a hostitelské proteiny (Liu a Nelson, 2013).

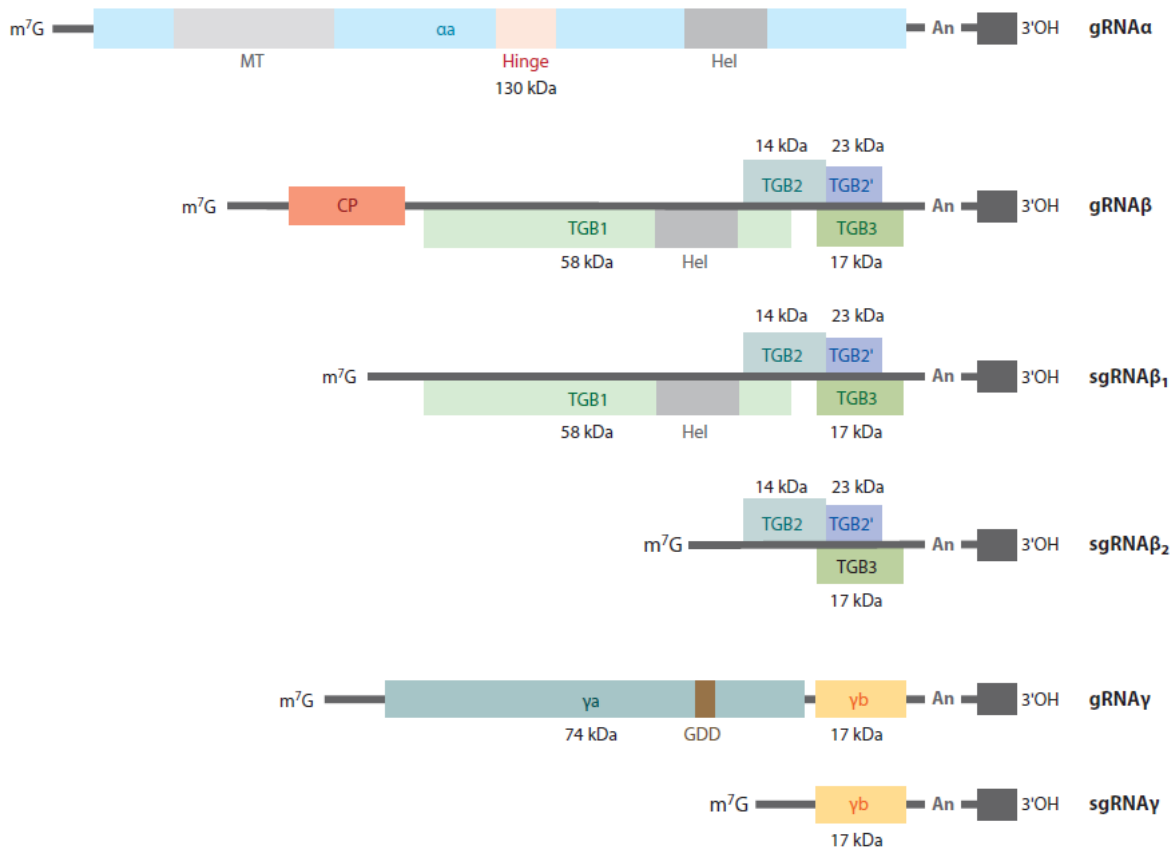
Virový vektor *TMV* je využíván pro nadexpresi genů ve formě mutanta, který nese geny pro obalový protein. Delece těchto genů zabraňuje systematickému šíření napříč rostlinou, zatímco pohyb z buňky do buňky je stále umožněn díky pohybovým proteinům. Hlavní výhodou použití *TMV* vektoru je produkce velkého množství proteinů z tohoto vektoru v hostitelských rostlinách, jako je např. *Nicotiana benthamiana*. *TMV* vektor je účinným nástrojem pro efektivní expresi rekombinantních proteinů jak za účelem výzkumu, tak za účelem produkce (Lindbo, 2007).

3.3.3.3 *Barley Stripe Mosaic Virus*

BSMV je virus z rodiny RNA virů Hordeiviry. Hordeiviry zahrnují kromě *BSMV* také *Poa Semilatent virus (PSLV)*, *Lychnis Ringspot Virus (LRSV)* a někdy je do této skupiny řazen i *Anthoxanthum Latent Blanching Virus (ALBV)*. Hordeiviry vytvářejí krátké tyčinkovité viriony. Tyčinky jsou tvořeny proteinovými jednotkami, které obalují virovou jednovláknovou RNA. Ačkoliv mají zástupci Hordeivirů podobnou strukturu, vykazují výraznou biologickou diverzitu. Viry *BSMV*, *PSLV* a *ALBV* infikují zejména rostliny z čeledi lipnicovitých, zatímco *LRSV* je schopen infikovat širokou škálu dvouděložných rostlin (Jackson *et al.*, 1989). *BSMV* je schopen se šířit semeny infikovaných rostlin, takto pravděpodobně došlo i k jeho rozšíření napříč světem. Dále se *BSMV* šíří mechanicky z rostliny na rostlinu (Jackson *et al.*, 2009).

Genom *BSMV* sestává ze tří separátně enkapsidovaných jednovláknových (+)-sense RNA (Obr. 4) označovaných RNA α , RNA β a RNA γ v pořadí dle klesající molekulové hmotnosti. Délka RNA γ se liší

v závislosti na virovém izolátu, např. RNA γ u ND18 má délku 2 791 bp, zatímco u izolátu Type dosahuje její délka 3 164 bp (Gustafson *et al.*, 1987). Genomické RNA nesou na svém 5'konci 7-methylguanidinovou čepičku a na 3'konci tRNA podobnou strukturu, která bývá aminoacylována tyrosinem. Poly(A) sekvence různé délky se nachází u každé ze tří RNA mezi kódujícími regionem a tRNA podobnou strukturou (Gustafson a Armour, 1986).



Obrázek 4: Organizace genomu *Barley Stripe Mosaic Virus*.

Genomická RNA disponuje čepičkou (m⁷G) a obdélníky znázorňují ORF a 3' terminální t-RNA podobné struktury. RNA α kóduje α a protein s N-koncovou metyltransferázou (MT) a C-terminální helikázou (Hel), které jsou odděleny centrální pantovou doménou (Hinge). RNA β kóduje pět proteinů: obalový protein (CP, β a) je exprimován z gRNA β ; TGB1 (β b) je exprimován ze sgRNA β 1; zbývající proteiny TGB2 (β d), TGB3 (β c) a TGB2' (β d') jsou exprimovány ze sgRNA β 2. RNA γ kóduje protein γ a s GDD doménou, který tvoří polymerázovou podjednotku replikázy, a na cystein bohatý protein patogenity γ b, který je exprimován ze sgRNA γ . Převzato z práce Jackson *et al.* (2009).

Délka sekvence RNA α byla pro izolát Type stanovena na 3 768 bp. RNA α je tvořena jedním čtecím rámcem, který kóduje 1 139 aminokyselin dlouhý polypeptid α a. Otevřený čtecí rámec (ORF) je ohraničen na 5'konci 91 nukleotidů dlouhou terminální sekvencí a na 3' konci nepřekládaným regionem UTR, který sestává z krátké poly(A) sekvence, na niž navazuje 238nukleotidová tRNA podobná struktura (Gustafson *et al.*, 1989). Protein α a je esenciální podjednotkou RdRp a je součástí velké skupiny proteinů RdRp Tobamo-linie III. Protein α a má hmotnost přibližně 130 kDa a tvoří jej

N-koncová metyltransferázová a C-koncová helikázová doména. Methyltransferázová doména se uplatňuje při přidávání 7-methylguanositové čepičky na virové RNA, zatímco funkcí helikázové domény je rozvolnění struktury RNA během replikace a transkripce. Mezi těmito dvěma doménami se nachází 80bp pantová oblast, která umožňuje jejich vzájemnou interakci (Jackson *et al.*, 2009).

RNA β má délku 3 289 nukleotidů (Gustafson a Armour, 1986) a je tvořena čtyřmi ORF, z nichž tři se překrývají. ORF RNA β nesou označení 1-4 a kódují proteiny β a, β b, β c, respektive β d (Jackson *et al.*, 1989). Zásadní úlohou RNA β je tvorba obalového proteinu a proteinů TGB bloku nezbytných pro pohyb viru z buňky do buňky. Obalový protein nese označení β a a je exprimován přímo z gRNA β (ORF1). β a je přibližně 200aminokyselinový protein, který interaguje s gRNA viru a vytváří tyčinkovité struktury tvořené 24 proteinovými jednotkami na otáčku. CP není nezbytný pro infekčnost viru, naopak studie s mutanty deficientními na CP prokázaly, že takoví mutanti způsobují mnohem vážnější infekci než wild type *BSMV* (Jackson *et al.*, 2009). TGB proteiny jsou exprimovány ze subgenomických RNA (sgRNA), sgRNA β 1 a sgRNA β 2. Celkem TGB blok obsahuje tři TGB proteiny, TGB1 (β b), TGB2 (β d a β d') a TGB3 (β c). TGB1 protein je největší z TGB proteinů a je exprimován ze sgRNA β 1. TGB1 je tvořen N-koncovou doménou, vnitřní doménou (ID) a helikázovou doménou na C-konci. V rostlinné buňce je TGB1 asociován s endoplazmatickým retikulem a s plasmodezmaty (Lawrence a Jackson, 2001). TGB2 a TGB3 jsou membránové proteiny, které jsou společně exprimovány ze sgRNA β 2. TGB3 je translatován mechanismem leaky ribosome scanning ze start kodonu, který je společný pro TGB2 a TGB3 (Verchot-Lubicz *et al.*, 2010). TGB2 protein tvoří dva hydrofobní segmenty s centrální konzervovanou hydrofilní smyčkou (Solovjev *et al.*, 1996). Poměr exprimovaných hladin proteinů TGB1, 2 a 3 je za normálních okolností 100:10:1 a změny tohoto poměru vedou zpravidla k poruše pohybových vlastností viru (Verchot-Lubicz *et al.*, 2010).

Bicistronická RNA γ kóduje dva proteiny γ a, který je exprimován přímo z RNA γ , a γ b, ten je exprimován ze druhého ORF na sgRNA γ (Jackson *et al.*, 2009). Délka RNA γ se pohybuje mezi 2 971 a 3 164 bp v závislosti na virovém izolátu (Gustafson *et al.*, 1987). Protein γ a je nedílnou součástí RdRp díky svému GDD polymerázovému motivu na C-konci. Stejně jako tomu je u α a proteinu spadá GDD motiv do superskupiny polymeráz III Tobamo-linie. γ a protein je dalším proteinem nezbytným pro virovou replikaci (Jackson *et al.*, 2009). Protein γ b je na cystein bohatý a je exprimován ze 3' proximálního cistronu RNA γ . γ b významným způsobem ovlivňuje patogenezi a je nezbytný pro vznik systematických symptomů v hostiteli (Bragg *et al.*, 2004). γ b je taktéž nezbytný pro efektivní pohyb z buňky do buňky, protože během infekce hostitele interaguje s pohybovým proteinem TGB1 a umožňuje zesílení ATPázové aktivity (Jiang *et al.*, 2020).

Virový vektor *BSMV* je hojně využíván ve funkční genomice ječmene a pšenice. Uplatňuje se zejména v metodě zvané virem indukované umlčování genů rostlin (VIGS), při kterém je možné umlčet rostlinné geny a validovat tak jejich funkci, ale i v novějších metodách jako je VOX a hostitelem zprostředkované umlčování genů (HIGS). V současnosti jsou k těmto metodám využívány dva typy *BSMV* vektoru:

třípodjednotkový a čtyřpodjednotkový (Lee *et al.*, 2012). Vhodná délka inzertu pro třípodjednotkový vektor se pohybuje v rozmezí od 200 do 400 bp, větší inzerty bývají zpravidla nestabilní (Yuan *et al.*, 2011). Pro účely VOX byl třípodjednotkový *BSMV* upraven na čtyřpodjednotkový, který disponuje kapacitou až 2 100 nukleotidů (Cheuk a Houde, 2017).

3.3.3.4 *Foxtail Mosaic Virus*

Foxtail Mosaic Virus (FoMV) je stejně jako *Potato Virus X* řazen do Potexvirů a disponuje širokou škálou hostitelů. Je schopen infikovat 56 rostlinných druhů *Graminae* a řadu druhů napříč 11 rodinami dvouděložných rostlin. Genetická informace *FoMV* je uložena v (+)-sense jednovláknové mRNA délky 6 151 nukleotidů (Bancroft *et al.*, 1991), na jejímž 5' koci se nachází 7-metylguanosinová čepička a 3' konec nese poly(A) řetězec. Uspořádání genomu *FoMV* je velmi podobné jako u ostatních zástupců Potexvirů. Genom zahrnuje pět hlavních čtecích rámců ORF1–5 (Robertson *et al.*, 2000) a dva subgenomické promotory zajišťující přepis sgRNA1 a sgRNA2 (Liu a Kearney, 2010). Nejbliže 5'konci se nachází ORF1, ze kterého je exprimována RdRp. ORF2 exprimuje první protein ze tříčlenného pro pohyb viru nezbytného TGB bloku, který se váže na ATP, CTP a RNA a disponuje ATPázovou aktivitou. Protein exprimovaný z ORF2 má velikost 26 kDa. Zbylé dva proteiny TGB bloku velikosti 11,3 kDa a 5,8 kDa jsou exprimovány z ORF3, respektive ORF4. Obalový protein je exprimován z ORF5, který je umístěn na 3'konci. CP je nezbytný pro pohyb viru z buňky do buňky (Robertson *et al.*, 2000).

