

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA**

Studijní program: N4101 Zemědělské inženýrství

Studijní obor: Rostlinné biotechnologie

Katedra: Rostlinné výroby a agroekologie

DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Virocidní účinnost ribavirinu a acyklických nukleosid fosfonátů na virus
žluté mozaiky vodnice**

Vedoucí diplomové práce:

Prof. Ing. Josef Špak, DrSc.

Mrázková

Autor:

Ivana

2010

Tato práce byla vypracována na Ústavu molekulární biologie rostlin Biologického centra AVČR v.v.i. a financována z grantů 522/09/0707 Grantové agentury České republiky, AV0Z50510513 Akademie věd České republiky AVČR v.v.i. a výzkumného projektu OZ40550506 Ústavu organické chemie a biochemie AVČR v.v.i.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce a to v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Zemědělskou fakultou, elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích 25. dubna 2010

.....

Poděkování

Tímto způsobem chci poděkovat především vedoucímu mé diplomové práce Prof. Ing. Josefu Špakovi, DrSc. za odborné vedení, cenné rady a trpělivost při zpracování tohoto tématu.

Děkuji RNDr. Vlastimile Špakové, RNDr. Pavingerové Daniele, CSc. za ochotu a praktickou pomoc při řešení některých úkolů. Také RNDr. Ivě Dostálkové, PhD. za konzultace při zpracování statistických dat.

Zároveň také děkuji mé rodině a přátelům za všestrannou podporu během celého studia.

Anotace

Byla vyvinuta nová metoda na testování protivirových sloučenin proti rostlinným virům. Tato metoda je založena na rychle rostoucích brukvovitých rostlinách *in vitro* podmínkách v kapalném mediu. Zjišťovali jsme fytotoxicitu a protivirovou účinnost ribavirinu a účinnost acyklických nukleosid fosfonátů (R)-PMPA, PMEa, PMEDAP a (S)-HPMPC na virus žluté mozaiky vodnice. Pro zjištění relativní koncentrace viru v rostlině jsme použili metodu Double sandwich ELISA. Ribavirin měl nejsilnější protivirový účinek. (R)-PMPA a PMEa nevykazovaly žádný protivirový účinek a téměř žádnou fytotoxicitu ve srovnání s kontrolními rostlinami. (S)-HPMPC a PMEDAP vykazovaly mírné protivirové účinky, ale zároveň i vyšší fytotoxicitu.

KLÍČOVÁ SLOVA: Virus žluté mozaiky vodnice; Chemoterapie; Ribavirin; Brassica

Annotation

A new method was developed for testing antiviral compounds against plant viruses based on rapidly growing brassicas *in vitro* on liquid medium. While using ribavirin as a standard for comparison, phytotoxicity and ability of the acyclic nucleotide analogues (R)-PMPA, PMEa, PMEDAP, and (S)-HPMPC to eliminate ssRNA Turnip yellow mosaic virus (TYMV) were evaluated by this method. Double antibody sandwich ELISA was used for relative quantification of viral protein in plants. Ribavirin had the most powerful antiviral effect against TYMV. On the other hand, (R)-PMPA and PMEa had no antiviral effect and almost no phytotoxicity compared to the control. (S)-HPMPC and PMEDAP showed moderate antiviral effect, accompanied by higher phytotoxicity.

KEYWORDS: Turnip yellow mosaic virus; Chemotherapy; Ribavirin; Brassica

OBSAH

1. ÚVOD	7
2. CÍL PRÁCE	9
3. LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	10
3.1 Charakteristika rostlinných virů	10
3.2 Popis TYMV.....	10
3.3 Chemoterapie rostlinných virů	11
3.4 Metoda ELISA.....	14
3.5 Charakteristika použitých protivirových látek.....	15
4. MATERIÁLY A METODY	18
4.1 Kultivace rostlin.....	18
4.2 Inokulace rostlin virem TYMV	19
4.3 Příprava živného roztoku MS s protivirovými látkami	19
4.4 Pufry, roztoky, pracovní přístroje.....	20
4.4.1 Pufry a roztoky	20
4.4.2 Pracovní přístroje.....	23
4.5 Stanovení obsahu viru metodou ELISA	24
4.6 Statistické hodnocení dat	27
4.7 Časové schéma pokusů	28
5. VÝSLEDKY	29
6. DISKUSE.....	34
7. ZÁVĚR	36
8. LITERATURA.....	37
9. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	42
10. PŘÍLOHY	44

1. Úvod

Virózy patří po mykózách k ekonomicky nejzávažnějším chorobám rostlin a u některých plodin je dokonce předčí svou zákeřností a výší způsobených škod. V podmínkách střední Evropy jsou viry původci téměř 10% všech ekonomicky významných chorob a působí přibližně 30% všech ztrát. Vážné důsledky mají zvláště u vegetativně rozmnožovaných a vytrvalých rostlin.

Základem ochrany proti rostlinným virům je výsadba zdravého materiálu. Vysazení zdravého, viruprostého materiálu nám však ještě nemusí zaručit, že během několika málo let nedojde k infikování porostu.

Úspěšná ochrana proti rostlinným virům je nemyslitelná bez přesné diagnózy viru a bez důkladných znalostí způsobů, jimiž se jednotlivé viry přenášejí. Přestože v poslední době byly vypracovány různé metody, jimiž lze s větším či menším úspěchem léčit nakažené rostliny, využívají se tyto terapeutické metody dosud málo v praxi vzhledem k nákladnosti a často i omezenému účinku (Čača, 1981).

Nepřímé metody ochrany jsou zaměřeny hlavně na:

1. Likvidaci nebo jiné eliminaci zdroje nákazy (např. negativní výběr, hubení rezervoárových rostlin a plevelů).
2. Zábranu nebo alespoň omezení všech možných způsobů přenosu virů z infekčních zdrojů (boj proti vektorům, omezení zraňování rostlin při kultivaci).
3. Zábranu pronikání viru z napadených vegetativních částí do reprodukčních orgánů (např. předčasné ukončení vegetace).
4. Ovlivnění vývinu rostlin za účelem uniknutí nebo odolávání nákaze (např. úprava doby výsevu či výsadby, předkličování bramborových hlíz aj.)
5. Pěstování odolných nebo viruprostých rostlin (Kůdela, 1989).

Vlastní metody, jimiž se dosahuje těchto cílů, mohou být různé: agrotechnické, šlechtitelské, biologické, metody chemické ochrany, karanténní opatření aj. Mnohá z těchto opatření mají účinek vymezený jen určitými podmínkami, takže musí být vhodně kombinována s jinými metodami. Z přímých metod se v některých odvětvích, zvláště v ovocnářství a zelinářství, uplatňuje termoterapie a v některých případech i meristémová terapie (tzv. biologická terapie), vycházející z kultur apikálních meristémů, popř. kombinace obou těchto metod, jejichž cílem je získat viruprostý materiál. Ať již

se viruprostý materiál získá terapeutickými metodami nebo výběrem, je vždy třeba jej kontrolovat rozsáhlým testováním, které dále prodražuje výrobu bezvirové sadby (Urban, 1983).

Další možnost produkce bezvirozního materiálu je aplikace protivirových látek. Rostlinná chemoterapie učinila mnohem menší pokrok v posledních dvou desetiletích než výzkum v oblasti rostlinné molekulární virologie. Důvodem může být velmi rychlý rozvoj molekulární biologie rostlin zaměřený na studium na molekulární interakce virus-rostlina a důvěra v získanou odolnost rostlin, expresí rostlinných nebo od virů odvozených genů. Nicméně slibné strategie pro antivirové rezistence transgenních rostlin (Prins et al., 2008) jsou dosud omezeny přísnými předpisy a špatným společenským přijetím geneticky modifikovaných organismů v Evropě.

Tradiční přístupy šlechtění odolných plodin jsou časově náročné a omezené přírodními zdroji rezistence (Maule et al., 2007). Proto testování nově syntetizovaných sloučenin nebo látek účinných v lidské či veterinární medicíně by mohlo přinést pokrok, i když jejich účinky proti rostlinným virům mohou být odlišné. V poslední době, Xia et al. (2006) syntetizoval některé sloučeniny, které jsou účinnější proti rostlinnému RNA viru mozaiky tabáku (TMV) než ribavirin. Není pochyb o tom, že antivirové sloučeniny budou používány pro výrobu viruprostého materiálu i v budoucnu. Pennazio (1997) došel k závěru, že chemoterapie nabízí široké možnosti pro zlepšení léčbě viróz na rozdíl od konvenční terapie (termoterapie *in vitro* kultury), kterou bude obtížné dále zlepšit.

2. Cíl práce

Cílem této diplomové práce je zhodnocení účinnosti ribavirinu a acyklických nukleosid fosfonátů na virus žluté mozaiky vodnice. Pojednává o prvních výsledcích chemoterapie pomocí acyklických nukleosid fosfonátů a ověřuje účinnost ribavirinu proti viru žluté mozaiky vodnice u *in vitro* kultur na pekingském zelí. Dále se zabývá hodnocením fytotoxicity použitých antivirotik.

3. Literární přehled

3.1 Charakteristika rostlinných virů

Většina virů napadající rostliny patří z hlediska velikosti virionů, genomů a jeho organizace mezi nejjednodušší viry vůbec. Viriony sférického, tyčinkovitého anebo vláknitého tvaru mají jednoduchý kapsid složený z 1-4 druhů proteinů (Davies, 1985).

Rozvojem metod molekulární genetiky bylo umožněno odhalení replikačních strategií rostlinných virů na buněčné i molekulární úrovni. Následkem toho dochází i v současné době k neustálému zpřesňování taxonomie rostlinných virů (Žemla et al., 1998).

Uplatňuje se dělení jednotlivých virů do rodů, které se sdružují do čeledí a to přinejmenším na základě genomu a replikační strategie. Některé viry doposud nebyly začleněny do čeledí a popisují se samostatně. Druhovému názvu rostlinných virů obvykle popisují symptomy chorob, které vyvolávají a hostitelské rostliny, ze kterých byly rostlinné viry izolovány. Dosud je popsáno asi 1800 rostlinných virů využívajících jednu z nukleových kyselin (dsDNA, ssDNA, dsRNA, -ssRNA, +ssRNA) (Ramirez-Malagon et al., 2006). Převážná většina rostlinných virů má RNA genom, který je také výlučně ssRNA s pozitivní polaritou (Žemla et al., 1998).