Virové vektory odvozené od *FoMV* jsou označovány jako FECT vektory. Tyto vektory vznikly delecí až 29 % původního genomu *FoMV*. Geny pro TGB a CP byly u FECT vektorů nahrazeny heterologní sekvencí, k jejíž expresi slouží promotor TGB1, který zůstal zachován stejně jako gen pro replikázu. FECT vektory nejsou schopny vytvářet viriony a k jejich transmisi musí být použita agroinokulace společně se supresorem RNA umlčovacího komplexu, kterým je p19, nebo HcPro, aby byla zajištěna silná exprese heterologního proteinu (Liu a Kearney, 2010). FECT vektory se využívají při funkční genomice kukuřice (Mei *et al.*, 2016), pšenice a dalších jednoděložných rostlin (Kanyuka, 2022). *FoMV* vektor je schopen stabilně exprimovat geny o délce 1,8 kb, tedy proteiny o délce až 600 aminokyselin (Kanyuka, 2022). Hlavní nevýhodou FECT je nutnost použití metody *Agrobacterium*-zprostředkované transformace k dopravení virového vektoru do rostliny (Liu a Kearney, 2010), nicméně tato překážka byla odstraněna vývojem na DNA-založeném *FoMV* vektoru, který obsahuje celou svou genomovou sekvenci a je tak schopen vyvolat systematickou infekci v celé rostlině. Tento vektor se využívá zejména při metodě VIGS u kukuřice (Mei *et al.*, 2016).

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Biologický materiál

Kandidátní geny *AVR_{as}*, *AVR_{kl}*, *AVR_{all}* a *AVR_{mu}* byly získány pomocí GWAS Mgr. Evou Janákovou, Ph.D. Sekvence genů byly syntetizovány firmou General Biosystems, Inc. (generalbiosystems.com). Pro množení plazmidů a jejich agroinfiltraci byly použity kmeny bakterií *Escherichia coli* DH5 α (Invitrogene), *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 a AGL1(addgene.org). Množení virových částic a ověření jejich funkce byly prováděny na rostlině *Nicotiana benthamiana* (Mgr. Aleš Pečinka, Ph. D., ÚEB Olomouc). Kultivary ječmenů (*H. vulgare*) Stirling, Lumar, Lyallpur, Mars, A-222 a Mulyan poskytl Doc. Ing. Antonín Dreiseitl, CSc. (Agrotest Fyto s.r.o., Kroměříž).

4.2 Použité chemikálie, kity a roztoky

Použité chemikálie:

- *Taq* DNA polymeráza 2 U. μ l⁻¹ (Thermo Fisher Scientific, kat. č. F530S, Waltham, USA)
- polymeráza Q5® High-Fidelity DNA Polymerase 50 U. μ l⁻¹ (BioLabs Inc., kat. č. M0491, New England)
- agaróza (VWR, Radnor, USA)
- chlorid hořečnatý hexahydrát (Sigma-Aldrich, kat. č. 442611-M, ČR)
- destilovaná voda
- ethidium bromid (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- nukleotidy, 100mmol.l⁻¹ dATP, dCTP, dGTP, dTTP (VWR; Radnor, USA)
- primery pro PCR (Eurofins Genomics, ČR)
- restriční enzym *Nco*I 10 U. μ l⁻¹ (Thermo Fisher Scientific, kat. č. R0193S, Waltham, USA)
- NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mix (BioLabs Inc., kat. č. E2621S, New England)
- CutSmart pufr 10x (BioLabs Inc., kat. č. B7204S, New England)
- glycerol
- SOC médium (Thermo Fisher Scientific, kat. č. 15544034, Waltham, USA)
- isopropanol (Sigma-Aldrich, kat. č. 67-63-0, St. Louis, USA)
- fenol (Sigma-Aldrich, kat. č. 108-95-2, St. Louis, USA)
- 2-(N-morpholino)ethansulfonová kyselina (MES; Sigma-Aldrich, kat. č. M3671, St. Louis, USA)
- 3',5'-Dimethoxy-4'-hydroxyacetofenon (Acetosyringon; Sigma-Aldrich, kat. č. D134406, St. Louis, USA)

- hydrogenufosforečnan sodný (Sigma-Aldrich, kat. č. 7558-79-4, St. Louis, USA)
- dihydrogenufosforečnan sodný (Sigma-Aldrich, kat. č. 1.06346, St. Louis, USA)
- 70% a 96% etanol
- Celite 545 AW (Sigma-Aldrich, kat. č. 68855-54-9, St. Louis, USA)

Použité kity:

- Qubit™ dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, kat. č. Q32850, Waltham, USA)
- QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, kat. č. 28104; Maryland, USA)

Použité roztoky:

- 5× TBE pufr:
 - 450 mmol.l⁻¹ Tris (Sigma-Aldrich; St. Louis, USA)
 - 450 mmol.l⁻¹ kyselina boritá (Lach-Ner; Neratovice, ČR)
 - 10 mmol.l⁻¹ EDTA, pH = 8,0 (Sigma-Aldrich; St. Louis, USA)
- 10× PCR pufr (s Mg²⁺):
 - 100mmol.l⁻¹ Tris-HCl, pH = 8,2 (Sigma-Aldrich, USA)
 - 500mmol.l⁻¹ KCl (Lach-Ner, ČR)
 - 15mmol.l⁻¹ MgCl₂ x 6H₂O (Lach-Ner, ČR)
 - 1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, USA)
- marker molekulové hmotnosti Gene Ruler 100 bp DNA Ladder Plus (Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA)
- 6× STOP C:
 - 100mmol.l⁻¹ EDTA (Sigma-Aldrich; St. Louis, USA)
 - 1% SDS (Sigma-Aldrich; St. Louis, USA)
 - 0,05% bromfenolová modř (Sigma-Aldrich; St. Louis, USA)
 - 0,05% xylen kyanol (Sigma-Aldrich; St. Louis, USA)
 - 42,5% glycerol (Sigma-Aldrich; St. Louis, USA)
 - 300 µl destilovaná voda
- 5x Cresol red:
 - 0,01% *o*-kresolová červeň (Sigma-Aldrich; St. Louis, USA)
 - 1,5% sacharóza (Lach-Ner; Neratovice, ČR)
- GET pufr
 - 50mmol.l⁻¹ glukosa
 - 10mmol.l⁻¹ EDTA (Sigma-Aldrich, USA)

- 25mmol.l⁻¹ Tris-HCl, pH = 8 (Sigma-Aldrich, USA)
- TE pufr
 - 10mmol.l⁻¹ Tris
 - 1mmol.l⁻¹ EDTA, pH = 8 (Sigma-Aldrich, USA)
- Neutralizační roztok (pH 4,8–5,3)
 - KAc 5mol.l⁻¹ 60 ml/100 ml
 - ledová CH₃COOH 11,5 ml/100 ml
 - ddH₂O 28,5 ml
- 2YT médium
 - kaseinový enzym 1,6 g/100 ml
 - kvasinkový autolyzát 1 g/100 ml
 - NaCl 0,5 g/100 ml
 - agar 1,6 g/100 ml
- kanamycin 50 µg.ml⁻¹
- rifampicin 0,5 µg.ml⁻¹
- ribonukleáza A 10 mg.ml⁻¹
- chloroform:isoamylalkohol 24:1
- fenol (pH > 7,8)
- 3mol.l⁻¹ NaAc (pH 5,5)
- 7,5mol.l⁻¹ NH₄Ac
- 10mM draselno-fosfátový pufr (pH 7,0)
 - 934,34 mg hydrogenfosforečnan draselný
 - 630,9 mg dihydrogenfosforečnan draselný
 - 1 l H₂O
 - sterilizace filtrací
- 20 mmol.l⁻¹ sodno-fosfátový pufr (pH 7,2)

4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

- horizontální laminární box (Jouan; Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
- mrazicí box (-20°C; Nord Line, ČR)
- termocyklér C1000 TouchTM (Bio-Rad, Hercules, USA)
- zdroj stejnosměrného napětí (MP-500V, Major Science, USA)
- zdroj stejnosměrného napětí EC 1000 XI power supply (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)

- aparatura pro horizontální gelovou elektroforézu Owl A6 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
- UV transilluminátor, InGenius system (Syngene; Bengaluru, IND)
- fluorometr Qubit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
- třepačka Reax Control (Heidolph Instruments, Německo)
- mrazicí box (−80°C; Thermo Fisher Scientific, USA)
- mikrobiologický Termostat BT 120 (Labo MS s.r.o., ČR)
- třepačka (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
- třepačka s houpavým pohybem Duomax 1030 (Heidolph; Schwabach; Německo)
- jednopaprskový spektrofotometr Ultrospec 10 (AP Czech; Praha; ČR)
- sálová centrifuga Heraeus Multifuge X1R (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
- centrifuga Mega Star 600R (VWR Collection; Leicestershire; Velká Británie)
- elektroporátor (KRD Technologies, ČR)
- mikrovlnná trouba (KOR-6C2B; DAEWOO, Korea)
- stolní centrifuga (5415 Eppendorf; Hamburk; Německo)
- konfokální mikroskop Leica TCS SP8 STED 3X (Leica Microsystems, Wetzlar, Německo)
- fytotron pro růst kultivarů ječmenů (Fytoscope, FS-SI-4600, Photon Systems Instruments, ČR)
- fytotron pro růst *Nicotiana benthamiana* (Weiss Gallenkamp, Velká Británie)
- magnetická míchačka IKA RCT Basic (IKAMAG™, Německo)
- digitální předvážky Vibra AJ-820CE (Shinko Denshi; Tokio, Japonsko)
- DNA analyzátor ABI 3730xl (Applied Biosystems; Foster City; USA)

4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

Cílem této diplomové práce bylo ověřit funkci kandidátních genů avirulence houbového patogenu *Blumeria graminis* ff. spp. v ječmenných kultivarech, které nesly k těmto genům příslušné geny rezistence. K tomuto účelu byla zvolena metoda VOX, tedy nadexprese kandidátního genu v cílové rostlinné tkáni pomocí virového vektoru *BSMV* složeného ze čtyř podjednotek. Cílem experimentální části byla taktéž optimalizace metody imbibice.

4.4.1 Klonování kandidátních genů do virového vektoru *BSMV*

Kandidátní geny avirulence *AVR_{a3}*, *AVR_{kl}*, *AVR_{a11}* a *AVR_{mu}* byly optimalizovány pro expresi v rostlinách a syntetizovány firmou General Biosystems, Inc. (generalbiosystems.com). Syntetizované kandidátní geny byly dodány v plazmidu pUC57. Lyofilizované plazmidy byly dle protokolu firmy General

Biosystems, Inc. rozpuštěny v 50 μl deionizované vody na finální koncentraci $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. Následně byly 2 μl plazmidové DNA transformovány elektrokompetentní *E. coli* (viz 4.4.2.2). Druhý den byla vybrána jedna kolonie *E. coli*, ta byla přenesena do 4 ml 2 YT s kanamycinem ($50 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) a inkubována přes noc. Následně byla z 1 ml suspenze vyrobena bakteriální konzerva (viz 4.4.4) a ze 3 ml byla extrahována plazmidová DNA dle 4.4.1.1. Kandidátní geny avirulence byly PCR amplifikovány z plazmidové DNA (Tab.1) za použití Q5® High-Fidelity DNA Polymerase a primerů uvedených v Tab.2 v celkovém objemu 25 μl na 1 vzorek. PCR reakce probíhala v termocykléru C1000 (TouchTM, Bio-Rad, USA) za podmínek uvedených v Tab. 3. Následně bylo provedeno klonování za použití NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mixu do virové podjednotky $\gamma 2$ s reportérovým genem iLOV (dále jen $\gamma 2:iLOV$). Virová podjednotka nesoucí gen *iLOV* byla připravena v rámci mé bakalářské práce. Podjednotka $\gamma 2:iLOV$ byla nejdříve štěpena restričním enzymem *NcoI* (viz 4.4.1.2).

Tabulka 1: Schéma pipetování reakční PCR směsi s Q5 HF DNA polymerázou.

Složka PCR reakční směsi	Koncentrace zásobního roztoku	Koncentrace ve finálním roztoku	Pipetovaný objem [μl] do reakční směsi
5x Q5 pufr	5x	1x	5 μl
Q5® High-Fidelity DNA Polymerase	50 U	0,5 U	0,25 μl
Forward primer	$10 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$	$500 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$	1,25 μl
Reverse primer	$10 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$	$500 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$	1,25 μl
dNTPs	$500 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$	$10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$	0,5 μl
DNA	-	-	0,5 μg – 5 ng
ddH ₂ O	-	-	doplnit do 25 μl

Tabulka 2: Seznam primerů a jejich použití.

Podtržení značí přesah sekvence do sekvence vektoru $\gamma 2:iLOV$.