3.2 Popis TYMV

Turnip yellow mosaic virus viz příloha č. 1, patří do rodu *Tymovirus*. Známé spektrum hostitelských rostlin je omezeno na tyto druhy *Cruciferae*, *Brassica* ssp, *Reseda odorata* (*Resedaceae*), *Cleome spinosa* (*Capparodaceae*) (Adams & Antoniw 2006). Velké škody způsobuje na pekingském zelí. Příznaky se projevují na listech jako jasně ohraničené zelenožluté mozaiky a to především u druhů *Brassica*, ostatní řády se vyznačují mírnějšími příznaky. Virus je nalézán ve všech částech hostitelských rostlin, včetně apikálního meristému. Množí se v cytoplazmě buněk, kde způsobuje shlukování chloroplastů, které je snadno pozorovatelné pomocí světelné mikroskopie (Büchen-Osmond, 2003). Optimální teplota pro rozvoj viru se pohybuje v rozmezí 20-25 °C.

Kompletní genom je tvořen 6319 nukleotidy. Byl plně osekvenován. Genom se skládá z podílů guanin 17,6%, adenin 23,75%, cytosin 37,05%, uracil 22,15%. Na 5'-konci genomu je umístěna čepička, sekvence typu m7G5'ppp5 (Matthews, 1980). 3'-konec má strukturu promotoru, oblast známá jako "tymobox" (Büchen-Osmond, 2003). Genom je tvořený monopartitní +ssRNA. Infekční jednotky mají jednoduchou konstrukci, bez obalu a s izometrickými částicemi. Izometrický kapsid viru je neobalený, kulatý s kubickou symetrií. Jeho průměr je 29,2 – 31,8 nm s hmotností $5,6 \times 10^6$ daltonů.

Virus je přenášen prostřednictvím hmyzích vektorů, mechanicky, semeny, roubováním a není přenosný pylem. Z vektorů jsou to následující rody *Coleoptera*, *Phyllotreta* a *Psylloides* (*Phaedon cochleariae*) v Evropě a *Pedilophorus sp* v Austrálii (Büchen-Osmond, 2003).

3.3 Chemoterapie rostlinných virů

Chemoterapie rostlinných virů byla definována jako produkce bezvirozního materiálu z infikovaných rostlin. Eliminace viru je často založena na termoterapii celých rostlin nebo rostlinných explantátů. Následuje oddělení meristémového vrcholu a jeho kultivace v *in vitro* podmínkách na médiu s nebo bez antivirových látek, často v sérii 3-5 pasáží viz příloha č. 2.

Termoterapie a chemoterapie mohou být prováděny současně. Úspěšnost odstranění viru je ověřována pomocí ELISA nebo PCR testem po dobu několika měsíců či dokonce let (Verma et al., 2005).

Možná fytoxicita antivirových sloučenin vyžaduje test, který stanoví optimální poměr mezi eliminací viru a procentem živých explantátů.

Viruprostý materiál získaný z meristémových kultur obecně vykazuje malý nebo žádný genetický rozdíl od původní infikované rostliny. Antivirotika by mohla způsobit genetickou variabilitu, prozatím to není vědecky podloženo (Špak, 2009).

Historii rostlinné chemoterapie shrnul Pennazio (1997) a Faccioili a Marani (1998), kteří se zabývali eliminací rostlinných virů v *in vitro* kulturách. Z literatury je zřejmé, že zatím není známa ideální chemická látka ani ideální metoda.

Dosud bylo popsáno více než 1800 rostlinných virů, využívající jednu z těchto nukleových kyselin (dsDNA, ssDNA, dsRNA, +ss RNA, -ss RNA) a s různou replikační

strategií. Mohou infikovat velké množství rostlinných čeledí, rodů, druhů a kultivarů, vytvářet různé anatomické a biochemické variace v systému rostlina-virus a vyvolávat tkáňové infekce (Ramirez-Malagon et al., 2006). Proto je porovnávání mezi získanými výsledky mnoha látek, které byly testovány na různých rostlinách, virech a různými metodami, obtížné. Nedostatek standardizace experimentální metodiky pro inhibici virů rostlin chemickými látkami může vést k protichůdným závěrům. Z přehledu metod Hansen (1989) (např. purifikace viru, protoplastů nakažených virem, postřik antivirotik na listy nebo dokonce na celé rostliny, disková metoda, léčba kalusu, meristematické ošetření, injekce do celé rostliny nebo aplikace na kořeny), se zdá, že obecně dochází ke zvýšení specifičnosti inhibiční reakce s rostoucí mírou organizace rostlinných tkání.

Bylo zjištěno, že nejúčinnější pro odstranění viru jsou syntetické inhibitory (Hansen, 1989). Mezi nimi analogy bází nukleových kyselin ribavirin, tiazofurin, pyrazofurin, 8-azaguanin, 5-azauracil, deriváty adeninu jako (RS)-3-adenin-9-yl-2-hydroxypropionová kyselina (De Fazio et al., 1990) a 9-(2,3-dihydroxypropyl) adenin [(S)-DHPA] (Schuster & Holý, 1988) byly nejintenzivněji prostudovány a některé z nich jsou také prakticky používány v zemědělství. Pannattoni et al., (2007) oznámili úspěšné odstranění GLRaV-3 z explantátů *Vitis vinifera* tiazofurinem. U ribavirinu (1-(β -D-Ribofuranosyl)-1H-1,2,4-triazol-3-karboxamid) bylo zjištěno, že je účinný nejméně proti 20 rostlinným virům. Viruprosté prýty mohou být získány z meristému sloučením 20-50 mg / l směsi do média. Nedávné studie obvykle zahrnují i testování jiných sloučenin (Verma et al., 2005), ale zdá se, že ribavirin přináší nejlepší výsledky proti rostlinným RNA virům, které představují 88% virů napadajících rostliny. V nedávné době byly získány velmi pozitivní výsledky s ribavirinem ve Výzkumném a šlechtitelském ústavu ovocnářském s.r.o. v Holovousech, pro odstranění komplexu virové infekce z jablek (Paprštein et al., 2007).

Pokud jde o rostlinné DNA viry, našli jsme pouze jeden záznam (Caner et al., 1985), kde byl ribavirin neúčinný proti ssDNA viru.

Spolupráce mezi profesorem A. Holým (ÚOCHB AV ČR, Praha) a profesorem E. de Clercqem (Rega institut pro lékařský výzkum, Leuven, Belgie), vedla k objevu řady acyklických analogů nukleosidů (prototyp (S)-DHPA) a následně k objevu velkého počtu nukleotidových analogů (acyklické nukleosidy fosfonáty - ANPs, prototyp (S)-H(R)-PMPA).

Od (S)-H(R)-PMPA(9-[(S)-3-hydroxy-2 (phosphonomethoxy) propyl] adenine byly odvozeny tři látky, které byly na celém světě schváleny pro klinické použití:

1) (S)-HPMPC (1 - [(S)-3-hydroxy-2-(phosphonomethoxy) propyl] cytosin)
Cidofovir, Vistide[®] pro léčbu cytomegalovirové renitis u pacientů s AIDS a léčbu polyoma-, papilom-, adeno-, herpes-a poxvirus infekce (dsDNA genom virů)

2) PME A (9 - [2 - (phosphonomethoxy) ethyl] adenine, Adefovir, Hepsera[®]) pro léčbu chronické infekce virem hepatitidy (dsDNA genom virů)

3) (R)-PMPA (9 - [(R) -2 - (phosphonomethoxy) propyl])[®] adenine, Tenofovir, Viread[®] pro léčbu HIV (retrovirus) infekce.

Žádné z těchto látek nebyly doposud testovány na inhibici RNA polymerázy. Hodnocení aktivity ANPs proti rostlinným virům navrhl profesor Antonín Holý.

3.4 ELISA

ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) je jednou z nejpoužívanějších metod ve virové diagnostice. Princip této metody spočívá v reakci antigenu s protilátkou, která je značena enzymem (alkalická fosfatáza), (Kůdela et al., 2002). Dochází k barevné změně, která je způsobena reakcí enzymu se substrátem. Na mikrotitrační destičku se naváže specifická protilátka IgG, na kterou se poté naváže antigen, virus přítomný ve zkoumaném materiálu. Po přidání konjugátu protilátek s enzymem a substrátu vznikne barevná reakce, kterou detekujeme spektrofotometricky. Čas potřebný pro diagnostiku je několik hodin až dva dny (Nečas & Krška 2006). Běžně používanou variantou ELISA testu je v rostlinné virologii DAS-ELISA test (double antibody sandwich) viz příloha č. 3, kde antigen nejdříve reaguje se specifickými protilátkami navázanými na povrch pevného nosiče a je pak detekován specifickými protilátkami značenými enzymem, který v případě pozitivního vzorku zviditelní reakci rozkladem vhodného chromogenního substrátu. Pomocí tohoto testu lze získat údaje o sérologické příbuznosti izolátů virů a relativní či celkové koncentraci viru v rostlině nebo její části. Ve všech případech je výstupní informací provedeného ELISA testu soubor hodnot absorbance.

Antigen

Antigeny jsou makromolekuly přirozeného nebo umělého původu. Po chemické stránce se řadí mezi různé polymery proteinů, polypeptidů, polysacharidů nebo nukleoproteinů. Mají dvě základní vlastnosti - navozují specifickou imunitní odpověď, ať buněčného nebo protilátkového typu, a specificky reagují s produkty této odpovědi (tj. protilátkami a imunokompetentními buňkami). Obě tyto vlastnosti má kompletní antigen - imunogen, který je tvořen z makromolekulového nosiče a antigenních determinant neboli epitopů. Antigenní determinantu představuje určitá skupina atomů na povrchu molekuly antigenu a charakterizuje jeho specifitu a schopnost reagovat s vazebným místem protilátky nebo antigenovým receptorem na lymfocytech. Nízkomolekulová látka, která nemůže sama navodit tvorbu protilátek, ale specificky reaguje s produkty imunitní odpovědi, se označuje jako haptén (nekompletní antigen) (Lapčík et al., 2004).

Protilátka

Je protein, který je schopen jako součást imunitního procesu identifikovat a zneškodnit cizí objekty v těle. Protilátky jsou nositeli humorální imunity.

Polyklonální protilátky

Jsou produktem mnoha aktivovaných klonů B lymfocytů a proto jsou namířeny proti více epitopům určitého antigenu nebo směsi antigenů. Získávají se imunizací laboratorních zvířat antigenem (nebo jejich směsí). Při imunizaci organismu dochází ke stimulaci různých B lymfocytů a k jejich proliferaci a diferenciaci na plazmatické buňky. Je produkováno spektrum protilátek proti různým epitopům příslušné bílkoviny s různou schopností se na ni vázat. Po úspěšné imunizaci se zvířeti odebere sérum či ascites obsahující protilátky proti původnímu imunogenu. Specifita polyklonálních protilátek velice závisí na imunizačním protokolu, resp. na tom, v jaké fázi imunitní odpovědi zvířete jsou z něj protilátky získávány (Tonar & Beranová 2002).

3.5 Charakteristika protivirových látek

Ribavirin

(1 - (β -D-Ribofuranosyl)- 1H-1, 2, 4-triazol-3-karboxamid) je účinný nejméně proti 20 rostlinným virům. Zdá se, že ribavirin přináší nejlepší výsledky proti rostlinným RNA virům, které představují 88% virů napadajících rostliny. V nedávné době byly získány velmi pozitivní výsledky s ribavirinem ve Výzkumném a šlechtitelském ústavu ovocnářském s.r.o. v Holovousech, pro odstranění komplexu virové infekce z jabloní (Paprštein et al., 2007). Příklad ribavirinu do kultivačních médií byl úspěšně využit pro eliminaci různých virů u bramboru a tabáku (Faccioli a Marani 1998, Horáčková 1998). Chemoterapie ribavirinem byla také s pozitivními výsledky použita při eliminaci viru chlorotické skvrnitosti jabloně (*Apple chlorotic leaf spot virus, ACLSV*) v *in vitro* kulturách (Hasen & Lane 1985) a hrušně (Cieslinska, 2002) a při eliminaci viru žlábkovitosti kmene jabloně (*Apple stem grooving virus, ASGV*) u *in vitro* kultur tabáku a jabloně (James et al., 1997). Janečková (1993) dosáhla kombinací segmentové kultury *in vitro* chemoterapie ribavirinem eliminaci hospodářsky závažných virů slivoně.

Acyklické nukleosidfosfonáty

Spolupráce mezi profesorem A. Holým (ÚOCHB AV ČR, Praha) a profesorem E. de Clercqem (Rega institut pro lékařský výzkum, Leuven, Belgie) vedla k objevu řady acyklických analogů nukleosidů (prototyp (S)-DHPA) následně objevením velkého počtu nukleotidových analogů (acyklické nukleosid fosfonáty - ANPs), prototyp (S)-HPMPA). Od (S)-PMPA (9-[(S)-3-hydroxy-2-(phosphonomethoxypropyl)] byly odvozeny látky, které byly na celém světě schváleny pro klinické použití.

Acyklické nukleosid fosfonáty jsou katabolicky stabilní sloučeniny. Po chemické stránce viz níže popsany vzorec (Votruba, 2009).

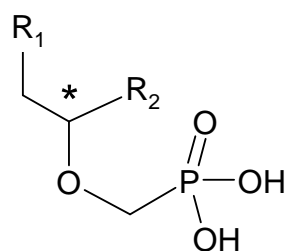
R₂....H.....PMEA

R₂....CH₂OH(S)-HPMPC

R₂....CH₃.....(R)-PMPA

R₂...H.....PMEDAP

R₁....Pu nebo Py



PMEA

Je účinný proti retrovirům včetně HIV, který způsobuje onemocnění AIDS (Hejtink et al., 1993, Ying et al., 2000). Tato skupina acyklických nukleotidů též potlačuje replikaci DNA virů. PMEA (9-(2-phosphonylmethoxyethyl) adenine, adefovir a od ní odvozené orální profarmakum bis (POM)-PMEA jsou účinné i proti hepatitidě B. Lék pod názvem (Hepsera™) byl nedávno v USA a Evropě schválen pro léčbu chronické hepatitidy B (Hejtink et al., 1993, Ying et al., 2000).

(S)-HPMPC

N-[3-hydroxy-2-(fosfonomethoxy)propyl] deriváty (HPMP sloučeniny) selektivně inhibují: DNA viry, tj. herpesviry (HSV, CMV, VZV, EBV), adenoviry, poxviry, polyoma- a papilomaviry. Cytosinový derivát této řady - [(S)-HPMPC, cidofovir, Vistide®] – je v klinickém použití proti CMV infekcím u AIDS pacientů. Látka se jeví jako velmi účinná též k léčbě papilomatosy hrtanu, moluscum contagiosum i HPV indukované intraepiteliální neoplasie děložního hrdla.

(R)-PMPA

N-[2-(Fosfonomethoxy)propyl] deriváty (PMP sloučeniny)-(2-phosphonylmethoxypropyl) adenine ((R)-PMPA, tenofovir) (Heijntink et al., 1993; Ying et al., 2000a,b) patří mezi nejúčinnější od nukleosidů odvozené antiretrovirální látky vůbec: Tenofovir [(R)-PMPA, Viread®] je účinný proti HIV a HBV. V USA i v Evropě již byl schválen jako lék.

PMEDAP

9 - (2-Phosphonomethoxyethyl) - 2,6- diaminopurin. Je silný inhibitor replikace viru lidské imunodeficiencie (HIV) a potlačuje tvorbu nádorů (Compton et al., 1999).

Mechanismy účinku acyklických nukleosidfosfonátů

1) Vznik NDP a NTP analogů *in vitro*

Biologicky účinné ANP typu PME, PMP a HPMP jsou fosforylovány výlučně prostřednictvím izozymů nukleotidkinas: AMP-kinasy, GMP-kinasy, CMP-kinasy, NDP -kinasy.

2) Protivirové a cytostatické účinky

Zásah acyklických nukleosidfosfonátů do DNA syntézy (jde o substrát-inhibitory):

- (a) kompetitivní inhibice DNA-polymerázy (resp. RT)
- (b) inkorporace do DNA vedoucí k částečnému prodloužení řetězce (analogy typu HPMP) nebo k terminaci (analogy typu PME)
- (c) produkty reakce jsou rovněž inhibitory enzymu.

3) Blokování (inhibice) replikace viru

Inkorporace (včlenění) do genomové DNA a disociace (štěpení) replikačního komplexu v důsledku náhodné akumulace analogu aktivují kontrolní body S-fáze buněčného cyklu, což vede k apoptose (buněčné smrti), (Votruba, 2009).

4. Materiály a metody

Při své práci jsem dodržovala zásady bezpečnosti práce, organizační řád ÚMBR BC AV ČR, interní směrnice oddělení virologie.

4.1. Kultivace rostlin

K pokusu jsme použili pekingské zelí (*Brassica oleracea var. pekinensis*), odrůda Manoko F1. Výsev semen a kultivace rostlin byly prováděny v magentách, viz. příloha č. 4. Do kultivační nádoby jsme vložili filtrační papír, který sloužil jako opora. Jako živnou půdu jsme použili základní tekuté médium Murashige a Skoog (MS) s vitamíny (2,0 mg / l glycin, 100 mg / l myo-inositol, 0,5 mg / l kyselina nikotinová, 0,5 mg / l pyridoxin a 0,1 mg / l thiamin) a 20 g / l sacharózy (Murashige a Skoog, 1962) bez růstových regulátorů. Do MS jsme přidali testované protivirové látky. Po 3 týdnech jsme provedli výměnu živného média za nové. Kultivace probíhala za podmínek 23 °C, fotoperioda 16 hod., intenzita osvětlení 90 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ v kultivační místnosti. Veškeré manipulace s rostlinami jsme prováděli za sterilních podmínek ve flowboxu.

Sterilizace semen

Ke sterilizaci jsme použili roztok SAVA, v poměru SAVO:H₂O = 1:9. Doba působení byla 10 minut, během této doby bylo nutné zkumavky se semeny několikrát protřepat. Poté jsme semena 5krát propláchli sterilní destilovanou H₂O (vždy cca 2 min).

Vysetí zelí

Sterilní pinzetou jsme převedli čtyři semena do kultivačních nádob.

Rozsazení pekingského zelí

Po týdenní kultivaci jsme opatrně rozsadili rostliny za pomoci dvou dlouhých pinzet. Po 3 týdnech kultivace jsme vyměnili staré médium za nové (pomocí 10 ml pipety, 15 ml média). Veškeré manipulace jsme prováděli za sterilních podmínek ve flowboxu.

4.2 Inokulace rostlin virem TYMV

Příprava inokula

Odběr pletiv infikovaných TYMV jsme provedli ze skleníku z čerstvě naočkovaného zelí (Manoko F1), 3 týdny po inokulaci. Listy jsme rozmixovali tloučkem tak, aby vznikla co nejvíce rozdrčená hmota, v poměru 1:10 (2g listu na 20ml očkovacího pufru), dále jsme hmotu přecedili přes 2krát složený monofil do malé kádinky (průměr 3cm, výška 5cm) ve flowboxu. Sterilizaci inokula jsme provedli přes bakteriální filtr, pomocí injekční stříkačky do sterilní kádinky. Vše bylo umístěné v ledové tříšti (aby se docílilo co největší stability viru), nakonec jsme do roztoku přidali sterilní karborundum (SiC_4), který rozrušuje buněčnou stěnu rostlin a vytvoří pro virus ideálnější podmínky pro vstup.

Inokulace

Rostliny pěstované v kultivačních nádobách jsme za 2 týdny inokulovali virem TYMV. Byl použit český izolát viru žluté mozaiky vodnice (TYMV) (Polák a Špak, 1987).

Mechanickou inokulaci 128 rostlin v prvním pokusu a 126 rostlin v druhém pokusu jsme provedli tak, že jsme potřeli první 2 pravé a 2 děložní listy rostlin pekingského zelí v magentách. 1. pravé děložní lístky jsme potírali 2 krát ve flowboxu pomocí vatového tamponu namočeného ve směsi inokula se sterilním karborundem. Kontrolní rostliny byly očkované pouze pufrům. Poté následovala kultivace 3 týdny, aby se virus mohl rozmnožit v dostatečné koncentraci.

4.3 Příprava živného roztoku MS s protivirovými látkami

Chemikálie PMEA, PMEDAP, (S)-HPMPC, (R)-PMPA jsme získali od profesora RNDr. A. Holého DrSc., Ústav organické chemie a biochemie AV ČR Praha, Ribavirin od firmy Duchefa.