Název primeru	Sekvence primeru (5' → 3')	Použití
iLOV_cloning_sequencing_R	TAA TGG GAT TAT CGG GAA GC	ověření úspěšnosti klonování použitím colony PCR
BS_24_F	GTA AAA GAA AAG GAA CAA CCC TG	
AVR_A3_2_SLIC_v2_F	<u>ACT TCG GCT AAG GAA GGG CCA</u> TGC GAG GAT TTC AAT GCA G	PCR amplifikace genu <i>AVR_{a3}</i>
AVR_A3_2_SLIC_v2_R	<u>TTC TCT ATC ATA GAT CTG ACT</u> CAC CCC CTG TAC TCG AAC	
AVRmu_F	<u>ACT TCG GCT AAG GAA GGG CCA</u> TGC GAC CAA GTG GTC CC	PCR amplifikace genu <i>AVR_{mu}</i> pro klonování pomocí Gibsson Assembly
AVRmu_R	<u>TTC TCT ATC ATA GAT CTG ACC</u> TAC TTA CGG ATT ATT TCA CAG TCG TTA TG	

Název primeru	Sekvence primeru (5' → 3')	Použití
AVRa11_F	<u>ACTT CGG CTA AGG AAG GGC CAT</u> GGC AAA ATA CTA TAC CTG	PCR amplifikace genu <i>AVR_{all}</i> pro klonování pomocí Gibsson Assembly
AVRa11_R	TTC TCT ATC ATA GAT CTG <u>ACC TAT</u> TTA CAA TCT ACA CTG ACG	
AVRk1_F	<u>ACT TCG GCT AAG GAA GGG CCA</u> TGG TGA CCT TTA TTT GTA ATG G	PCR amplifikace genu <i>AVR_{k1}</i> pro klonování pomocí Gibsson Assembly
AVRk1_R	TTC TCT ATC ATA GAT CTG <u>ACT CAC</u> TCT CGG GAA CAT GG	

Tabulka 3: Podmínky PCR reakce s Q5 HF DNA polymerázou.

Krok reakce		Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
denaturace		98	30 sec	1
amplifikace	denaturace	98	10 sec	34
	nasedání primerů	55-72	30 sec	
	polymerace	72	30 sec/kb	
finální extenze		72	2 min	1
ukončení		4	∞	1

4.4.1.1 Extrakce a purifikace plazmidové DNA – MiniPrep

1. První den na Petriho misky s 2YT médiem a kanamycinem (50 µg.ml⁻¹) provést sterilní kličkou křížový roztěr kultury *Escherichia coli* s požadovaným plazmidem.
1. Misky kultivovat přes noc v termostatu při 37 °C.
2. Druhý den kulturu naočkovat do 3 ml 2YT média s kanamycinem (50 µg.ml⁻¹).
3. Zkumavky inkubovat přes noc na třepačce při 37 °C, 220 rpm.
4. Třetí den rozpipetovat obsah zkumavek po 1,5 ml do sterilních 1,5ml mikrozkušavek. Mikrozkušavky centrifugovat 10 000 rpm, 5 min, 4 °C.
5. Supernatant ze zkumavek odlít a pelet resuspendovat ve 100 µl GET s RNasou A (100 µg.ml⁻¹).
6. Do mikrozkušavek přidat 200 µl alkalického SDS a vzorky inkubovat 5 min na ledu.
7. Následně přidat 75 µl neutralizačního roztoku. Suspenze promíchat a ponechat 30 min na ledu.
8. Vzorky centrifugovat 10 000 g, 10 min, 4 °C.
9. Supernatant přenést do nových 1,5ml mikrozkušavek a poté přidat 225 µl isopropanolu. Vzorky inkubovat 30 min při laboratorní teplotě.

10. Vzorčky centrifugovat 10 000 g, 10 min, 4 °C.
11. Supernatant po centrifugaci odstranit. Pelet omýt 300 µl vychlazeného 70% etanolu. Před odlitím etanolu mikrozkuřavky centrifugovat 2 min, 10 000 g, 4°C.
12. Dále přidat 300 µl vychlazeného 96% etanolu. Mikrozkuřavky centrifugovat 2 min, 10 000 g, 4°C. Supernatant odstranit.
13. Pelety sušit 10 min při laboratorní teplotě.
14. Vysušené pelety rozpustit ve 100 µl TE pufru.
15. Ke vzorkům přidat 50 µl fenolu (pH 8,0) a promíchat.
16. Přidat 50 µl chloroform:isoamylalkoholu 24:1. Vzorčky promíchat a centrifugovat 17 000 g, 2 min ve 4 °C.
17. Po centrifugaci odebrat horní fázi a kvantitativně přenést do čisté mikrozkuřavky. Ke vzorku horní fáze přidat stejný objem chloroform:isoamylalkoholu 24:1 a centrifugovat 17 000 g, 2 min ve 4 °C.
18. Krok 17 opakovat celkem třikrát, poté odebrat horní fázi, kvantitativně přenést do nové mikrozkuřavky a přidat 1/10V 3mol.l⁻¹ NaAc (pH 5,2-5,5) a 0,6V isopropanolu. Vzorčky promíchat a nechat stát 5 min při laboratorní teplotě.
19. Vzorčky centrifugovat 17 000 g, 10 min, 4 °C. Pokračovat jako v krocích 12–14.
20. Vysušené pelety rozpustit v 50 µl TE pufru a uchovávat při –20 °C.

4.4.1.2 Restrikční štěpení virového vektoru

Před ligací kandidátních genů do virové podjednotky $\gamma 2:iLOV$ byla tato podjednotka štěpena restrikčním enzymem *NcoI*, který specificky štěpí sekvenci 5' C|CATGG 3' Reakční směs byla připravena podle tabulky 4. Pět µg plazmidové DNA vektoru $\gamma 2:iLOV$ bylo štěpeno v celkovém objemu 100 µl. Směs byla inkubována po dobu 90 minut při 37 °C a inaktivace enzymu probíhala 20 min při 80 °C.

Tabulka 4: Reakční směs pro štěpení virového vektoru $\gamma 2:iLOV$ enzymem *NcoI*.

Složky reakční směsi	Koncentrace zásobního roztoku	Výsledná koncentrace
enzym <i>NcoI</i>	10 U.µl ⁻¹	50 U/reakce
DNA	100 ng.µl ⁻¹	5 µg.µl ⁻¹
10x CutSmart pufr	10x	1x
dH ₂ O	doplnit do výsledného objemu	

4.4.1.3 Fluorimetrické stanovení koncentrace DNA

Koncentrace jak štěpeného vektoru $\gamma 2:iLOV$, tak amplifikovaných AVR genů byly stanoveny pomocí zařízení Qubit (Invitrogen).

1. Standardy 1 a 2 s koncentracemi 100 ng. μ l⁻¹ a 0 ng. μ l⁻¹ 20–30 minut temperovat na pokojovou teplotu.
2. Pracovní roztok (Tab. 5) připravit do mikrozkušavky a řádně promíchat.

Tabulka 5: Příprava pracovního roztoku pro Qubit.

Složení pracovního roztoku	1 vzorek	n vzorků
dsDNA BR pufr	199 μ l	199*n μ l
Qubit Reagent	1 μ l	1*n μ l

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

4.4.1.4 Purifikace produktů PCR reakce

Přečištění produktů vzniklých PCR reakcí bylo provedeno pomocí QIAquick PCR Purification kitu (Qiagen) dle pokynů výrobce. Koncentrace přečištěných produktů byla stanovena pomocí zařízení Qubit (viz 4.4.3.1).

4.4.1.5 Ligace inzertů do virové podjednotky $\gamma 2:iLOV$

Ligační směs byla připravena dle Tab. 6 a DNA vektoru a inzertu byly smíchány v poměru 3:1 (inzert:vektor).

Tabulka 6: Tabulka pro přípravu 10 μ l ligační směsi.

Složky klonovací směsi	Objem [μ l]
NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mix	5
vektor (50 ng. μ l ⁻¹)	1
inzert	x
dH ₂ O	doplnit do objemu 10 μ l

Připravené klonovací směsi byly inkubovány v termocykléru 1 hodinu při 50 °C a ihned poté byla provedena transformace elektrokompetentních *E. coli* DH5α (viz 4.4.2).

4.4.2 Transformace buněk *Escherichia coli* DH5α elektroporací

Ligované konstrukty byly transformovány do elektrokompetentních buněk *E. coli* DH5α metodou elektroporace.

4.4.2.1 Příprava elektrokompetentních buněk

K elektroporaci je zapotřebí elektrokompetentních buněk, které odolají vysokému napětí. Elektrokompetentní bakteriální buňky byly připraveny ze startovacích kultur *E. coli* DH5α, *A. tumefaciens* EHA105, nebo *A. tumefaciens* AGL1.

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

4.4.2.2 Elektroporace

Připravené elektrokompetentní buňky je dále možné transformovat elektroporací.

1. Do dvou sterilních zkumavek připravit 950 µl SOC média laboratorní teploty.

2. K 50 μl bakteriální suspenze elektrokompetentních buněk přidat 1 μl ligační směsi.
3. Elektroporaci provést ve sterilních elektroporačních kyvetách při 2.1 kV, 100 Ω , 25 μF a časové konstantě přibližně 2,6 milisekund.
4. Suspenze z kyvet kvantitativně převést do SOC média a inkubovat 90 minut při optimální teplotě dle bakteriálního kmene a 220 rpm.
5. Na misky s 2YT médiem a vhodným antibiotikem rozetřít sterilní hokejkou 100 μl narostlé kultury a misky inkubovat přes noc v inkubátoru při optimální teplotě.

4.4.2.3 Colony PCR pro ověření úspěšnosti transformace

Druhý den byla úspěšnost elektroporace ověřena pomocí colony PCR. Pro všechny klonované inzerty byly použity primery BS_24_F a iLOV_cloning_sequencing_R (Tab.2). Celkový objem reakční směsi, která byla připravena dle Tab. 7, činil 20 μl pro jeden vzorek. K reakční směsi byla sterilní špičkou přidána část kolonie a PCR reakce probíhala v termocykléru podle podmínek v Tab. 8. PCR produkty byly separovány pomocí agarózové elektroforézy a vizualizovány dokumentačním zařízením Snapgene.

Tabulka 7: Schéma pipetování PCR reakční směsi za použití *Taq* polymerázy.

Složka PCR reakční směsi	Koncentrace zásobního roztoku	Finální koncentrace	Objem ve 20 μl reakci
PCR pufr (Mg^{2+})	10x	1x	2 μl
Cresol Red	5x	1x	4 μl
Forward primer	10 $\mu\text{mol.l}^{-1}$	1 $\mu\text{mol.l}^{-1}$	2 μl
Reverse primer	10 $\mu\text{mol.l}^{-1}$	1 $\mu\text{mol.l}^{-1}$	2 μl
dNTPs	10 mmol.l^{-1}	200 $\mu\text{mol.l}^{-1}$	0,4 μl
<i>Taq</i> polymeráza	2 U/ μl	0,5 U	0,4 μl
dH ₂ O	-	-	8,2 μl

Tabulka 8: Podmínky PCR reakce s *Taq* DNA polymerázou

Krok reakce	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
denaturace	95	5 min	1
amplifikace	denaturace	95	30 s
	nasedání primerů	55	30 s
	elongace	72	30 s/500 bp
finální extenze	72	10 min	1
ukončení	12	∞	1

4.4.2.4 Agarózová gelová elektroforéza PCR produktů

Příprava 1,2% gelu

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

4.4.2.5 Sekvence

Ověření sekvence vektorů s vloženými inzerty bylo provedeno Sangerovou sekvenací Ing. Marií Seifertovou na DNA analyzátoru ABI 3730xl (Applied Biosystems). Získaná data byla vyhodnocena pomocí programu Genious Prime (Biomatters, Ltd., Nový Zéland).

4.4.3 Transformace *Agrobacterium tumefaciens*

Pro účely agroinfiltrace rostliny *Nicotiana benthamiana* musely být jednotlivé podjednotky vektoru *BSMV* přeneseny do *A. tumefaciens* EHA105 nebo AGL1 pomocí elektroporace (viz kapitola 4.4.2.2). Elektrokompentní buňky byly transformovány 2 ng plazmidové DNA. Po 90min inkubaci při 28 °C byly suspenze rozetřeny na misky se selekčním médiem (s obsahem kanamycinu 50 µg.ml⁻¹ a rifampicinu 25 µg.ml⁻¹). Misky byly inkubovány 2 dny při 28 °C. Elektroporace byla ověřena colony PCR (viz kapitola 4.4.2.3) s primery BS_24_F a iLOV_cloning_sequencing_R (Tab.2).

4.4.4 Agroinfiltrace

Agroinfiltrace do rostlin *N. benthamiana* byla provedena k ověření funkčnosti připravených vektorů genomu *BSMV* v hostiteli. Agroinfiltrace kultivarů *H. vulgare* s příslušnými rezistencemi sloužila jako nástroj pro validaci genů avirulence. Semenáčky *N. benthamiana* byly 6 týdnů pěstovány ve fytotronu Weiss Gallenkamp v režimu den: 16 hod/20 °C, noc: 8 hod/16 °C při 60% vlhkosti. Semena *Hordeum vulgare* byla inkubována na vlhké buničině v lednici po dobu 2 dnů, následně byly misky umístěny do tmy na pokojovou teplotu přes noc. Semena byla zasazena do substrátu a umístěna do fytotronu Fytoscope, FS-SI-4600 v režimu den: 10 hodin/22 °C; noc: 14 hodin/16 °C; vlhkost: 60 %. Vektor *BSMV* potřebuje ke svému úspěšnému množení a šíření v rostlině kompletní genom složený ze čtyř podjednotek, proto byla pro agroinfiltraci použita kombinace podjednotek α , β , γ 1ccdb

a $\gamma 2:iLOV:inzert$. Jako pozitivní kontrola infiltrace byla v obou případech použita kombinace α , β , $\gamma 1ccdb$ a $\gamma 2:iLOV$. Rostliny bez agroinfiltrace byly použity jako negativní kontrola. Jako pozitivní kontrola funkčnosti VOX konstruktů po agroinfiltraci u *H. vulgare* byla použita kombinace α , β , $\gamma 1ccdb$ a $\gamma 2:iLOV:AVR_{at}$ na kultivaru Lumar. Funkční a validovaný konstrukt $\gamma 2:iLOV:AVR_{at}$ byl připraven v rámci mé bakalářské práce.