Navážené množství látek jsme rozpustili v digestoři, v malé kádince, pomocí navažovací lžičky ve 20 ml sterilně odebraného MS média +120 μl roztoku čpavku. Upravili jsme pH na 5,7 pomocí kyseliny chlorovodíkové a hydroxidu draselného. Sterilizaci jsme provedli ve flowboxu pomocí injekční stříkačky a mikrofiltru. Výsledná

koncentrace byla 5 mg/100 ml tedy 50 mg látky na 1 litr MS+vit. Všechny roztoky jsme uchovávali v ledničce při 4⁰C.

4.4 Pufry, roztoky, pracovní přístroje

4.4.1 Pufry a roztoky

1. Dezinfekční roztoky

Dezinfekční roztoky jsme používali k dezinfekci nástrojů, rukavic, pracovních stolů, nádob apod. Podle okolností jsme volili z těchto činidel, případně i další s podobným účinkem.

KMNO₄ 0,1% vodný roztok

CH₃CH₂OH 70-80% vodný roztok

Chloramin, ředění podle pokynů výrobce

Savo, ředění podle pokynů výrobce

2. Zásobní roztok

Zásobní roztok (10krát koncentrovaný) jsme používali k přípravě promývacího pufru. Obsahuje azid sodný, který je silně jedovatý. Je značně nasycený, obtížně se rozpouští, v chladničce může dojít k rekrystalizaci.

NaCl 80g

KH₂PO₄ 2g

Na₂HPO₄ 11,5g

KCl 2g

NaN₃ 2g

100 ml jsme zředili v přibližně 900 ml destilované vody. Po rozpuštění a promíchání jsme kvantitativně obsah převedli do odměrné baňky na 1000 ml a doplnili po značku.

3. Očkovací pufr

Jako očkovací pufr jsme použili 0,1 M fosfátový pufr, pH jsme upravili na 7,0.

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	8,9535 g	pH 9,6
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2,34 g	pH 4,9

4. Potahový pufr

Potahový pufr jsme používali k potahování destiček specifickým IgG. Obsahuje velmi jedovatý azid sodný.

Na_2CO_3	1,59 g
NaHCO_3	2,93 g
NaN_3	0,20 g
pH 9,6	1000 ml

Navážené chemikálie jsme rozpustili v kádince ve 100 ml destilované vody. Po úplném rozpuštění a dokonalém promíchání jsme obsah kvantitativně převedli do odměrné baňky 1000 ml a doplnili po značku. pH jsme upravili pomocí 3M roztoku NaOH nebo koncentrované HCl na 9,6.

5. Promývací pufr

Po inkubaci potahovacího roztoku, jsme promývací pufr používali k promývání mikrotitračních destiček.

pH 7,4 pro 2000 ml dest. vody

NaCl	16,00 g
KH_2PO_4	0,40 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	2,30 g
KCl	0,40 g
Tween 20	0,10 g
NaN_3	0,40 g

6. Konjugátový pufr

Konjugátový pufr jsme používali k ředění specifické protilátky konjugované s enzymem. Má sníženou dobu skladovatelnosti.

pH 7,4 pro 1000 ml

TRIS	2,40 g
NaCl	8,00 g
PVP	20,00 g
TWEEN 20	0,50 g
BSA	2,00 g
MgCl ₂ . 6 H ₂ O	0,20 g
KCl	0,20 g
NaN ₃	0,20 g

Do 1000 ml kádinky jsme pipetou odměřili 100 ml zásobního roztoku a 0,5 ml TWEEN, dále jsme přidali 20 g PVP, 0,2 g MgCl₂. 6 H₂O a 2 g BSA. Asi v 900 ml destilované vodě jsme obsah dokonale rozpustili a kvantitativně jsme převedli do odměrné baňky a doplnili po rysku na 1000 ml. Upravili jsme pH na 7,4 pomocí 3M roztoku Na OH nebo koncentrované HCl.

7. Substrátový pufr

Substrátový pufr jsme používali k ředění p-nitrofenyl fosfátu (substrát). Obsahuje jedovatý azid sodný, skladuje se v ledničce 1 až 2 měsíce.

pH 9,8 pro 1000ml

DEA HN (CH ₂ CH ₂ OH) ₂	97,00 ml
NaN ₃	0,20 g

Odměřili jsme odměrným válcem 97 ml diethanolaminu, nechali rozpustit asi v 900 ml destilované vody a přidali jsme 0,2 g azidu sodného. Po rozmíchání jsme kvantitativně převedli obsah do 1000 ml odměrné baňky a doplnili po značku. Upravili jsme pH na 9,8 koncentrovanou HCl.

8. Extrakční pufr

Extrakční pufr jsme používali k extrakci antigenu z rostlinných buněk nebo k ředění vylisované šťávy.

pH 7,4	1000 ml
TRIS	2,40 g
NaCl	8,00 g
KCl	0,20 g
Tween20	0,50 g
PVP	10,00 g
NaN ₃	0,20 g

Navázili jsme příslušné množství chemikálií a nechali jsme je rozpustit asi v 900 ml destilované vodě, po dokonalém rozpuštění jsme obsah převedli kvantitativně do 1000 ml odměrné baňky a upravili pH na 7,4 3M roztokem NaOH nebo koncentrovanou HCl.

Pufry jsme skladovali v zakryté nádobě při 4-8 °C po dobu max. 2 měsíců. Před použitím jsme pufry ponechávali určitou dobu při pokojové teplotě (laboratorní teplotě).

4.4.2 Pracovní přístroje

Přístroje a pomůcky:

1. Homogenizátor, homogenizační sáčky
2. Promývačka mikrodestiček
3. Spektrofotometr pro čtení mikrodestiček
4. pH metr
5. Mrazicí box
6. Biologický termostat, flowbox
7. Automatická pipeta a příslušné špičky
8. Jednakanálová mikropipeta a příslušné špičky
9. Sterilní polystyrenové mikrotitrační destičky 96 jamek, víčka na mikrotitrační destičky, mikrozkuhavky
10. Analytické váhy
11. Mikrofiltry

4.5 Stanovení obsahu viru metodou ELISA

ELISA byla provedena po 3 týdnech kultivace od naočkování virem. Pro testování protivirových látek jsme vybrali rostliny, které vykazovali vyšší absorbanci než průměr ± 3 SD (Sutula et al., 1986) při 405 nm.

Stanovili jsme skupiny pro každou testovanou látku a kontroly. V prvním experimentu na jednu zkoumanou látku po 17 rostlinách a v druhém experimentu po 13 rostlinách s minimálními rozdíly v průměrné absorbanci. Aplikaci protivirových látek jsme provedli nahrazením média v kultivačních nádobách ihned po prvním ELISA testu.

Pracovní postup při detekci viru metodou ELISA

1. Potažení desky
2. Promytí desky od potahování
3. Odběr vzorku- vážení, homogenizace
4. Pipetování vzorků
5. Promytí od vzorků
6. Pipetování konjugátu
7. Promytí od konjugátu
8. Pipetování substrátu
9. Měření po stanovené době na spektrofotometru
10. Záznam výsledků měření absorbance ELISA do počítače a tisk

1. Potažení desky

Mikrotitrační destičky jsme po vyjmutí obalu označili zkratkou viru a datem potahování. Používali jsme mikrotitrační desky NUNC polysorp. Připravili jsme si potahovací roztok s příslušnou protilátkou IgG-TYMOV, v koncentraci 2 μ g/ml a poté jsme nakapali do každé jamky 200 μ l pomocí automatické pipety. Přikrytou (z důvodu zabránění odpařování roztoku z jamek, tím vlastně prodlužujeme možnou dobu inkubace) a označenou desku jsme vložili do lednice přes noc na 18 hodin při 4°C.

2. Promytí desky od IgG

Vymývání mikrodestiček jsme prováděli ihned po inkubaci potahovacím roztokem. Roztok jsme odstranili na promývačce s odsáváním. Zásobní láhev jsme naplnili promývacím pufrem. Před vlastním vymývacím procesem jsme museli celý přístroj propláchnout destilovanou vodou. Promývačku jsme zapnuli a nastavili potřebný objem na odsátí. Během práce jsme kontrolovali správné plnění a odsávání. Proces trvá cca 15 minut. Na konci procesu je deska suchá. Po použití jsme museli vždy přístroj důkladně propláchnout destilovanou vodou.

3. Odběr vzorku pro ELISA

Ve flowboxu jsme sterilně odebrali mladé listy rostlin (příloha č.6) z magent (nejméně 0,2 g), vážili jsme ihned po odebrání na přenosných vahách Kern (váživost do 0,01g) na sáčcích pro homogenizaci Bioreba AG Švýcarsko (již nesterilně), které jsme si označili a zaznamenali hmotnosti navážek. Vzorky jsme uchovávali vždy v chladu.

Do homogenizačních sáčků jsme napipetovali příslušné množství extrakčního pufru v poměru 1:10. Homogenizovali jsme vždy na přístroji HOMEX 6 (Bioreba, Švýcarsko) až do úplného rozdrcení. Takto připravené vzorky jsme pipetovali do již předem potažených (IgG proti TYMV) mikrotitračních desek pro ELISA.

4. Pipetování vzorků

Šťávu z homogenizovaných vzorků jsme pipetovali ze zadní komory sáčku, do již předem potažených a promytých mikrotitračních destiček pro ELISA testy. Do každé jamky jsme nakapali 200 μ l. Do jamek pro BLANK jsme pipetovali jen samotný extrakční pufr. BLANK, negativní a pozitivní kontroly jsme pipetovali jako první. Takto připravené destičky jsme uložili do lednice přes noc při 4°C. Jako negativní kontrolu jsme používali pekingské zelí z magent inokulované pouze pufrem.

5. Promytí od vzorků

Promývali jsme po vložení desky programem VZORKY (důkladnější promytí), jedna deska cca 20 minut.

6. Pipetování konjugátu

V konjugátovém pufu jsme zředili předepsané množství konjugované protilátky v poměru 1:4000. Po dostatečném promíchání jsme pipetovali automatickou pipetou do každé jamky 200 μ l včetně kontrol a blanku. Mikrotitrační destičky jsme vložili do termostatu na 3 hodiny při 37°C.

7. Promytí od konjugátu

V promývačce jsme promývali programem ELISA, promytí jedné desky trvá 15 minut.

8. Pipetování substrátu

Těsně před použitím jsme odměřili do kádinky, která byla v temnu, vypočítané množství substrátového pufu. Poté jsme přidali 5 mg tablety substrátu (koncentrace 1mg/ml) 4-Nitrophenylphosphatedisodiumsalhexahydrate (SIGMA) a na magnetickém míchadle jsme obsah dokonale rozpustili. Do každé jamky jsme pipetovali 200 μ l substrátu pomocí automatické pipety. Substrát jsme uchovávali v temnu a při pokojové teplotě. Měření probíhalo po stanovené době, 30 min.

9. Měření na spektrofotometru

Absorbanci jsme měřili při vlnové délce světla 405nm a při teplotě 18-25°C na Tecan Spectra Classic ELISA reader a hodnotili pomocí programu KIM-W (příloha č.5). Zvolili jsme ikonu MĚŘIT DESKU a SPOČÍTAT. Vypočtená hodnota alespoň pro jednu jamku u pozitivní kontroly musela přesáhnout 1,0. Pozitivní a negativní kontrolní vzorky jsme používali pro porovnání výsledků u jednotlivých desek po celou dobu experimentu.

4.6 Statistické hodnocení dat

Naměřené hodnoty absorbance jsme statisticky vyhodnotili ANOVA a Tukeyho HSD testem. Aby byl pokus statisticky průkazný, musí být velikost jednoho testovaného souboru o minimálně 13 rostlinách (Dostálková, 2009).

4.7 Časové schéma pokusů

Přehled pokusů:

Týden 0: Klíčení semen v magentách v kapalném médiu

Týden 2: Mechanická inokulace rostlin virem

Týden 5: ELISA test, výběr infikovaných rostlin a sestavení homogenních souborů rostlin (10-20), přidání testovaných látek

Týden 8-17: Stanovení koncentrace viru pomocí ELISA testu v intervalu 3 týdny, pozorování fytotoxického účinku

První pokus

Vyseto: 16. 10. 2008

Přesazeno: 24. 10. 2008

Inokulace virem: 30. 10. 2008

ELISA (1): 19. 11. 2008

Přidání látek: 21. 11. 2008

ELISA (2): 10. 12. 2008

ELISA (3): 6. 1. 2009

ELISA (4): 26. 1. 2009

Druhý pokus

Vyseto: 2. 2. 2009

Přesazeno: 8. 2. 2009

Inokulace virem: 17. 2. 2009

ELISA (1): 9. 3. 2009

Přidání látek: 10. 3. 2009

ELISA (2): 30. 3. 2009

ELISA (3): 20. 4. 2009

ELISA (4): 11. 5. 2009

ELISA (5): 1. 6. 2009

5. Výsledky

Počty pokusných a testovaných rostlin jsou uvedeny v tab. 1

Tab. 1 Počty pokusných, virem očkovaných a testovaných rostlin v pokusech.

Počty rostlin	1. pokus	2. pokus
Počet vyšetých rostlin	138	227
Počet očkovaných rostlin	128	126
Počet testovaných rostlin	126	126
Počet pozitivní rostlin	102	78
1 soubor pro 1 test.látku	17	13
Neg. kontrola v magentách	8	2
Negativní kontrola skleník	2	2

Účinnost ribavirinu a acyklických nukleosid fosfonátů (S)-HPMPC, PMEDAP, (R)-PMPA a PME A v koncentraci 50 mg/l na virus žluté mozaiky vodnice jsou shrnuty v tabulkách 2-5 a v grafech 1 a, b.

Tab. 2, 3, 4, 5. Účinnost ribavirinu a acyklických nukleosid fosfonátů (S)-HPMPC, PMEDAP, (R)-PMPA a PME A v koncentraci 50 mg/l na virus žluté mozaiky vodnice.

Tab. 2 Experiment 1 - průměr hodnot absorbance A 405 nm

Látka/Týdny	0	3	6	9
RIBAVIRIN	1,380	1,076	0,324	0,016
(S)-HPMPC	1,351	0,762	0,556	0,635
PMEDAP	1,284	1,075	0,860	0,735
(R)-PMPA	1,269	1,063	1,488	1,173
PMEA	1,240	1,085	1,351	1,383
Kontrola	1,215	1,282	1,430	1,186

Tab. 3 Experiment 1 - hodnoty směrodatné odchylky hodnot absorbance A 405 nm

Látka/Týdny	0	3	6	9
RIBAVIRIN	0,657	0,486	0,359	0,013
(S)-HPMPC	0,639	0,298	0,251	0,268
PMEDAP	0,540	0,312	0,465	0,260
(R)-PMPA	0,607	0,444	0,470	0,372
PMEA	0,538	0,511	0,566	0,512
Kontrola	0,519	0,415	0,279	0,417

Tab. 4 Experiment 2 - průměr hodnot absorbance A 405 nm

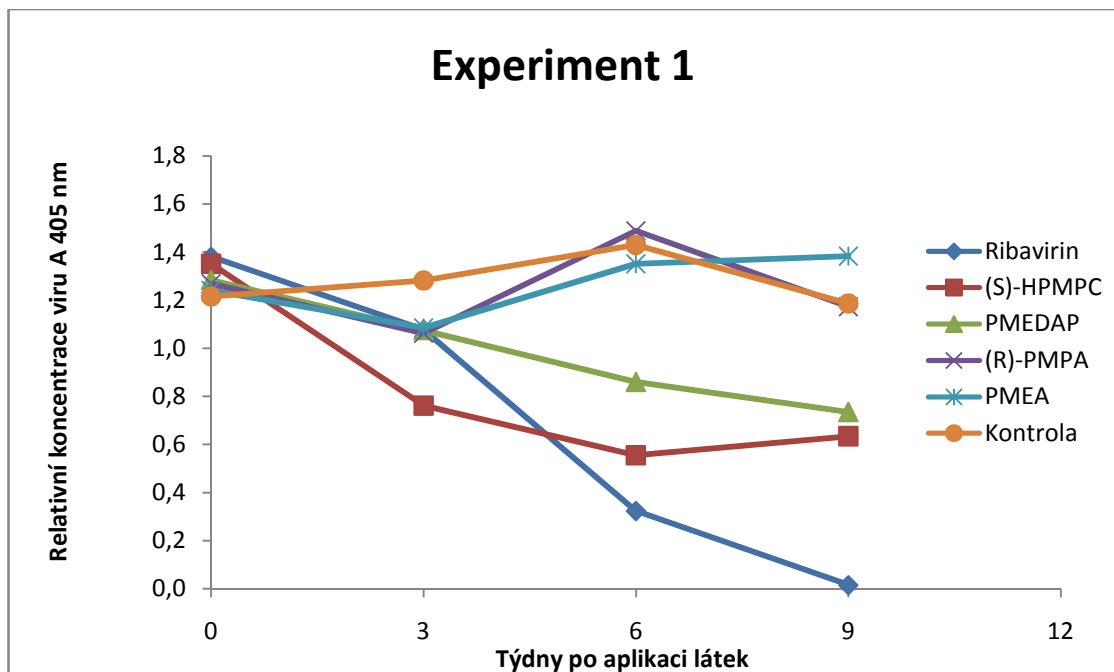
Látka/Týdny	0	3	6	9	12
RIBAVIRIN	1,559	0,837	0,564	0,238	0,012
(S)-HPMPC	1,481	0,901	0,651	0,338	-
PMEDAP	1,508	0,790	0,697	0,253	-
(R)-PMPA	1,582	0,891	1,088	0,772	0,882
PMEA	1,558	0,679	0,957	0,742	0,978
Kontrola	1,599	0,744	0,857	0,878	0,899

Tab. 5 Experiment 2 - hodnoty směrodatné odchylky hodnot absorbance A 405 nm

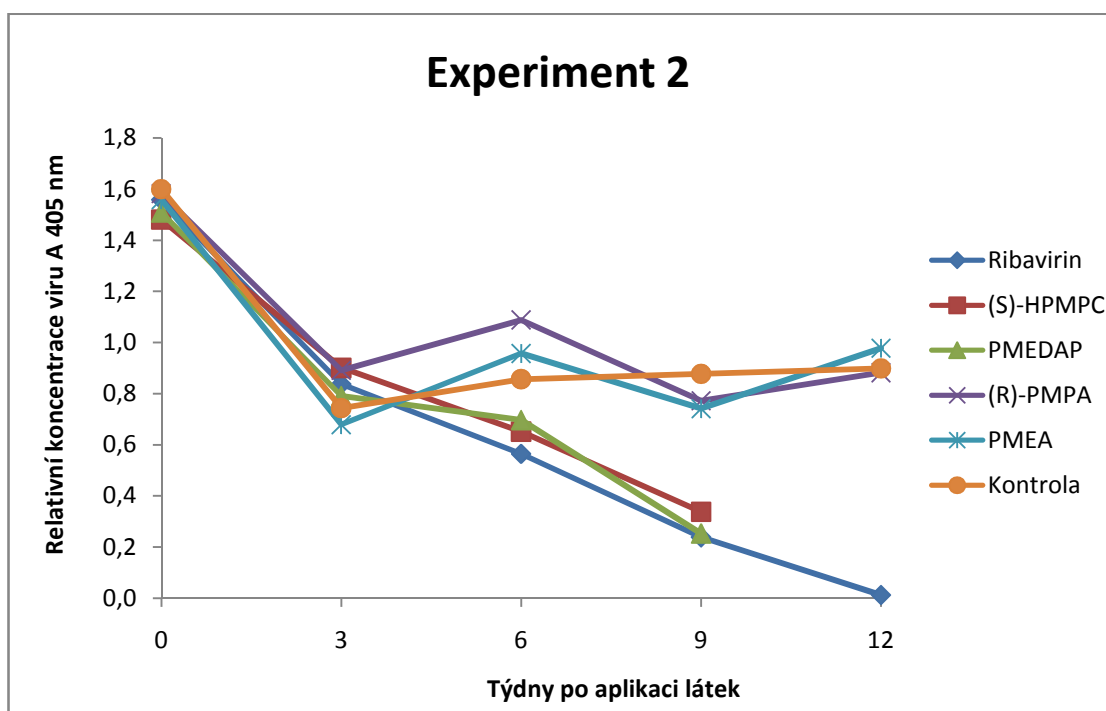
Látka/Týdny	0	3	6	9	12
RIBAVIRIN	0,840	0,620	0,670	0,385	0,016
HPMPC	0,870	0,360	0,230	0,171	-
PMEDAP	0,870	0,420	0,210	0,146	-
PMPA	0,910	0,350	0,370	0,342	0,231
PMEA	0,810	0,370	0,220	0,309	0,416
Kontrola	0,780	0,390	0,270	0,281	0,436

Obr. 1 a, b. Účinnost ribavirinu a acyklických nukleosid fosfonátů (S)-HPMPC, PMEDAP, (R)-PMPA a PMEA v koncentraci 50 mg/l na virus žluté mozaiky vodnice.

a)



b)



Hodnocení fytotoxicity

Rozdíly ve fytotoxicitě u jednotlivých sloučenin jsme pozorovali od 6. týdne po aplikaci látek. U Ribavirinu, (R)-PMPA a PMEAA jsme nepozorovali téměř žádnou fytotoxicitu ve srovnání s kontrolami po 9 týdnech kultivace (tab. 6). U (S)-HPMPC a PMEDAP byla zjištěna středně silná fytotoxicita, projevující se jako žloutnutí rostlin od 6. týdne a dramatickým úhynem rostlin mezi 9. a 12. týdnem.