Příprava materiálu k agroinfiltraci

1. Všechny potřebné a testované podjednotky *BSMV* v *A. tumefaciens* individuálně namnožit ve 100 ml 2YT média s kanamycinem ($50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$).
2. Suspenze inkubovat 36–48 hodin na třepačce při 28°C a 220 rpm.

Příprava bakteriálních konzerv *A. tumefaciens*

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

Postup agroinfiltrace

1. Připravit agroinfiltrační pufr (Tab. 9).

Tabulka 9: Příprava agroinfiltračního pufru.

Složka pufru	Příprava zásobního roztoku	Koncentrace zásobního roztoku	Konečná koncentrace	Objem [ml]
MES	1,95 g v 10 ml ddH ₂ O	1 mol.l ⁻¹	10 mmol.l ⁻¹	4
MgCl ₂	0,95 g v 10 ml ddH ₂ O	1 mol.l ⁻¹	10 mmol.l ⁻¹	4
acetosyringone	19,62 mg v 1 ml DMSO nebo 58,86 mg v 1 ml DMSO	100 mmol.l ⁻¹ pro <i>N. benthamiana</i> , 300 mmol.l ⁻¹ pro <i>H. vulgare</i>	100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ nebo 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	0,4
dH ₂ O	doplnit do objemu			392

2. Suspenze buněk rozlít do sterilních centrifugačních kyvet a centrifugovat 10 min při 2800 g a 4°C .
3. Supernatant odlít a pelety rozpustit v 50 ml agroinfiltračního pufru.
4. Jednopaprskovým spektrofotometrem změřit optickou hustotu při vlnové délce 600 nm. Suspenze ředit agroinfiltračním pufrem, dokud OD u všech nedosáhne hodnoty 0,7.
5. Naředěné suspenze s podjednotkami α , β , $\gamma 1ccdb$ a $\gamma 2:iLOV$ nebo $\gamma 2:iLOV:AVR$ inzert smíchat v poměru 1:1:1:1.
6. Směsi suspenzí umístit na třepačku na 3–5 hodin na 28°C a 220 rpm.

7. Směsí podjednotek infiltrovat spodní stranu listů *N. benthamiana* a horní stranu listů ječmenných kultivarů.
8. Sterilním skalpelem list naříznout a injekční stříkačkou do něj vpravit suspenzi. U ječmenných kultivarů list jemně narušit skalpelem a injekční stříkačkou vpravit 0,5 ml suspenze. Infiltrovaná místa označit fixem.
9. Rostliny přes noc uchovávat ve tmě a druhý den umístit zpět do fytotronu při podmínkách uvedených výše.
10. Po 7–10 dnech provést kontrolu exprese reportérového genu iLOV konfokální fluorescenční mikroskopií.

4.4.4.1 Verifikace úspěšnosti agroinfiltrace fluorescenční mikroskopií

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

1. Z místa na listu označeného fixem vyřezat preparát velikosti 5x10 mm.
2. Preparát umístit na mikroskopovací misku a převrstvit kouskem agarózového gelu.
3. Preparáty pozorovat pomocí konfokálního fluorescenčního mikroskopu. Pro snímání preparátů *N. benthamiana* byl použit objektiv 20x, pro preparáty ječmene 10x. Pro detekci iLOV bylo použito emisní spektrum 510–550 nm a excitační spektrum 476 nm. Gating byl nastaven na hodnotu 0–4,8 ns. Struktura listu byla snímána pomocí transmise.
4. Preparáty byly snímány jak v jedné vrstvě, tak napříč vrstvami formou Z-stacků.

4.4.5 Optimalizace metod pro transformaci jednoděložných rostlin

Pro transformaci jednoděložných rostlin virovými částicemi mohou být kromě agroinfiltrace použity také metody listové abraze či imbibice. Jak listová abraze, tak metoda imbibice využívají agroinfiltrovaných listů *N. benthamiana* virovými podjednotkami.

4.4.5.1 Listová abraze

Aby byl virus schopen proniknout do rostliny, je potřeba nejdříve narušit její buněčnou stěnu. Narušení buněčné stěny je prováděno třením listů virovým homogenátem s celitem.

1. Z agroinfiltrovaných listů *N. benthamiana* vystříhnout označená místa, kousky zvážit a umístit do vychlazené třecí misky. K listům přidat 10mM draselno-fosfátový pufr (pH 7,0) (1,5 ml pufru na 1 g listů) a listy rozetřít tloučkem. Homogenát přefiltrovat přes dvě vrstvy gázy.

2. K filtrátu přidat Celite 545 AW tak, aby zaujímal 1–2 % objemu.
3. K transformaci použít rostliny ječmene s již vyrostlým druhým listem. Druhý list 2–3krát potřít virovým homogenátem od báze k vrcholu.
4. Rostliny ječmene ponechat 5–10 min při laboratorní teplotě a následně pomocí rozprašovače s vodou smýt zbytky virového homogenátu.
5. Rostliny zakrýt igelitem, nebo umístit do plastové krabice a ponechat přes noc ve tmě.
6. Druhý den umístit rostliny do fytotronu (Fytoscope, FS-SI-4600) v režimu den: 10 hodin/22 °C; noc: 14 hodin/16 °C; vlhkost: 60 %. Po sedmi dnech provést fluorescenční mikroskopii dle 4.4.4.1.

4.4.5.2 Imbibice

Metoda imbibice využívá klíčení semen ve virovém homogenátu připraveného z agroinfiltrovaných listů *N. benthamina* obdobně jako v kapitole 4.4.5.1 s použitím 20mM sodno-fosfátového pufru (pH 7,2). Při imbibici dochází k rovnoměrné infekci rostliny virem. V rámci optimalizace metody byla imbibice prováděna na pšeničném kultivaru GZ1, u kterého byla imbibice úspěšná v bakalářské práci Martina Lukáče.

1. Připravit virový homogenát rozetřením vystřížených a zvážených listů označených fixem ve 20mM sodno-fosfátovém pufru (1 ml pufru na 0,5 g listů).
2. Připravit ředící řadu virového homogenátu – 1:1 (virový homogenát:deionizovaná voda), 1:10, 1:50 a 1:100. Pro semena negativní kontroly použít deionizovanou vodu bez virového homogenátu.
3. Do Petriho misek s mokrou buničinou umístit semena a misky uložit na 1 den do lednice.
4. Buničinu z misek odstranit a semena zalít do poloviny zředěným homogenátem.
5. Misky zabalit do alobalu a umístit na 2 dny na třepačku (2 rpm, laboratorní teplota).
6. Semena zasadit do substrátu a květináče umístit do fytotronu (Fytoscope, FS-SI-4600) (den: 10 hodin/22 °C; noc: 14 hodin/16 °C; vlhkost: 60 %).
7. Po sedmi dnech provést kontrolu infekce fluorescenční mikroskopii (viz kapitola 4.4.4.1).

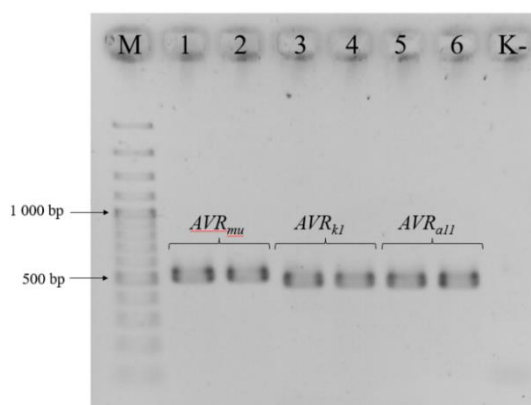
5 VÝSLEDKY

5.1 Příprava virových konstruktů nesoucích AVR geny

Z bakterií nesoucích kandidátní geny *AVR_{a3}*, *AVR_{all}*, *AVR_{kl}* a *AVR_{mu}* byla vyizolována plazmidová DNA, která byla použita pro PCR amplifikaci. AVR geny byly úspěšně amplifikovány PCR reakcí. Výsledné amplikony měly očekávané velikosti 652 bp pro *AVR_{a3}*, 301 bp pro *AVR_{all}*, 304 bp pro *AVR_{kl}* a 388 bp pro *AVR_{mu}*. Produkty PCR reakcí byly přečištěny pomocí QIAquick PCR Purification kitu (Qiagen) a byla stanovena jejich koncentrace pomocí zařízení Qubit (Invitrogen). Koncentrace přečištěných produktů činila 27 ng.μl⁻¹ pro *AVR_{a3}*, 23,8 ng.μl⁻¹ pro *AVR_{all}*, 33 ng.μl⁻¹ pro *AVR_{kl}* a 29,8 ng.μl⁻¹ pro *AVR_{mu}*. Všechny produkty byly na základě svých délek naředy pro účely ligační reakce na 15 fmol.

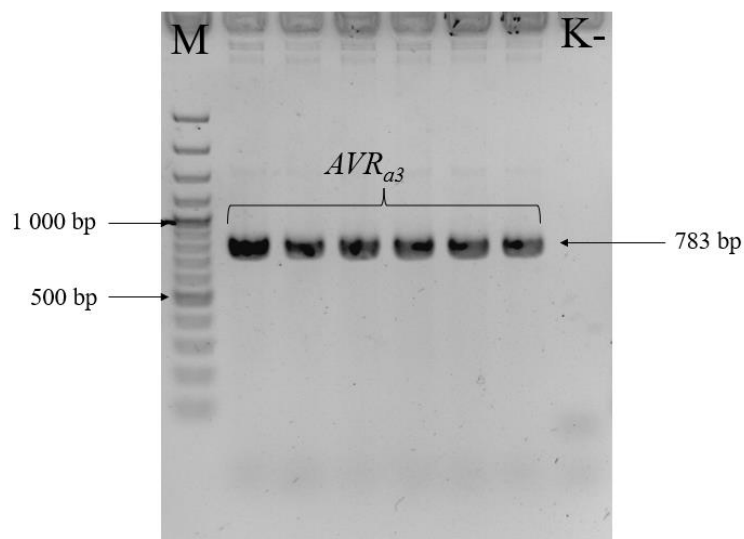
Vektor $\gamma 2:iLOV$ byl štěpen enzymem NcoI-HF a následně byla připravena ligační směs složená z 50 ng (30 fmol) vektoru $\gamma 2:iLOV$ a 15 fmol amplifikované a přečištěné DNA AVR genu. Úspěšnost ligace byla ověřena pomocí colony PCR a agarózovou elektroforézou. Z testovaných 56 kolonií u vzorku *AVR_{a3}* se u 55 amplifikoval požadovaný fragment o velikosti 783 bp. Pro vzorky *AVR_{all}*, *AVR_{kl}* a *AVR_{mu}* byly vždy testovány tři kolonie a u všech kolonií se vyskytoval požadovaný fragment. Pro vzorek *AVR_{all}* měl tento fragment velikost 425 bp, pro *AVR_{kl}* 428 bp a pro *AVR_{mu}* 512 bp.

Pro každý AVR gen byla z vybraných kolonií vyizolována plazmidová DNA, která byla následně sekvenována. Na Obr. 5 je výsledek PCR amplifikace vzorků plazmidové DNA s inzerty *AVR_{mu}*, *AVR_{kl}* a *AVR_{all}* před sekvenací. Výsledek amplifikace vzorku s inzertem *AVR_{a3}* je zobrazen na Obr. 6. Sekvence plazmidové DNA vzorků *AVR_{a3}*, *AVR_{all}*, *AVR_{kl}* a *AVR_{mu}* prokázala, že AVR geny byly do vektoru vloženy správně.



Obrázek 5: Produkty PCR amplifikace vzorků izolované plazmidové DNA s AVR inzerty.

M – jamka s markerem molekulové hmotnosti (100 bp). Jamky 1–2 obsahují produkty amplifikace DNA s *AVR_{mu}* inzertem o velikosti 512 bp. V jamkách 3–4 jsou produkty amplifikace DNA s inzertem *AVR_{kl}* velikosti 428 bp a v jamkách 5–6 jsou amplikony DNA s inzertem *AVR_{all}* o velikosti 425 bp. K- je negativní kontrola.



Obrázek 6: Produkty PCR amplifikace vzorku izolované plazmidové DNA s inzertem *AVR_{a3}*.