Posouzení inhibice viru

Údaje jsou shrnuty v tabulce 6 a graf 1 a, b.

Tab. 6 Hodnocení relativní koncentrace viru Tukey HSD testem v 9. týdnu a posouzení fytotoxicity látek vyjádřené jako % přežívajících rostlin.

látka	Experiment 1			Experiment 2			Experiment 1+ 2	
	A 405nm			A 405nm			% přežívajících rostlin	
	průměr	S.D.	Tukey HSD	průměr	S.D.	Tukey HSD	9 týden	12 týden
Ribavirin	0,016	0,01	p< 0.05	0,238	0,39	p< 0.05	76,7	66,7
(S)-HPMPC	0,635	0,27	p< 0.05	0,338	0,17	p< 0.05	63,3	3,30
PMEDAP	0,735	0,26	p< 0.05	0,253	0,15	p< 0.05	63,3	6,70
(R)-PMPA	1,383	0,51	NS	0,742	0,31	NS	70,0	53,3
PMEAA	1,173	0,37	NS	0,772	0,34	NS	96,7	73,3
Kontrola	1,186	0,42		0,878	0,28		76,7	73,3

NS: Není statistický průkazný rozdíl, S.D. směrodatná odchylka

U (R)-PMPA a PMEAA jsme nezjistili žádný antivirový účinek, zatímco u (S)-HPMPC a PMEDAP jsme odhalili střední antivirové účinky ve srovnání s kontrolou, s významným rozdílem při $p < 0,05$ v 9. týdnu. Ribavirin prokazoval nejlepší protivirové účinky. Druhý pokus byl prováděn s vyšší koncentrací viru v rostlinách. To vedlo ke zpoždění při snížení obsahu viru, ale výsledky obou pokusů jsou srovnatelné. Na rozdíl od prvního experimentu, nebyl zjištěn žádný významný rozdíl, ve druhém pokusu v 9. týdnu mezi ribavirinem, (S)-HPMPC a PMEDAP. Tento rozdíl je důsledkem vyšší variability koncentrace viru (S.D.) v rostlinách (dvě rostliny zůstaly s vyšším obsahem viru do 9. týdne).

Analýza relativního obsahu viru v jednotlivých pokusech odhalila náhlý pokles koncentrace TYMV ve většině rostlin ošetřených ribavirinem, i když u některých z nich to trvalo delší dobu, v závislosti na počáteční koncentraci viru. V prvním experimentu, již po 6 týdnech léčby, byly hodnoty absorbance blízko limitu detekce ELISA (tabulka 6) u 7 z 12 rostlin. V 9. týdnu nebyly žádné rostliny pozitivní v ELISA testu. K podobné situaci došlo ve druhém pokusu, kde 6 z 8 rostlin bylo negativní v ELISA testu v 6. a 9. týdnu, pouze 1 z 10 přežívajících rostlin byla pozitivní na konci experimentu.

Na rozdíl od ošetření ribavirinem bylo snížení obsahu viru v rostlinách léčených (S)-HPMPC a PMEDAP pomalejší. Virus byl zjistitelný ELISA testem v 9. týdnu u obou experimentů. Výjimkou byly dvě rostliny ošetřené PMEDAP v druhém pokusu.

Údaje naznačují, že snižování obsahu viru, je důsledkem inhibice viru látkami, spíše než jejich fyto toxicitou. Významný pokles relativní koncentrace viru bylo možné vidět již v 6. týdnu v obou experimentech, kdy rostliny nevykazovaly žádné zežloutnutí, nebo snížení růstu (obr. 1 a, b). Také přežívání skupin rostlin v obou pokusech u PMEDAP a (S)-HPMPC v 9. týdnu bylo jen o 6,7% nižší (tabulka 6), než u rostlin ošetřených (R)-PMPA, která neukázala žádný virostatický účinek.

6. Diskuze

Zjistili jsme, že ribavirin má lepší virostatické účinky na virus žluté mozaiky vodnice, než ANPs. Naše experimenty potvrdily, že pro snižování obsahu viru je nezbytná dlouhá doba expozice. Účinnost ribavirinu byla testována v širokém rozsahu experimentálních podmínek a bylo zjištěno, že je účinný nejméně na 20 rostlinných virů (Hansen, 1989). Jeho antivirová aktivita byla přezkoumána Parker (2005). Používá se v mnoha laboratořích na výrobu bezvirového materiálu (např. Awan et al., 2007; Verma et al., 2005). Bezvirozní prýty mohou být získány z meristémů aplikací 5-50 mg / l ribavirinu do kultivačního média. Zdá se, že ribavirin má nejlepší výsledky proti rostlinným RNA virům, které představují přibližně 75% všech známých virů na rostlinách (Brunt et al., 1996; <http://www.agls.uidaho.edu/ebi/vdie/>). Proto jsme zapojili ribavirin do naší studie nejen kvůli ověření nové metody, ale také jako standard pro hodnocení nových protivirových látek proti rostlinným virům (Xia et al., 2006; Panattoni et al. 2007b). Nově testovaná antivirotika by měla mít lepší antivirovou účinnost, menší fytotoxicitu a levnější výrobu než ribavirin.

Podle dostupných znalostí, nebyly zatím ANPs testovány na inhibici RNA polymerázy v rostlinných virech.

Antivirová aktivita (S)-HPMPC a PMEDAP na ssRNA replikaci viru v chloroplastech je překvapivá. Balzarini et al. (1993) uvádí, že HPMP deriváty se ukázaly být účinné proti DNA virům, ale neúčinné na RNA viry nebo retroviry. Účinky ANPs ssRNA proti rostlinným virům jsou srovnatelné s ribavirinem, ačkoli to bylo doprovázeno jejich vyšší fytotoxicitou. Naproti tomu PMEa a (R)-PMPA, které zjevně nevykazovaly žádný antivirový účinek proti viru ssRNA. Nadále tyto látky zůstávají jako potenciální kandidáti pro další testování v nižších koncentracích a s různými kombinacemi virů.

V literatuře většina autorů používá antivirotika v koncentraci 5-25 mg / l (Verma et al., 2005). Na základě našich předběžných testů s PMEa, jsme vybrali koncentraci 50 mg / ml jako horní limit koncentrace, pro pozorování antivirové účinnosti i možného vlivu fytotoxicity u ANPs. Naše výsledky zjišťování fytotoxicity u PMEDAP jsou podobné těm, které získali Helliott et al. (2003), kteří nejprve testovali vliv účinnosti v různém stupni koncentrace (10, 25, 50 mg / l) PMEDAP, PMEa a (R)-PMPA během 3 měsíců, proti viru BSV (*Banana streak virus*), obsahující kruhový dsDNA genom.

Na rozdíl od našich experimentů, odhalili také vysokou toxicitu u (R)-PMPA v (25 mg / l) a poněkud nižší toxicitu u PMEa (50 mg / l). Jiný účinek ANPs na pekingské zelí ve srovnání s BSV, ukazuje nutnost testu fytotoxicity účinných antivirotik pro jednotlivé druhy rostlin, před jejich použitím v praxi.

7. Závěr

- 1) Byla experimentálně ověřena nová metoda testování protivirových sloučenin proti rostlinným virům, založená na rychle rostoucích brukvovitých rostlinách v *in vitro* podmínkách v kapalném mediu.
- 2) Byla vyhodnocena fytotoxicita a protivirová účinnost ribavirinu a acyklických nukleosid fosfonátů (R)-PMPA, PMEa, PMEDAP a (S)-HPMPC na virus žluté mozaiky vodnice.
- 3) Pro zjištění relativní a celkové koncentrace viru v rostlině jsme použili metodu Double sandwich ELISA.
- 4) Ribavirin, který jsme použili jako standard pro porovnání účinnosti protivirové aktivity acyklických nukleosid fosfonátů, vykázal nejsilnější protivirový účinek z testovaných látek.
- 5) Acyklické nukleosid fosfonáty (R)-PMPA a PMEa nevykazovaly žádný protivirový účinek a téměř žádnou fytotoxicitu ve srovnání s kontrolními rostlinami.
- 6) Acyklické nukleosid fosfonáty (S)-HPMPC a PMEDAP vykazovaly mírné protivirové účinky, ale zároveň i vyšší fytotoxicitu než ribavirin.
- 7) Acyklické nukleosid fosfonáty (S)-HPMPC a PMEDAP jsou potenciálními kandidáty na testování jejich účinku proti dalším rostlinným virům a pro pokusy s ozdravením vegetativně množených plodin, dřevin a okrasných rostlin od virové infekce.

8. Literatura

AWAN A.R., MUGHAL S.M., IFTIKHAR Y., KHAN H.Z.: *In vitro* elimination of Potato Leafroll Polerovirus from potato varieties. *Eur. J. Sci. Res.* 18, 155-164, 2007.

ADAMS M.J. & ANTONIW J.F.: DPVweb.: A comprehensive database of plant and fungal virus genes and genomes. *Nucleic Acids Research* 34, Database issue, D 382-D 385, 2006.

BALZARINY J., HOLÝ A., JINDRICH J., NAESENS L., SNOECK R., SCHOLS D., De CLERQ, E.: Differential antiherpesvirus and antiretrovirus effects of the (S) and (R) enantiomers of acyclic nucleoside phosphonates – potent and selective *in vitro* and *in vivo* antiretrovirus activities of (R)-9-(2-phosphonomethoxypropyl)-2,6-diaminopurine. *Antimicrob Agents Chemother.* 37, p. 332-338, 1993.

BOS J.: *Plant viruses, unique and intriguing pathogens- a textbook of plant virology*, Backhuys Publisher, Leiden. 358 p., 1999.

BRUNT A.A., CRABTREE K., DALLWITZ M.J., GIBBS A.J., WATSON L., ZURCHER E.J.: onwards. `Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database Version (20), 1996.

BÜCHEN-OSMOND C.: 00.077.0.01.020. Turnip yellow mosaic virus. In: ICTVdB - The Universal Virus Database, version 3. Büchen-Osmond, C. (Ed), ICTVdB Management, Columbia University, New York, USA, 2003.

CANER J., DE FAZIO G., ALEXANDRE MAV., KUDAMATSU M., VICENTE M.: Acao de quimioterápicos antivirais no controle do vírus do mosaico dourado do feijoeiro, em *Phaseolus lunatus* L., *Biologico (Sao Paulo)* 52: 39, 1985 cit from Hansen 1989.

CIESLINSKA, M.: Elimination of apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV) from pear by *in vitro* thermotherapy and chemotherapy. *Acta Horticulturae*, no. 596, p. 481-484, 2002.

ČAČA Z. et.al.: *Zemědělská fytopatologie*. Státní zemědělské nakladatelství. 1.vyd. Praha, 336 s., 1981.

DAVIES J.W.: *Molecular plant virology*. Vol. 1, Virus structure and assembly and nucleic acid - protein interactions, Boca Raton: CRC Press, 230 s., 1985.

De FAZIO G., ALBA APC., VICENTE M., DE CLERQ E.: Antiviral activity of S-adenosylhomocysteine hydrolase inhibitors against plant viruses. *Antiviral Research* (13), p. 219-226, 1990.

DOSTÁLKOVÁ I.: Osobní sdělení, 2009.

FACCIOLI G., MARANI F.: Virus Elimination by Meristem Tip Culture and Tip Micrografting. In: Plant Virus Disease Control, Ed. A. Hadidi, Chapter 27, APS Press, Minnesota, USA, p. 346-379, 1998.

HELLIOT B., PANIS B., FRISON E., DE CLERQ E., SWENNEN R., LEPOIVRE P., NEYTS J.: The acyclic nucleoside phosphonate analogues, adefovir, tenofovir and PMEDAP, efficiently eliminate banana streak virus from banana (*Musa ssp.*). *Antiviral Res.* 59, p. 121-126, 2003.

HANSEN A.J., LANE W.D.: Elimination of apple chlorotic leafspot virus from apple shoot cultures by ribavirin. *Plant Disease*, 69, (2), p. 134-135, 1985.

HANSEN A.J.: Antiviral chemicals for plant disease control. *Critical Rev. in Plant Sciences*, 8 (1), p. 45-88, 1989.

HEIJTINK R.A., De WILDE G.A., KRUIJNING J., BERK L., BALZARINI J., De CLERCG E., HOLÝ A., SCHALM S.W.: Inhibitory effect of 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)-adenine (PMEA) on human and *Duck hepatitis B virus* infection. *Antivir. Res* (21), p. 141-153, 1993.

HORÁČKOVÁ V.: Potato virus S eradication by chemotherapy *in vitro* using ribavirin. *Rostlinná výroba* 44 (12), p. 539-544, 1998.

JAMES, D., TRYTTEN, P.A., MACKENZIE, D.J., TOWERS G.H.N., FRENCH, C.J.: Elimination of apple stem grooving virus by chemotherapy and development of an immunocapture RT-PCR for rapid sensitive screening. *Ann. Appl. Biol.*, vol. 131, p. 459-470, 1997.

JANEČKOVÁ, M.: Eliminace komplexu virů (PPV, PNRSV, PDV) ze slivoní kombinací *in vivo* a *in vitro* kultur. *Vědecké práce ovocnářské*, sv. (13), 51-64, 1993.

KŮDELA V., BARTOŠ P., ČAČA Z., DIRLBEK J., FRIČ F., LEBEDA A., ŠEBESTA J., ULRYCHOVÁ M., VALÁŠKOVÁ E., VESELÝ D.: *Obecná fytopatologie*. Academia, Praha, 387 s., 1989.

KŮDELA V., NOVACKY A., FUCIKOVSKY L.: *Rostlinolékařská bakteriologie*, Academia, Czech Republic, s. 74-75, 2002.

LAPČÍK O., KLEJDUS B., AL-MAHARIK N., ADLERCREUTZ H.: *Journal of Immunological Methods*, Volume 294, Issues 1-2, p. 155-163, 2004.

MATTHEWS, R.E.F.: *Turnip yellow mosaic virus*, *CMI/AAB Descr. Pl. Viruses* No. 2, 4 p. 1970.

MATTHEWS, R.E.F.: *Turnip yellow mosaic virus*, *CMI/AAB Descr. Pl. Viruses* No. 230, 6 p. 1980.

MAULE A.J., CARANTA C., BOULTON M.: Sources of natural resistance to plant viruses: status and prospects. *Molecular Plant Pathology* (8) p. 223-231, 2007.

MURASHIGE T., SKOOG F.A.: Revised medium for rapid growth bioassays with Tobago tissue cultures. *Physiol. Plant.* (15) p. 437-497, 1962.

NEČAS T., KRŠKA B.: Selection of woody indicators and the optimum plant material and sampling time for phytoplasma ESFY detection. *Acta Horticulturae* 717: p. 101-106, 2006.

PANATTONI A., D'ANNA F., CRISTANI C., TRIOLO E.: Grapevine vitivirus A eradication in *Vitis vinifera* explants by antiviral drugs and thermotherapy. *Journal of Virological methods* 146,(1-2), p. 129-135, 2007.

PAPERŠTEIN F., SEDLÁK J., ZEMAN P., SVOBODOVÁ L., POLÁK J., HASSAN M.: Preliminary results of in vitro chemotherapy of apple and pear. *Inovace pěstování ovocných plodin, VŠÚO Holovousy*, p. 29-35, 2007.

PARKER W.B.: Metabolism and antiviral activity of ribavirin. *Virus Res.* (107), p. 165-171, 2005.

PENNAZIO S.: History of Therapy of Plant Viral Diseases. *Instituto di Fitoviologia Applicata del C. N. R., Torino, Italy, Rivista di Biologia, Biology Forum* 90, p. 67-82, 1997.

POLÁK J., ŠPAK J.: The incidence of two serologically distinct strains of turnip yellow mosaic virus on cultivated cruciferous plants in Czechoslovakia. *Arch. Phytopathol. Pflanzenschutz* 23, p. 269 – 274, 1987.

PRINS M., LAIMER M., NORIS E., SCHUBERT J., WASSENEGGER M., TEPFER M.: Strategies for antiviral resistance in transgenic plants. *Molecular Plant Pathology* (9):73-83, 2008.

RAMIREZ-MALAGON R., PEREZ-MORENO L., BORODANENKO A.: Differential organ infection studies, potyvirus elimination, and field performance of virus-free garlic plants produced by tissue culture. *Plant Cell Tiss Organ Cult* (86), p. 103-110, 2006.

SEDLÁK J., PAPERŠTEIN F., SVOBODOVÁ L., POLÁK J., HASSAN M., BRYXIOVÁ M.: Předběžné výsledky ozdravování jablek a hrušní metodou termoterapie *in vitro*. *Vědecké práce ovocnářské*, sv. 20, p. 73-80, 2007.

ŠPAK J.: Osobní sdělení, 2009.

SCHUSTER G., HOLÝ A.: Inhibitory effects of 9-(2,3 -dihydroxypropyl)adenine and 3-(adenin-9-yl)-2-hydroxypropanoic acid 2-methylpropylester on potato virus X replication. *Antiviral Research* 9, p. 329-334, 1988.

SUTULA C.L., GILLETT J.M., MORRISSEY S.M., RAMSDELL D.C.: Interpreting ELISA data and establishing the positive-negative. *Plant Dis.* 70, p. 722-726, 1986.

TONAR Z., BERANOVÁ M.: Principy a příklady imunohistochemie, Ústav Histologie a embryologie LF UK v Plzni, 7, 2002.

URBAN Z.: Základy fytopatologie. Státní pedagogické nakladatelství. Praha 1. vyd. 233 s.,

1983.

VERMA N., RAM R., ZAIDI A.A.: In vitro production of Prunus necrotic ringspot virus-free begonias through chemo- and thermotherapy. *Scientia Horticulturae* (103) p.239-247, 2005.

VOTRUBA T.: Ústní sdělení, odborný seminář v Praze, ÚOCHB AV ČR, biochemie, 2009.

XIA Y., FAN Z., YAO J., LIAO Q., LI W., QU F., PENG L.: Discovery of bitriazolyl compounds as novel antiviral candidates for combating the tobacco mosaic virus. *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters* (16), p.2693-2698, 2006.

YING C., De CLERQ E., NEYTS J.: Lamivudine, adefovir and tenofovir exhibit long-lasting anti-hepatitis B virus activity in cell culture. *J. Viral Hepat.* (7) p.79–83, 2000.

YING C., De CLERQ E., NICHOLSON W., FURMAN P., NEYTS J.: Inhibition of the replication of the DNA polymerase M550V station variant of human *Hepatitis B virus* by adefovir, tenofovir, nL-FMAU, DAPD, penciclovir and lobucavir. *J. Viral Hepat.* (7), p.161–165, 2000.

ŽEMLA J., ČIAMPOR F., LABUDA M.: Špeciálna virológia, Slovak Academic Press, 226 p., 1998.