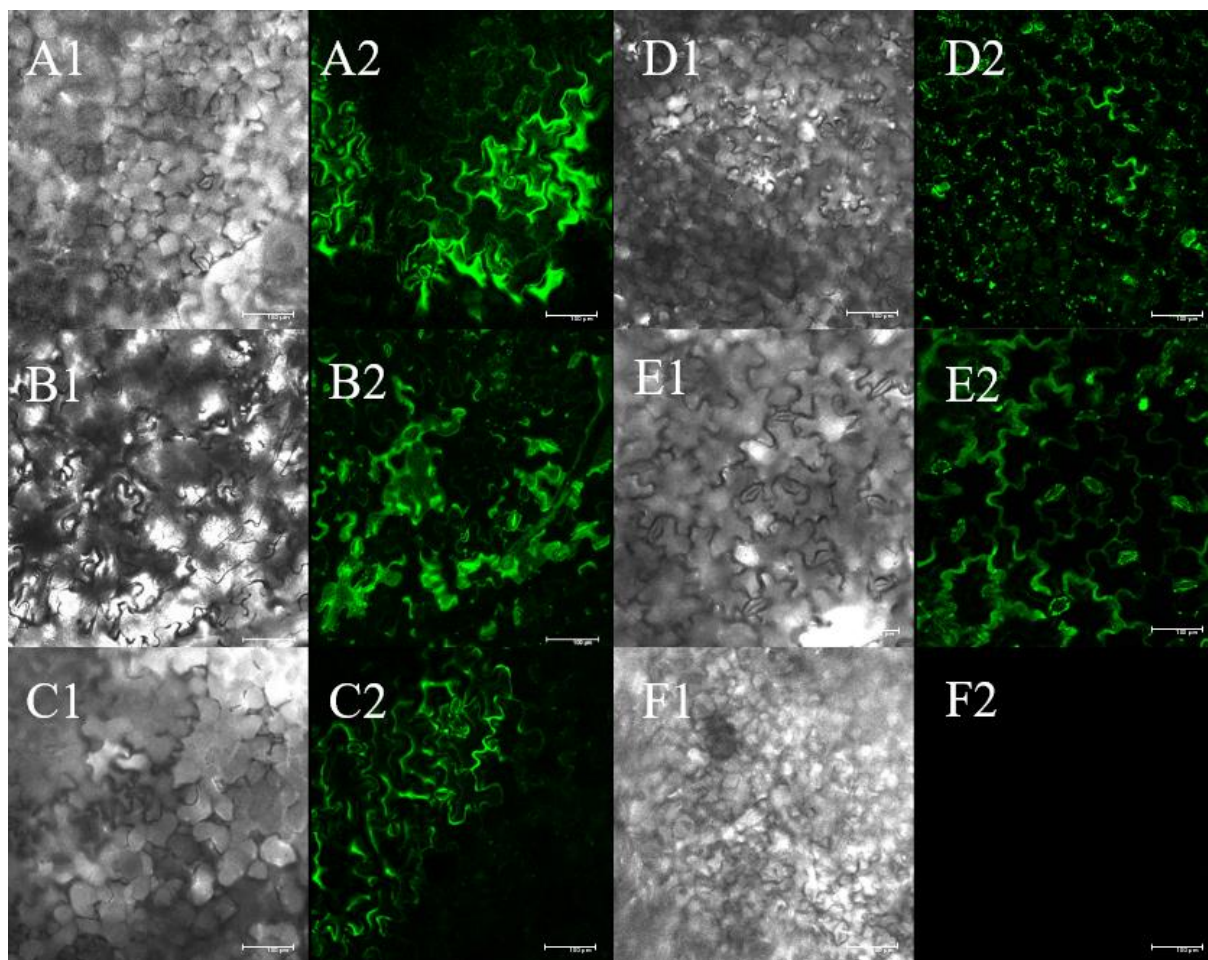
M – jamka s markerem molekulové hmotnosti (100 bp). K- je negativní kontrola. Jamky s označením *AVR_{a3}* obsahují amplifikovanou DNA, jejímž produktem je amplikon o velikosti 783 bp.

Plazmidovou DNA *AVR* genů byly transformovány elektrokompetentní bakterie EHA105 a AGL1. Úspěšnost transformace byla ověřena colony PCR. Pro každý vzorek bylo testováno 10 kolonií a všechny kolonie nesly požadované inzerty.

5.2 Ověření úspěšnosti agroinfiltrace

Úspěšnost agroinfiltrace *N. benthamiana* a *H. vulgare* virovým vektorem *BSMV* s příslušnými inzerty byla ověřena fluorescenční mikroskopií preparátů agroinfiltrovaných listů. Stejně tak byla mikroskopována i rostlina, která nebyla použita pro agroinfiltraci a sloužila jako negativní kontrola.

V případě *N. benthamiana* infiltrovaných konstruktem *BSMV:iLOV*, který sloužil jako pozitivní kontrola, a konstrukty *BSMV:AVR:iLOV* s kandidátními geny avirulence (Obr. 7 – A1–E2) byl detekován fluorescenční signál při vlnové délce emisního spektra 510–550 nm a 476 nm excitačního spektra. V případě negativní kontroly *N. benthamiana* nebyl v tomto spektru detekován žádný signál (Obr. 7 – F1–F2).



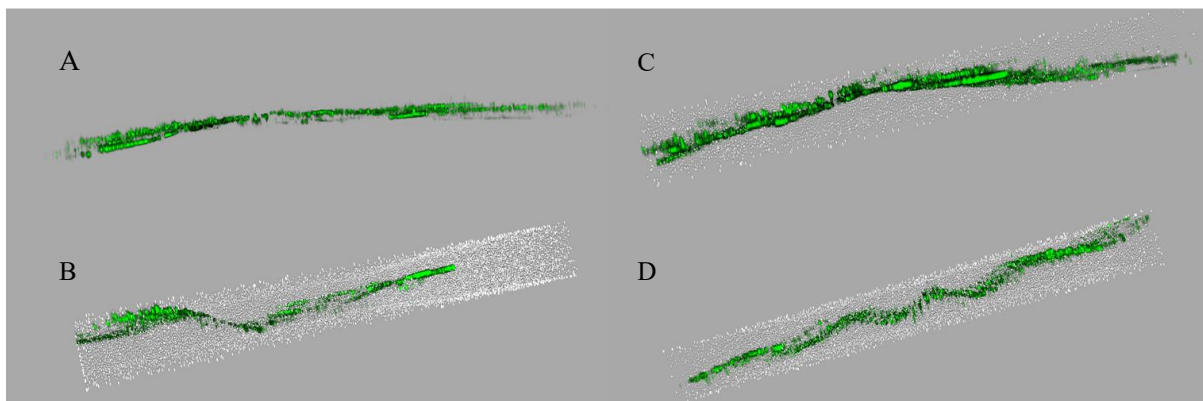
Obrázek 7: Konfokální fluorescenční mikroskopie listů *N. benthamiana*.

Detekce fluorescenčního signálu reportérového genu *iLOV* u jednotlivých konstruktů: (A2) *BSMV:iLOV*, (B2) *BSMV:AVR_{al}:iLOV*, (C2) *BSMV:AVR_{mu}:iLOV*, (D2) *BSMV:AVR_{kl}:iLOV*, (E2) *BSMV:AVR_{all}:iLOV*. F2 – snímek negativní kontroly značící nepřítomnost signálu reportérového genu *iLOV*. Snímky označené číslem 1 jsou nasnímané struktury listů pomocí transmise.

U rostlin *H. vulgare* agroinfiltrovaných *BSMV* konstrukty byla za účelem validace kandidátních genů avirulence provedena i kontrola hypersenzitivní odpovědi rostliny. Týden až devět dní po agroinfiltraci bylo pozorováno, zdali došlo k hypersenzitivní reakci v místě agroinfiltrace. Hypersenzitivní reakce nastává, dojde-li k reakci mezi genem rezistence a odpovídajícím genem avirulence. Tato reakce byla očekávána u kultivaru Lumar s rezistencí *Mla1* po agroinfiltraci konstruktem s *AVR_{al}*. Tato kombinace měla sloužit jako pozitivní kontrola, protože již byla ověřena v rámci mé bakalářské práce. Dále byla hypersenzitivní reakce očekávána u kultivaru Mars s rezistencí *Mla3* po agroinfiltraci konstruktem s *AVR_{a3}*, u kultivaru A-222 s rezistencí *Mla11* po agroinfiltraci konstruktem s *AVR_{all}*, u kultivaru Lyallpur s rezistencí *Mlk1* po agroinfiltraci konstruktem s *AVR_{kl}* a u kultivaru Mulyan s rezistencí *Mlmu* po agroinfiltraci konstruktem s *AVR_{mu}*. Kultivar Stirling byl použit jako kontrola. Jedná se o náchylný kultivar, který nenesení geny rezistence proti *Bgh*, proto u něj hypersenzitivní reakce po agroinfiltraci kterýmkoliv konstruktem s *AVR* genem nebyla očekávána. Hypersenzitivní reakce však nebyla ani po

několika opakováních zaznamenána u žádné z výše zmíněných kombinací AVR genu a ječmenného kultivaru včetně pozitivní kontroly. Validace genů tak byla neúspěšná.

Pro ověření exprese reportérového genu *iLOV* v ječmenných kultivarech byla provedena konfokální fluorescenční mikroskopie. Ani v jednom případě nebyl zaznamenán fluorescenční signál. V rámci optimalizace agroinfiltrace byly následující experimenty prováděny jen s virovými konstrukty *BSMV:iLOV*, *BSMV:AVR_{al}:iLOV* a *BSMV:AVR_{a3}:iLOV*. V případě agroinfiltrace ječmenů těmito konstrukty byla provedena konfokální fluorescenční mikroskopie v několika vrstvách (Z-satck). Obr. 8 (A–C), na kterém jsou zobrazeny výsledky snímání napříč vrstvami u kultivaru Stirling infikovaného příslušnými virovými konstrukty, zachycují signál pouze v jedné vrstvě. Jedná se o nespecifický signál, který vzniká odrazem světla od povrchu listu. Stejný nespecifický signál zachycuje i Z-stack negativní kontroly (Obr.8 – D), tedy rostliny, která nebyla použita k agroinfiltraci.



Obrázek 8: Detekce fluorescenčního signálu reportérového genu *iLOV* napříč vrstvami (Z-stack).

Na snímcích je zachycen signál z konfokálního fluorescenčního mikroskopu, který byl měřen napříč vrstvami listu. A – je snímek infiltrovaného ječmene konstruktem *BSMV:iLOV*. B – je snímek infiltrovaného ječmene konstruktem *BSMV:AVR_{al}:iLOV*. C – je snímek infiltrovaného ječmene konstruktem *BSMV:AVR_{a3}:iLOV* a D – je snímek negativní kontroly.

5.3 Ověření úspěšnosti listové abraze a imbibice

Pomocí konfokální fluorescenční mikroskopie byla ověřena úspěšnost listové abraze a imbibice. U listové abraze ječmenných kultivarů nebyl detekován žádný signál ve fluorescenčním mikroskopu ani hypersenzitivní reakce v místě abraze.

V případě imbibice bylo vždy 10 semen rostlin GZ1 vystaveno různým koncentracím virového homogenátu. Jednalo se o koncentrace 1:1 (virový homogenát:deionizovaná voda), 1:10, 1:50 a 1:100. Fluorescenční signál nebyl detekován u žádné z rostlin. U koncentrace 1:3 byl zaznamenán výrazný pokles klíčivosti, avšak žádný fluorescenční signál. Koncentrace 1:10, 1:50 a 1:100 nevykazovaly žádnou viditelnou změnu v klíčivosti.

6 DISKUZE

Cílem této diplomové práce bylo připravit konstrukty s kandidátními geny avirulence *AVR_{a3}*, *AVR_{kl}*, *AVR_{a11}* a *AVR_{mu}* a následně tyto geny validovat. Kandidátní geny byly získány Mgr. Evou Janákovou, Ph. D. na základě GWAS analýzy v rámci předešlých pokusů laboratoře. Všechny tyto geny nesou na svém počátku sekvenci k syntéze signálního proteinu, který je tvořen řetězcem 20–26 aminokyselin a je typickým znakem houbových efektorových proteinů (Mukhi *et al.*, 2020).

Validace a funkční charakterizace genů avirulence je stále velkou výzvou a obzvláště obtížným úkolem, pracujeme-li s jednoděložnými rostlinami. Často využívaným přístupem je heterologní exprese v bakteriích *E. coli* a následná infiltrace rostlin. Tento přístup má však jen úzké spektrum využití a není příliš efektivní, protože bakterie postrádají možnost posttranslačních modifikací proteinu, které mohou být klíčové pro aktivaci AVR proteinu (Kanyuka, 2022). Jednou z nejhojněji využívaných metod k validaci AVR genů je agroinfiltrace listů rostliny, tato metoda je však poměrně obtížná právě u jednoděložných rostlin, které nejsou přirozenými hostiteli *A. tumefaciens* (De Cleene a De Ley, 1976). Pomocí této metody byla validace AVR genů úspěšná např. v práci Lu *et al.* (2016), kde byly úspěšně validovány jako geny avirulence geny *AVR_{a1}* a *AVR_{a13}*. V práci Lu *et al.* (2016) byly k validaci použity dva postupy. Nejdříve byla provedena validace pomocí agroinfiltrace v ječmenech s příslušnými rezistencemi *Mla1* a *Mla13*, kdy byla sledována hypersenzitivní odpověď. Následně byla ke stanovení aktivity genů *AVR_{a1}* a *AVR_{a13}* použita metoda pomocí stanovení luciferázové aktivity v protoplastech ječmene, které byly izolovány z kultivaru s rezistencí *Mla1*, respektive *Mla13*. Zde byly použity pro transformaci protoplastů dva konstrukty. Konstrukt s genem AVR a konstrukt s genem pro luciferázu (*LUC*). Interakce genů AVR a *Mla* se v tomto experimentu projevila jako pokles luciferázové aktivity, protože docházelo k poklesu životaschopných buněk, a tedy i k poklesu exprese genu *LUC*. Další úspěšnou validací byla validace kandidátních genů *AVR_{a7}*, *AVR_{a9}*, *AVR_{a10}* a *AVR_{a22}* v práci Saur *et al.* (2019a). V této práci byla k validaci taktéž použita agroinfiltrace, která byla v tomto případě prováděna na listech rostliny *N. benthamiana*. Pro agroinfiltraci byly použity bakterie nesoucí binární vektory s inzertou genu AVR a příslušného genu *Mla*. Následně byla opět sledována případná hypersenzitivní reakce v místě infiltrace. V práci Saur *et al.* (2019a) byla taktéž použita metoda stanovení životaschopných buněk v ječmenných protoplastech pomocí luciferázové aktivity, zde však byly protoplasty izolovány z citlivého ječmene a pro transformaci byly použity konstrukty s genem AVR, s genem *Mla* a s genem *LUC*. Práce Saur *et al.* (2019a) přinesla důležitý poznatek, a to sice, když byla provedena agroinfiltrace na listech *N. benthamiana* konstrukty s *AVR_{a9}* a *Mla9*, nedošlo k hypersenzitivní reakci, avšak při stanovení luciferázové aktivity v ječmenných protoplastech byl zaznamenán 67% pokles luciferázové aktivity. Tento poznatek přispívá k hypotéze, že k úspěšné interakci mezi geny *AVR_{a9}* a *Mla9* je potřeba další protein, či proteiny, které jsou exprimovány v rostlinách ječmene (Saur *et al.*, 2019a), proto byla i v této diplomové práci zvolená metoda validace prováděna přímo na ječmenných kultivarech. Jedním z nejnovějších přístupů k validaci AVR genů je

metoda využívající virových vektorů, VOX. Při této metodě není zapotřebí molekulárně izolovaný *MI* gen a validace probíhá přímo v tkáni rezistentní rostliny (Saur *et al.*, 2019b). Hlavní limitací této metody je kapacita virových vektorů. Virový vektor *FoMV* je schopen stabilně exprimovat proteiny do velikosti 600 aminokyselin (Kanyuka, 2022). Proto byl v této diplomové práci pro metodu VOX využit upravený čtyřpodjednotkový virový vektor *BSMV*, který dosahuje klonovací kapacity až 2 448 bp, a je proto vhodným vektorem pro tuto metodu (Cheuk a Houde, 2019).

V této diplomové práci byly k validaci *AVR* genů použity dvě metody. První metodou byla agroinfiltrace listů ječmenných kultivarů s příslušnou rezistencí *MI*. Jako vektor byl použit čtyřpodjednotkový virus *BSMV* (Cheuk a Houde, 2017), avšak žádná z kombinací neposkytla hypersenzitivní reakci včetně kombinace *AVR_{ai}/Mla1*, která byla použita jako pozitivní kontrola. U žádné z kombinací nebyla pozorována hypersenzitivní reakce a neúspěšná byla i konfokální fluorescenční mikroskopie, kdy nebyl detekován signál fluorescenčního proteinu *iLOV*. Tato skutečnost by mohla znamenat, že nedocházelo k expresi proteinů z vektoru. Byla proto provedena sekvenace všech virových podjednotek včetně podjednotky $\gamma 2:iLOV$. Sekvenace neprokázala změnu v sekvenci inzertu *AVR* genu, reportérového genu ani v klíčových oblastech plazmidu. Dalším důvodem neúspěchu agroinfiltrace ječmenných kultivarů by mohl být, jak již bylo zmíněno výše, fakt, že ječmen není přirozeným hostitelem *Agrobacterium tumefaciens* (De Cleene a De Ley, 1976), což ztěžuje i jeho transformaci. Význam by proto mohl hrát i výběr vhodného kmene *A. tumefaciens*. Podle Harwood (2013) se jako nejlepší kmen pro transformaci ječmene jeví kmen AGL1 a stejný kmen byl použit také v práci Lu *et al.* (2016), na druhé straně Yadav *et al.* (2012) ve své práci zaznamenávají úspěch při transformaci ječmene kmenem *A. tumefaciens* EHA105. V mé práci byla agroinfiltrace ječmene provedena s oběma kmeny bakterií a ani v jednom případě nebyla agroinfiltrace ječmene úspěšná. Dalším důležitým faktorem při agroinfiltraci je přítomnost acetosyringonu, který je využíván k navození aktivity *A. tumefaciens* a bylo prokázáno, že je významnou látkou pro optimální funkci T-DNA výměny mezi bakteriálním a rostlinným genomem (Yadav *et al.*, 2012). Přítomnost acetosyringonu také výrazně zvyšuje expresi genů, jak bylo prokázáno např. v práci Norkunas *et al.* (2018), kdy při použití acetosyringonu docházelo ke zvýšené expresi reportérového genu *uidA* kódujícího GUS reportérový enzym. Úspěšnost agroinfiltrace a obecně *Agrobacterium*-zprostředkované transformace může ovlivňovat koncentrace acetosyringonu v agroinfiltračním pufru či kultivačním médiu (Yadav *et al.*, 2012). Pro *N. benthamiana* je nejčastěji pracováno s 200 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ koncentrací acetosyringonu (Ma *et al.*, 2011; Saur *et al.*, 2019a; Norkunas *et al.*, 2018), ve své diplomové práci jsem však stejně jako ve své bakalářské práci prokázala, že koncentrace 100 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ je dostačující pro úspěšnou agroinfiltraci rostlin *N. benthamiana*. Totéž dokazuje i práce Yuan *et al.* (2011). K agroinfiltraci ječmene jsou využívány zpravidla vyšší koncentrace acetosyringonu mezi 300 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ (Yadav *et al.*, 2012) a 400 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ (Lu *et al.*, 2016). V této diplomové práci byla použita nejvyšší koncentrace 300 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ a nejnižší koncentrace 100 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, nicméně k úspěšné agroinfiltraci ječmene nedošlo.

Druhou použitou metodou byla metoda VOX, při které byl opět použit čtyřpodjednotkový vektor *BSMV*. Při této metodě jsou nejdříve agroinfiltrovány listy *N. benthamiana*, ze kterých je následně vyroben virový homogenát (Cheuk a Houde, 2017; Kanyuka 2022). Následně je provedena buď abraze listů ječmene (Kanyuka, 2022), nebo imbibice semen (Cheuk a Houde, 2017). Agroinfiltrace *N. benthamiana* připravenými virovými konstrukty byla úspěšná a při konfokální fluorescenční mikroskopii byl detekován signál reportérového genu *iLOV*. Virový homogenát byl připraven zvlášť pro metodu imbibice dle Cheuka a Houdeho (2017) a pro metodu listové abraze dle Kanyuky (2022).

Pro optimalizaci metody imbibice byly používány různé koncentrace virového homogenátu:deionizované vody (1:1, 1:10, 1:50, 1:100), jako negativní kontrola sloužily semena GZ1 klíčící ve vodě. Před zasazením semen do substrátu byla pozorována u koncentrace 1:1 snížená klíčivost semen, to mohly zapříčinit dva faktory. Prvním faktorem by mohla být vysoká koncentrace virových částic v roztoku, ve kterém semena klíčila, řešení tohoto problému přináší ve své práci Cheuk a Houde (2017) použitím koncentrace virového homogenátu:deionizované vody 1:100 a při této koncentraci snížení klíčivosti nepozorují. Druhou a v tomto případě pravděpodobnější variantou je negativní vliv fenolických látek, které jsou uvolňovány ze zbytků rostlinné tkáně tabáku. Fenolické látky mohou ovlivňovat klíčivost semen při klíčení na Petriho misce, avšak po jejich zasazení do půdy mohou semena vyrůst obvyklým způsobem (Krogmeier a Bremner, 1989), stejně tomu bylo i v mnou vykonávaných experimentech. Po sedmi dnech od zasazení semen do substrátu proběhla kontrola exprese reportérového genu *iLOV* v listech. Mikroskopie neprokázala expresi genu *iLOV* u žádné ze zasazených rostlin, ačkoliv Cheuk a Houde (2017) ve svých experimentech byli schopni detekovat *iLOV* téměř ve všech buňkách všech rostlin po imbibici, a dokonce byli schopni zaznamenat přenos viru i do další generace.

Listová abraze byla provedena dle postupu uvedeného v práci Kanyuky (2022). Kanyuka (2022) si ve své práci zvolil třípodjednotkový virový vektor *BSMV*, který způsobuje na inokulovaných rostlinách chlorotickou mozaiku. Tato mozaika se objevuje nejdříve 7–10 dní po inokulaci na vrchních neinokulovaných listech rostliny a značí šíření viru rostlinou (Kanyuka, 2022). Kanyuka (2022) sledoval hypersenzitivní odpověď mezi proteinem avirulence Nip1, který pochází z patogenu *Rhynchosporium commune*, a genem rezistence *Rsr1* na rezistentním kultivaru ječmene Atlas 46. Ve svých výsledcích poukazuje na vznik hypersenzitivní odpovědi nejen v inokulovaných částech rostliny již 14 dní po inokulaci. V našem případě nebyla detekována hypersenzitivní reakce ani na inokulovaném listu ani v jiných částech rostliny a nezdařila se ani detekce signálu genu *iLOV* konfokální fluorescenční mikroskopii.

Výsledek imbibice a listové abraze by mohl znamenat, že z neznámého důvodu nemuselo docházet k vytváření virových částic v *N. benthamiana*, nebo že byly virové částice zničeny při přípravě virového homogenátu. Cheuk a Houde (2017) poukazují na tvorbu žlutého zbarvení a mírné strakatosti na vrchní části agroinfiltrovaných listů tabáku sedm dní od agroinfiltrace. Tento fenotyp by měl znamenat

přítomnost a šíření virových částic v rostlině (Cheuk a Houde, 2019) a podobný fenotyp byl zaznamenáván i při mnou prováděných experimentech. Co tedy mohlo za neúspěšný přenos virových částic do rostlin ječmene, není jisté. K úspěšnému vytvoření pohyblivých částic *BSMV* je potřeba všech jeho částí v jedné buňce a k úspěšné tvorbě proteinů z TGB bloku (Jiang *et al.*, 2020). V případě čtyřpodjednotkového *BSMV* se tedy musí všechny podjednotky setkat v jedné buňce, pravděpodobnost takového setkání je tedy v důsledku použití vícero podjednotek snížena. Řešení této situace by mohlo nabídnout použití jednopodjednotkového virového vektoru např. *FoMV*, který by však bylo možné použít jen v případě menších genů.

7 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo připravit virové konstrukty nesoucí kandidátní geny avirulence AVR_{a3} , AVR_{kl} , AVR_{a11} a AVR_{mu} získané analýzou GWAS a následně tyto geny validovat metodou VOX v ječmenných kultivarech.

Kandidátní geny byly klonovány do podjednotky čtyřpodjednotkového BSMV viru, konkrétně do podjednotky $\gamma 2$, která nesla reportérový gen *iLOV*. Konstrukty byly transformovány elektrokompetentní kmeny bakterií *E. coli* a *A. tumefaciens*. Úspěšnost transformace byla ověřena pomocí colony PCR a Sangerovým sekvenováním.

Připravenými bakteriemi *A. tumefaciens* s kandidátními geny a bakteriemi se zbývajícími částmi virového vektoru BSMV α , β a $\gamma 1$ byly agroinfiltrovány listy rostlin *N. benthamiana* a *H. vulgare*. Následně byla provedena kontrola exprese reportérového genu v rostlinách pomocí konfokální fluorescenční mikroskopie 7–10 dní od agroinfiltrace. U rezistentních rostlin *H. vulgare* byla navíc sledována hypersenzitivní reakce, která by mohla být vyvolána interakcí příslušného genu rezistence a kandidátního genu avirulence.

Signál reportérového genu *iLOV* byl zaznamenán u rostlin *N. benthamiana*, a to po infiltraci oběma kmeny bakterií *A. tumefaciens*, EHA105 i AGL1 s jednotlivými podjednotkami vektoru. U rostlin *H. vulgare* nebyl signál genu *iLOV* zaznamenán po infiltraci kmenem bakterií EHA105 ani AGL1 a nebyla zaznamenána ani hypersenzitivní reakce u žádné z kombinací gen rezistence-gen avirulence včetně pozitivní kontroly. V této práci byla k validaci použita i metoda listové abraze, avšak ani s touto metodou se validace kandidátních genů nezdařila. Nezdařila se ani optimalizace metody imbibice.

Neúspěch validace genů avirulence a nepřítomnost hypersenzitivní reakce u pozitivní kontroly mohou znamenat problém se zvoleným virovým vektorem. Tento problém by mohl být vyřešen použitím jiného, nejlépe virového vektoru, který je tvořen jen jednou podjednotkou např. *FoMV*. Další, avšak podstatně náročnějším řešením by mohlo být použití validační metody založené na transformaci ječmenných protoplastů.