Internetové zdroje:

<http://www.agls.uidaho.edu/ebi/vdie//>

<http://www.microvet.arizona.edu/courses/mic419/ToolBox/elisa.html>

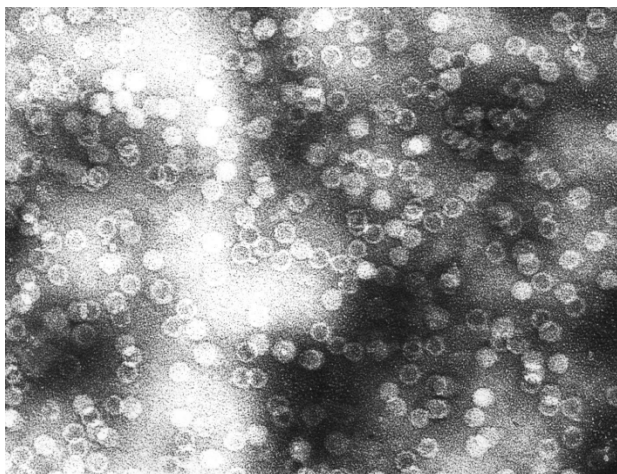
9. Seznam použitých zkratek

Ab	protilátka, protilátky
ACLSV	<i>Apple chlorotic leaf spot virus</i>
Ag	antigen, antigeny
AMP	adenosinmonofosfát
ASGV	<i>Apple stem grooving virus</i>
AV ČR	Akademie věd České Republiky
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
ANP	acyklické nukleosid fosfonáty
BSA	Bovine serum albumin
CMP	cytidinmonofosfát
CMV	cytomegalovirus
DAP	2,6-diaminopurine
DAPy	2,6-diaminopyrimidin
DAS	double antibody sandwich
DEA	Diethanolamine
dsDNA	double stranded Deoxyribonucleic acid
dsRNA	double stranded Ribonucleic acid
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
GMP	guanosinmonofosfát
HBV	Hepatitis B virus
HIV	Human Immunodeficiency Virus
(S)-HPMPC	(S) -1 - [3-hydroxy-2-(phosphonmethoxy) propyl] cytosin
IgG	imunoglobulin
MS	Murashige a Skoog medium
Neg.K	Negativní kontrola
NDP	nukleosiddifosfáty
NTP	nukleosidtrifosfáty
PMEA	9 - [2 - (phosphonmethoxy) ethyl] adenine
PMEDAP	2,6-diamino-9-[2 - (phosphonmethoxy) ethyl] purine
PVP	Polyvinyl pyrrolidone
(R)-PMPA	(R) -9 - [2 - (phosphonmethoxy) propyl] adenine
RT	reverzní transkriptázy

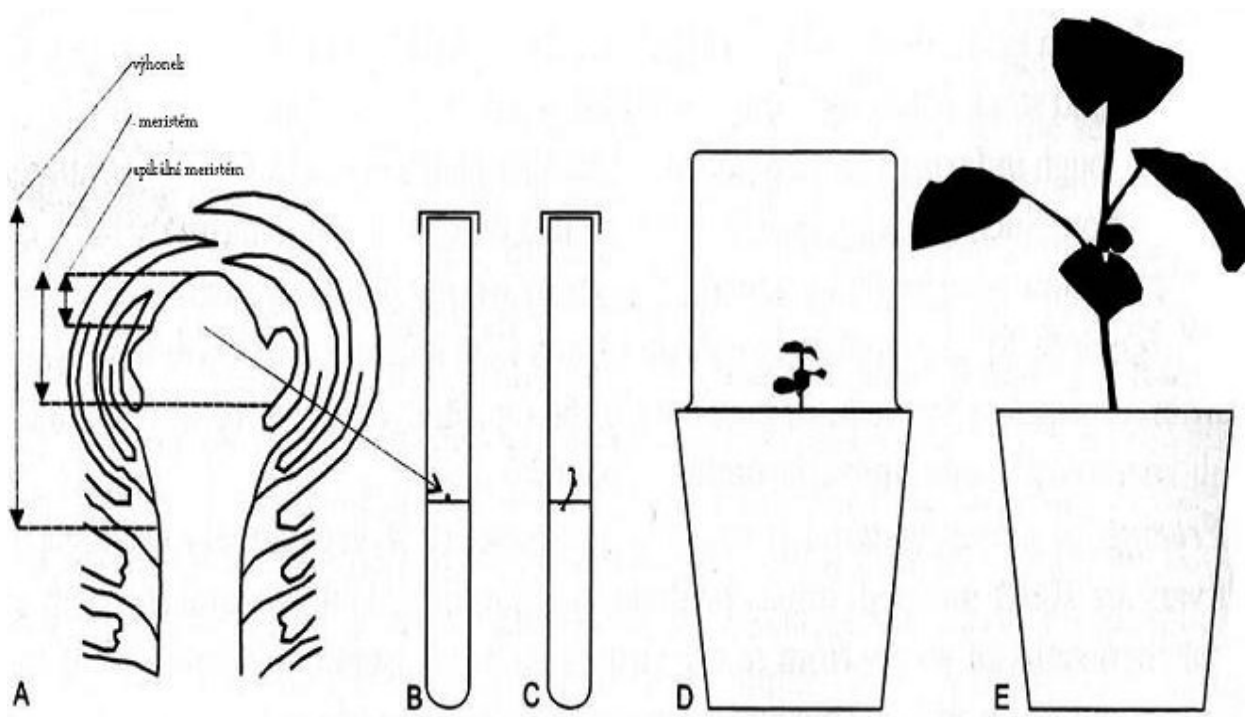
ssDNA	single stranded deoxyribonucleic acid
+ssRNA	positive single stranded Ribonucleic acid
-ssRNA	negative single stranded Ribonucleic acid
TYMV	<i>Turnip yellow mosaic virus</i>
ÚOCHB	Ústav organické chemie a biochemie AVČR

10. PŘÍLOHY

Č.1. Purifikovaný virus žluté mozaiky vodnice v transmisním elektronovém mikroskopu (Foto J. Špak, 2009).



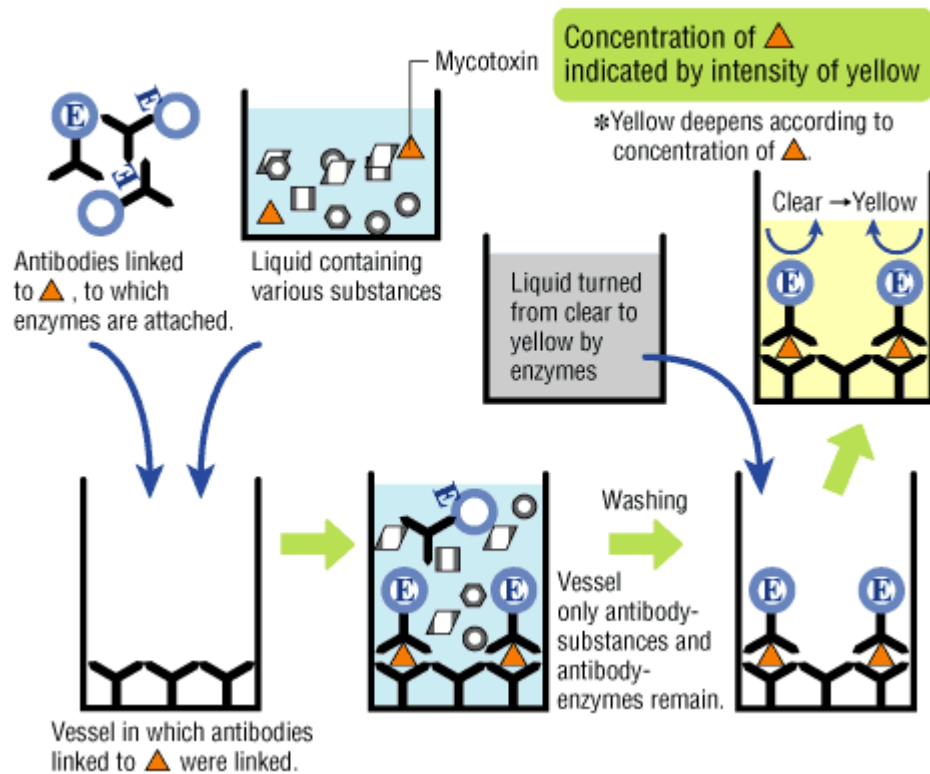
Č.2. Schématické znázornění jednotlivých kroků při ozdravování rostlin od virů (Bos, 1999).



A) Podélný řez bramboru, B,C) Přenesení apikálního meristému s 1 nebo 2 listovými primordiemi do *in vitro* kultury za aseptických podmínek, D, E) Dopěstování a přenesení celé rostliny do půdy.

Č.3. Princip ELISA (<http://www.microvet.arizona.edu/courses/mic419/ToolBox/elisa.html>, online 22.3.2010).

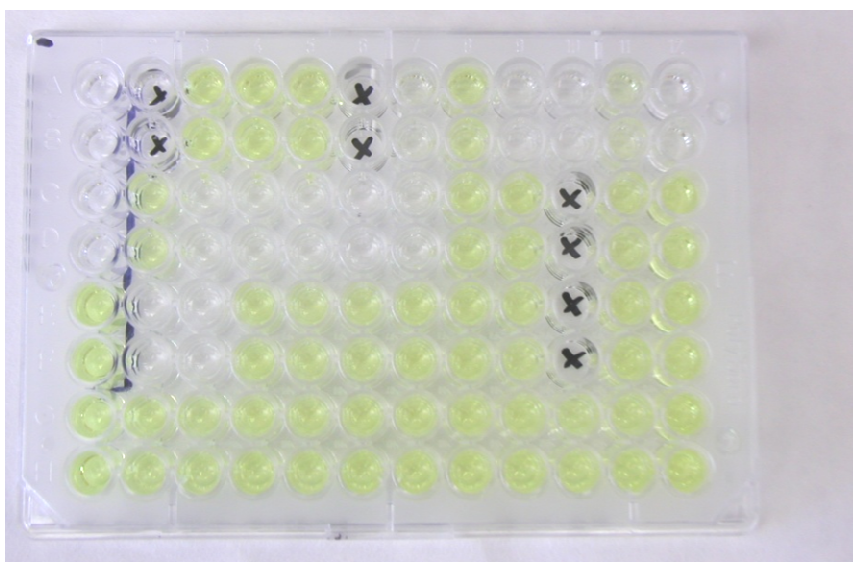
Principle of Enzyme-Linked Immunosolvent Assay (ELISZA)



Č.4 Kultivační nádoba s rostlinou *Brassica pekinensis* (Foto J.Špak, 2009).



Č.5 Mikrotitrační destička, žlutá pole vyznačují přítomnost viru, bíle zbarvená pole negativní nízkou nebo nulovou koncentrací viru, černé vyznačení bez vzorku (odumřelá rostlina). (Foto J. Špak, 2009).



Č.6 Příznaky TYMV na *Brassica pekinensis* (systémová mozaika) (Foto, J. Špak, 2009).