8 LITERATURA

- Acevedo-Garcia, J., Walden, K., Leissing, F., Baumgarten, K., Drwiega, K., Kwaaitaal, M., Reinstädler, A., Freh, M., Dong, X., James, G. V., Baus, L. C., Mascher, M., Stein, N., Schneeberger, K., Brocke-Ahmadinejad, N., Kollmar, M., Schulze-Lefert, P., a Panstruga, R. (2022). Barley Ror1 encodes a class XI myosin required for mlo-based broad-spectrum resistance to the fungal powdery mildew pathogen. *The Plant Journal*. <https://doi.org/10.1111/tpj.15930>
- Alfano, J. R., and Collmer, A. (2004). TYPE III SECRETION SYSTEM EFFECTOR PROTEINS: Double Agents in Bacterial Disease and Plant Defense. *Annual Review of Phytopathology*, 42(1), 385–414. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.42.040103.110731>
- Avesani, L., Marconi, G., Morandini, F., Albertini, E., Bruschetta, M., Bortesi, L., Pezzotti, M., a Porceddu, A. (2007). Stability of *Potato Virus X* expression vectors is related to insert size: implications for replication models and risk assessment. *Transgenic Research*, 16(5), 587–597. <https://doi.org/10.1007/s11248-006-9051-1>
- Bai, S., Liu, J., Chang, C., Zhang, L., Maekawa, T., Wang, Q., Xiao, W., Liu, Y., Chai, J., Takken, F. L. W., Schulze-Lefert, P., a Shen, Q. H. (2012). Structure-Function Analysis of Barley NLR Immune Receptor MLA10 Reveals Its Cell Compartment Specific Activity in Cell Death and Disease Resistance. *PLoS Pathogens*, 8(6), e1002752. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002752>
- Bancroft, J. B., Rouleau, M., Johnston, R., Prins, L., a Mackie, G. A. (1991). The entire nucleotide sequence of *Foxtail Mosaic Virus* RNA. *Journal of General Virology*, 72(9), 2173–2181. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-72-9-2173>
- Bauer, S., Yu, D., Lawson, A. W., Saur, I. M. L., Frantzeskakis, L., Kracher, B., Logemann, E., Chai, J., Maekawa, T., a Schulze-Lefert, P. (2021). The leucine-rich repeats in allelic barley MLA immune receptors define specificity towards sequence-unrelated powdery mildew avirulence effectors with a predicted common RNase-like fold. *PLOS Pathogens*, 17(2), e1009223. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009223>
- Bettgenhaeuser, J., Hernández-Pinzón, I., Dawson, A. M., Gardiner, M., Green, P., Taylor, J., Smoker, M., Ferguson, J. N., Emmrich, P., Hubbard, A., Bayles, R., Waugh, R., Steffenson, B. J., Wulff, B. B. H., Dreiseitl, A., Ward, E. R., and Moscou, M. J. (2021). The barley immune receptor Mla recognizes multiple pathogens and contributes to host range dynamics. *Nature Communications*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27288-3>
- Boddy, L. (2016). Pathogens of Autotrophs. *The Fungi*, 245–292. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-382034-1.00008-6>
- Bonas, U. (1998). 5.4 Avirulence Genes. *Methods in Microbiology*, 149–155. [https://doi.org/10.1016/s0580-9517\(08\)70278-2](https://doi.org/10.1016/s0580-9517(08)70278-2)

- Bouton, C., King, R. C., Chen, H., Azhakanandam, K., Bieri, S., Hammond-Kosack, K. E., a Kanyuka, K. (2018, June 7). *Foxtail Mosaic Virus* : A Viral Vector for Protein Expression in Cereals. *Plant Physiology*, 177(4), 1352–1367. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01679>
- Bradshaw, J. E. (2016). *Plant Breeding: Past, Present and Future* (1st ed. 2016 ed.). Springer.
- Bragg, J. N., Lawrence, D. M., a Jackson, A. O. (2004). The N-Terminal 85 Amino Acids of the *Barley Stripe Mosaic Virus* γ b Pathogenesis Protein Contain Three Zinc-Binding Motifs. *Journal of Virology*, 78(14), 7379–7391. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.14.7379-7391.2004>
- Brückner, A., Polge, C., Lentze, N., Auerbach, D., a Schlattner, U. (2009). Yeast Two-Hybrid, a Powerful Tool for Systems Biology. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(6), 2763–2788. <https://doi.org/10.3390/ijms10062763>
- Büschges, R., Hollricher, K., Panstruga, R., Simons, G., Wolter, M., Frijters, A., van Daelen, R., van der Lee, T., Diergaarde, P., Groenendijk, J., Töpsch, S., Vos, P., Salamini, F., and Schulze-Lefert, P. (1997). The Barley Mlo Gene: A Novel Control Element of Plant Pathogen Resistance. *Cell*, 88(5), 695–705. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81912-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81912-1)
- Canto, T. (2016). Transient Expression Systems in Plants: Potentialities and Constraints. *Advanced Technologies for Protein Complex Production and Characterization*, 287–301. https://doi.org/10.1007/978-3-319-27216-0_18
- Catanzariti, A. M., Dodds, P. N., and Ellis, J. G. (2007). Avirulence proteins from haustoria-forming pathogens. *FEMS Microbiology Letters*, 269(2), 181–188. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00684.x>
- Cesari, S., Moore, J., Chen, C., Webb, D., Periyannan, S., Mago, R., Bernoux, M., Lagudah, E. S., a Dodds, P. N. (2016, August 23). Cytosolic activation of cell death and stem rust resistance by cereal MLA-family CC–NLR proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(36), 10204–10209. <https://doi.org/10.1073/pnas.1605483113>
- Dangl, J. L., Horvath, D. M., and Staskawicz, B. J. (2013). Pivoting the Plant Immune System from Dissection to Deployment. *Science*, 341(6147), 746–751. <https://doi.org/10.1126/science.1236011>
- De Block, M., Herrera-Estrella, L., Van Montagu, M., Schell, J., a Zambryski, P. (1984). Expression of foreign genes in regenerated plants and in their progeny. *The EMBO Journal*, 3(8), 1681–1689. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1984.tb02032.x>
- De Cleene, M., a De Ley, J. (1976). The host range of crown gall. *The Botanical Review*, 42(4), 389–466. <https://doi.org/10.1007/bf02860827>

- de Guillen, K., Ortiz-Vallejo, D., Gracy, J., Fournier, E., Kroj, T., and Padilla, A. (2015). Structure Analysis Uncovers a Highly Diverse but Structurally Conserved Effector Family in Phytopathogenic Fungi. *PLOS Pathogens*, 11(10), e1005228. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005228>
- Devoto, A., Piffanelli, P., Nilsson, I., Wallin, E., Panstruga, R., von Heijne, G., a Schulze-Lefert, P. (1999). Topology, Subcellular Localization, and Sequence Diversity of the Mlo Family in Plants. *Journal of Biological Chemistry*, 274(49), 34993–35004. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.49.34993>
- Dodds, P. N., and Rathjen, J. P. (2010). Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics*, 11(8), 539–548. <https://doi.org/10.1038/nrg2812>
- FAOSTAT. (2022). FAOSTAT. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>
- Fields, S., a Song, O. K. (1989). A novel genetic system to detect protein–protein interactions. *Nature*, 340(6230), 245–246. <https://doi.org/10.1038/340245a0>
- Fisher, M. C., Henk, D. A., Briggs, C. J., Brownstein, J. S., Madoff, L. C., McCraw, S. L., and Gurr, S. J. (2012). Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature*, 484(7393), 186–194. <https://doi.org/10.1038/nature10947>
- Freialdenhoven, A., Peterhansel, C., Kurth, J., Kreuzaler, F., a Schulze-Lefert, P. (1996). Identification of Genes Required for the Function of Non-Race-Specific mlo Resistance to Powdery Mildew in Barley. *The Plant Cell*, 5–14. <https://doi.org/10.1105/tpc.8.1.5>
- Gelvin, S. B. (2003). Agrobacterium-Mediated Plant Transformation: the Biology behind the “Gene-Jockeying” Tool. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(1), 16–37. <https://doi.org/10.1128/mnbr.67.1.16-37.2003>
- Giese, H., Holm-Jensen, A. G., Jensen, H. P., and Jensen, J. (1993). Localization of the Laevigatum powdery mildew resistance gene to barley chromosome 2 by the use of RFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 85(6–7), 897–900. <https://doi.org/10.1007/bf00225035>
- Glawe, D. A. (2008). The Powdery Mildews: A Review of the World’s Most Familiar (Yet Poorly Known) Plant Pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 46(1), 27–51. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.46.081407.104740>
- Goelet, P., Lomonosoff, G. P., Butler, P. J., Akam, M. E., Gait, M. J., a Karn, J. (1982). Nucleotide sequence of *Tobacco Mosaic Virus* RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79(19), 5818–5822. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.19.5818>
- Görg, R., Hollricher, K., and Schulze-Lefert, P. (1993). Functional analysis and RFLP-mediated mapping of the Mlgresistance locus in barley. *The Plant Journal*, 3(6), 857–866. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313x.1993.00857.x>

- Gustafson, G., Armour, S., Gamboa, G. C., Burgett, S. G., a 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(2), 370–377. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(89\)90427-3](https://doi.org/10.1016/0042-6822(89)90427-3)
- Gustafson, G., a Armour, S. L. (1986). The complete nucleotide sequence of RNA β from the type strain of *Barley Stripe Mosaic Virus*. *Nucleic Acids Research*, 14(9), 3895–3909. <https://doi.org/10.1093/nar/14.9.3895>
- Gustafson, G., Hunter, B., Hanau, R., Armour, S., a Jackson, A. (1987, June). Nucleotide sequence and genetic organization of *Barley Stripe Mosaic Virus* RNA- γ . *Virology*, 158(2), 394–406. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(87\)90211-x](https://doi.org/10.1016/0042-6822(87)90211-x)
- Haas, B. J., Kamoun, S., Zody, M. C., Jiang, R. H. Y., Handsaker, R. E., Cano, L. M., Grabherr, M., Kodira, C. D., Raffaele, S., Torto-Alalibo, T., Bozkurt, T. O., Ah-Fong, A. M. V., Alvarado, L., Anderson, V. L., Armstrong, M. R., Avrova, A., Baxter, L., Beynon, J., Boevink, P. C., . . . Nusbaum, C. (2009). Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans*. *Nature*, 461(7262), 393–398. <https://doi.org/10.1038/nature08358>
- Haupt, S., Duncan, G. H., Holzberg, S., a Oparka, K. J. (2001, January 1). Evidence for Symplastic Phloem Unloading in Sink Leaves of Barley. *Plant Physiology*, 125(1), 209–218. <https://doi.org/10.1104/pp.125.1.209>
- Harwood, W. A. (2013). A Protocol for High-Throughput *Agrobacterium*-Mediated Barley Transformation. *Methods in Molecular Biology*, 251–260. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-715-0_20
- He, Q., McLellan, H., Hughes, R. K., Boevink, P. C., Armstrong, M., Lu, Y., Banfield, M. J., Tian, Z., and Birch, P. R. J. (2019). *Phytophthora infestans* effector SFI3 targets potato UBK to suppress early immune transcriptional responses. *New Phytologist*, 222(1), 438–454. <https://doi.org/10.1111/nph.15635>
- Horsch, R. B., Fraley, R. T., Rogers, S. G., Sanders, P. R., Lloyd, A., a Hoffmann, N. (1984). Inheritance of Functional Foreign Genes in Plants. *Science*, 223(4635), 496–498. <https://doi.org/10.1126/science.223.4635.496>
- Hückelhoven, R. (2005). Powdery mildew susceptibility and biotrophic infection strategies. *FEMS Microbiology Letters*, 245(1), 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.03.001>
- Chapman, S., Kavanagh, T., a Baulcombe, D. (1992). *Potato Virus X* as a vector for gene expression in plants. *The Plant Journal*, 2(4), 549–557. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1992.t01-24-00999.x>

- Cheuk, A., a Houde, M. (2017). A New *Barley Stripe Mosaic Virus* Allows Large Protein Overexpression for Rapid Function Analysis. *Plant Physiology*, 176(3), 1919–1931. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01412>
- Jackson, A. O., Hunter, B. G., a Gustafson, G. D. (1989). Hordeivirus Relationships and Genome Organization. *Annual Review of Phytopathology*, 27(1), 95–121. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.27.090189.000523>
- Jackson, A. O., Lim, H. S., Bragg, J., Ganesan, U., a Lee, M. Y. (2009). Hordeivirus Replication, Movement, and Pathogenesis. *Annual Review of Phytopathology*, 47(1), 385–422. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080508-081733>
- Jiang, Z., Zhang, K., Li, Z., Li, Z., Yang, M., Jin, X., Cao, Q., Wang, X., Yue, N., Li, D., a Zhang, Y. (2020, July 30). The *Barley Stripe Mosaic Virus* γ b protein promotes viral cell-to-cell movement by enhancing ATPase-mediated assembly of ribonucleoprotein movement complexes. *PLOS Pathogens*, 16(7), e1008709. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008709>
- Jones, J. D. G., a Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444(7117), 323–329. <https://doi.org/10.1038/nature05286>
- Jones, H. D., Doherty, A., a Sparks, C. A. (2009). Transient Transformation of Plants. *Plant Genomics*, 131–152. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-427-8_8
- Jørgensen, I. H. (1992). Discovery, characterization and exploitation of Mlo powdery mildew resistance in barley. *Euphytica*, 63(1–2), 141–152. <https://doi.org/10.1007/bf00023919>
- Jørgensen, J. H., and Wolfe, M. (1994). Genetics of Powdery Mildew Resistance in Barley. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 13(1), 97–119. <https://doi.org/10.1080/07352689409701910>
- Kanyuka, K. (2022). Virus-Mediated Protein Overexpression (VOX) in Monocots to Identify and Functionally Characterize Fungal Effectors. *Methods in Molecular Biology*, 93–112. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2449-4_7
- Keen, N. T. (1990). GENE-FOR-GENE COMPLEMENTARITY IN PLANT-PATHOGEN INTERACTIONS. *Annual Review of Genetics*, 24(1), 447–463. <https://doi.org/10.1146/annurev.ge.24.120190.002311>
- Khan, M., Subramaniam, R., and Desveaux, D. (2016). Of guards, decoys, baits and traps: pathogen perception in plants by type III effector sensors. *Current Opinion in Microbiology*, 29, 49–55. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.10.006>
- Krogmeier, M., a Bremner, J. (1989). Effects of phenolic acids on seed germination and seedling growth in soil. *Biology and Fertility of Soils*, 8(2). <https://doi.org/10.1007/bf00257754>

- Lawrence, D. M., a Jackson, A. O. (2001, September 15). Interactions of the TGB1 Protein during Cell-to-Cell Movement of *Barley Stripe Mosaic Virus*. *Journal of Virology*, 75(18), 8712–8723. <https://doi.org/10.1128/jvi.75.18.8712-8723.2001>
- Lee, W. S., Hammond-Kosack, K. E., a Kanyuka, K. (2012). *Barley Stripe Mosaic Virus*-Mediated Tools for Investigating Gene Function in Cereal Plants and Their Pathogens: Virus-Induced Gene Silencing, Host-Mediated Gene Silencing, and Virus-Mediated Overexpression of Heterologous Protein. *Plant Physiology*, 160(2), 582–590. <https://doi.org/10.1104/pp.112.203489>
- Lindbo, J. A. (2007). TRBO: A High-Efficiency *Tobacco Mosaic Virus* RNA-Based Overexpression Vector. *Plant Physiology*, 145(4), 1232–1240. <https://doi.org/10.1104/pp.107.106377>
- Liu, Z., a Kearney, C. M. (2010). An efficient *Foxtail Mosaic Virus* vector system with reduced environmental risk. *BMC Biotechnology*, 10(1), 88. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-10-88>
- Liu, C., a Nelson, R. S. (2013). The cell biology of *Tobacco Mosaic Virus* replication and movement. *Frontiers in Plant Science*, 4. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00012>
- LOUGHNANE, J. B., a MURPHY, P. A. (1938). Mode of Dissemination of *Potato Virus X*. *Nature*, 141(3559), 120–121. <https://doi.org/10.1038/141120a0>
- Lu, X., Kracher, B., Saur, I. M. L., Bauer, S., Ellwood, S. R., Wise, R., Yaeno, T., Maekawa, T., a Schulze-Lefert, P. (2016). Allelic barley MLA immune receptors recognize sequence-unrelated avirulence effectors of the powdery mildew pathogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(42). <https://doi.org/10.1073/pnas.1612947113>
- Macho, A., a Zipfel, C. (2014). Plant PRRs and the Activation of Innate Immune Signaling. *Molecular Cell*, 54(2), 263–272. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.03.028>
- Maekawa, T., Kufer, T. A., and Schulze-Lefert, P. (2011). NLR functions in plant and animal immune systems: so far and yet so close. *Nature Immunology*, 12(9), 817–826. <https://doi.org/10.1038/ni.2083>
- Marillonnet, S., Giritch, A., Gils, M., Kandzia, R., Klimyuk, V., a Gleba, Y. (2004). In planta engineering of viral RNA replicons: Efficient assembly by recombination of DNA modules delivered by *Agrobacterium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(18), 6852–6857. <https://doi.org/10.1073/pnas.0400149101>
- Mayer, A. (1886). Über die Mosaikkrankheit des Tabaks. *Die Landwirtschaftliche Versuchs-stationen*, 32, 451-467.
- Mei, Y., Zhang, C., Kernodle, B. M., Hill, J. H., a Whitham, S. A. (2016). A *Foxtail Mosaic Virus* Vector for Virus-Induced Gene Silencing in Maize. *Plant Physiology*, pp.00172.2016. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00172>

- Mukhi, N., Gorenkin, D., and Banfield, M. J. (2020). Exploring folds, evolution and host interactions: understanding effector structure/function in disease and immunity. *New Phytologist*, 227(2), 326–333. <https://doi.org/10.1111/nph.16563>
- Nadolska-Orczyk, A., Orczyk, W., a Przetakiewicz, A. (2000). Agrobacterium-mediated transformation of cereals — from technique development to its application. *Acta Physiologiae Plantarum*, 22(1), 77–88. <https://doi.org/10.1007/s11738-000-0011-8>
- Norkunas, K., Harding, R., Dale, J., a Dugdale, B. (2018). Improving agroinfiltration-based transient gene expression in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Methods*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s13007-018-0343-2>
- Palukaitis, P., a Zaitlin, M. (1986). *Tobacco Mosaic Virus* Infectivity and Replication. *The Plant Viruses*, 105–131. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-7026-0_5
- Panstruga, R., and Dodds, P. N. (2009). Terrific Protein Traffic: The Mystery of Effector Protein Delivery by Filamentous Plant Pathogens. *Science*, 324(5928), 748–750. <https://doi.org/10.1126/science.1171652>
- Pedersen, C., van Themaat, E. V., McGuffin, L. J., Abbott, J. C., Burgis, T. A., Barton, G., Bindschedler, L. V., Lu, X., Maekawa, T., Weßling, R., Cramer, R., Thordal-Christensen, H., Panstruga, R., aamp; Spanu, P. D. (2012). Structure and evolution of barley powdery mildew effector candidates. *BMC Genomics*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-694>
- Pennington, H. G., Jones, R., Kwon, S., Bonciani, G., Thieron, H., Chandler, T., Luong, P., Morgan, S. N., Przydacz, M., Bozkurt, T., Bowden, S., Craze, M., Wallington, E. J., Garnett, J., Kwaaitaal, M., Panstruga, R., Cota, E., and Spanu, P. D. (2019). The fungal ribonuclease-like effector protein CSEP0064/BEC1054 represses plant immunity and interferes with degradation of host ribosomal RNA. *PLOS Pathogens*, 15(3), e1007620. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007620>
- Petit-Houdenot, Y., and Fudal, I. (2017). Complex Interactions between Fungal Avirulence Genes and Their Corresponding Plant Resistance Genes and Consequences for Disease Resistance Management. *Frontiers in Plant Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01072>
- Pogue, G. P., Lindbo, J. A., Dawson, W. O., a Turpen, T. H. (1998). Tobamovirus Transient Expression Vectors: Tools for Plant Biology and High-Level Expression of Foreign Proteins in Plants. *Plant Molecular Biology Manual*, 67–93. https://doi.org/10.1007/978-94-011-5242-6_5
- Robertson, N. L., French, R., a Morris, T. J. (2000). The open reading frame 5A of *Foxtail Mosaic Virus* is expressed in vivo and is dispensable for systemic infection. *Archives of Virology*, 145(8), 1685–1698. <https://doi.org/10.1007/s007050070084>
- Rouxel, T., and Balesdent, M. H. (2010). Avirulence genes. *ELS*. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0021267>

- Sato, K. (2020). History and future perspectives of barley genomics. *DNA Research*, 27(4). <https://doi.org/10.1093/dnares/dsaa023>
- Saur, I. M., Bauer, S., Kracher, B., Lu, X., Franzeskakis, L., Müller, M. C., Sabelleck, B., Kümmel, F., Panstruga, R., Maekawa, T., and Schulze-Lefert, P. (2019a). Multiple pairs of allelic MLA immune receptor-powdery mildew AVR effectors argue for a direct recognition mechanism. *eLife*, 8. <https://doi.org/10.7554/elife.44471>
- Saur, I. M. L., Bauer, S., Lu, X., and Schulze-Lefert, P. (2019b). A cell death assay in barley and wheat protoplasts for identification and validation of matching pathogen AVR effector and plant NLR immune receptors. *Plant Methods*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s13007-019-0502-0>
- Schiffer, R., Görg, R., Jarosch, B., Beckhove, U., Bahrenberg, G., Kogel, K. H., and Schulze-Lefert, P. (1997). Tissue Dependence and Differential Cordycepin Sensitivity of Race-Specific Resistance Responses in the Barley—Powdery Mildew Interaction. *Molecular Plant-Microbe Interactions®*, 10(7), 830–839. <https://doi.org/10.1094/mpmi.1997.10.7.830>
- Schulze-Lefert, P., and Vogel, J. (2000). Closing the ranks to attack by powdery mildew. *Trends in Plant Science*, 5(8), 343–348. [https://doi.org/10.1016/s1360-1385\(00\)01683-6](https://doi.org/10.1016/s1360-1385(00)01683-6)
- SOLOVYEV, A., SAVENKOV, E., AGRANOVSKY, A., and MOROZOV, S. (1996). Comparisons of the Genomic cis-Elements and Coding Regions in RNA β Components of the Hordeiviruses *Barley Stripe Mosaic Virus*, *Lychnis Ringspot Virus*, and *Poa Semilatifolius Virus*. *Virology*, 219(1), 9–18. <https://doi.org/10.1006/viro.1996.0217>
- Spanu, P. D., Abbott, J. C., Amselem, J., Burgis, T. A., Soanes, D. M., Stüber, K., Loren van Themaat, E. V., Brown, J. K., Butcher, S. A., Gurr, S. J., Lebrun, M.-H., Ridout, C. J., Schulze-Lefert, P., Talbot, N. J., Ahmadinejad, N., Ametz, C., Barton, G. R., Benjdia, M., Bidzinski, P., ... Panstruga, R. (2010). Genome expansion and gene loss in powdery mildew fungi reveal tradeoffs in extreme parasitism. *Science*, 330(6010), 1543–1546. <https://doi.org/10.1126/science.1194573>
- Stergiopoulos, I., and de Wit, P. J. (2009). Fungal Effector Proteins. *Annual Review of Phytopathology*, 47(1), 233–263. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.112408.132637>
- Takken, F. L. W., and Goverse, A. (2012). How to build a pathogen detector: Structural basis of Nb-LRR function. *Current Opinion in Plant Biology*, 15(4), 375–384. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2012.05.001>
- The International Barley Genome Sequencing Consortium. (2012). A physical, genetic and functional sequence assembly of the Barley Genome. *Nature*, 491(7426), 711–716. <https://doi.org/10.1038/nature11543>

- Tilsner, J., Linnik, O., Louveaux, M., Roberts, I. M., Chapman, S. N., a Oparka, K. J. (2013). Replication and trafficking of a plant virus are coupled at the entrances of plasmodesmata. *Journal of Cell Biology*, 201(7), 981–995. <https://doi.org/10.1083/jcb.201304003>
- Verchot, J. (2021). *Potato Virus X*: A global potato-infecting virus and type member of the Potexvirus genus. *Molecular Plant Pathology*, 23(3), 315–320. <https://doi.org/10.1111/mpp.13163>
- Verchot-Lubicz, J., Torrance, L., Solovyev, A. G., Morozov, S. Y., Jackson, A. O., a Gilmer, D. (2010). Varied Movement Strategies Employed by Triple Gene Block–Encoding Viruses. *Molecular Plant-Microbe Interactions®*, 23(10), 1231–1247. <https://doi.org/10.1094/mpmi-04-10-0086>
- Wang, J., and Chai, J. (2020). Structural Insights into the Plant Immune Receptors PRRs and NLRs. *Plant Physiology*, 182(4), 1566–1581. <https://doi.org/10.1104/pp.19.01252>
- Wei, F., Gobelman-Werner, K., Morroll, S. M., Kurth, J., Mao, L., Wing, R., Leister, D., Schulze-Lefert, P., and Wise, R. P. (1999). The Mla (Powdery Mildew) Resistance Cluster Is Associated With Three NBS-LRR Gene Families and Suppressed Recombination Within a 240-kb DNA Interval on Chromosome 5S (1HS) of Barley. *Genetics*, 153(4), 1929–1948. <https://doi.org/10.1093/genetics/153.4.1929>
- Yadav, T., Kothari, S. L., a Kachhwaha, S. (2012). Optimization of Agrobacterium-Mediated Genetic Transformation and Regeneration of Transgenic Plants in Indian Cultivar of Barley (*Hordeum vulgare* L. cv. BL 2). *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 83(2), 255–264. <https://doi.org/10.1007/s40011-012-0115-0>
- Yuan, C., Li, C., Yan, L., Jackson, A. O., Liu, Z., Han, C., Yu, J., a Li, D. (2011). A High Throughput *Barley Stripe Mosaic Virus* Vector for Virus Induced Gene Silencing in Monocots and Dicots. *PLoS ONE*, 6(10), e26468. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026468>
- Zhang, X., Farah, N., Rolston, L., Ericsson, D. J., Catanzariti, A., Bernoux, M., Ve, T., Bendak, K., Chen, C., Mackay, J. P., Lawrence, G. J., Hardham, A., Ellis, J. G., Williams, S. J., Dodds, P. N., Jones, D. A., and Kobe, B. (2017). Crystal structure of the *Melampsora lini* effector AvrP reveals insights into a possible nuclear function and recognition by the flax disease resistance protein P. *Molecular Plant Pathology*, 19(5), 1196–1209. <https://doi.org/10.1111/mpp.12597>
- ZHANG, Z., HENDERSON, C., PERFECT, E., CARVER, T. L. W., THOMAS, B. J., SKAMNIOTI, P., and GURR, S. J. (2005). Of genes and genomes, needles and haystacks: *Blumeria graminis* and functionality. *Molecular Plant Pathology*, 6(5), 561–575. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2005.00303.x>
- Zipfel, C. (2008). Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. *Current Opinion in Immunology*, 20(1), 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2007.11.003>