

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: N4101 Zemědělské inženýrství

Studijní obor: Rostlinné biotechnologie

Katedra: Katedra rostlinné výroby

Vedoucí katedry: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Virocidní účinnost ribavirinu a acyklických  
nukleosid fosfonátů na virus mozaiky ředkvičky

Autor: Bc. Tereza Vozábová  
Vedoucí práce: Prof. Ing. Josef Špak, DrSc.

České Budějovice 2010

## Magisterská diplomová práce

Vozábová, T.: Virocidní účinnost ribavirinu a acyklických nukleosid fosfonátů na virus mozaiky ředkvičky [Antiviral effect of ribavirin and acyclic nucleosid phosphonates against *Radish mosaic virus*. Mgr. Thesis, in Czech] – 47 p., Faculty of Agriculture, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic, 2010.

Anotace: Zhodnocení protivirové účinnosti ribavirinu a acyklických nukleosid fosfonátů na virus mozaiky ředkvičky. Inokulace rostlin pekingského zelí virem RaMV v *in vitro* podmínkách a stanovení relativního obsahu viru imunologickou metodou ELISA. Následná aplikace protivirových látek a sledování, zda obsah viru v rostlinách klesá či nikoli. Následné zpracování údajů do tabulek a grafů a poté statistické zhodnocení.

Klíčová slova: Chemoterapie, ELISA, *in vitro* kultury, rostlinné viry

Annotation: Evaluation of the antiviral effectiveness of ribavirin and acyclic nucleotide phosphonates to *Radish mosaic virus*. Virus inoculation of plants with RaMV and immunological assay of the virus by ELISA. Subsequent application of antiviral agents and monitoring relative content of the virus in plants. Subsequent processing of data in tables and graphs, and then statistical evaluation.

Keywords: chemotherapy, ELISA, *in vitro* cultures, plant viruses

Tato práce byla součástí řešení grantu GAČR: GA522/09/0707 „Účinnost acyklických nukleosid fosfonátů a dalších antimetabolitů proti rostlinným virům“ v Ústavu molekulární biologie rostlin, Biologického centra AVČR v.v.i. v Českých Budějovicích

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma „Virocidní účinnost ribavirinu a acyklických nukleosid fosfonátů na virus mozaiky ředkvičky“ vypracovala samostatně a na základě materiálů uvedených v seznamu literatury.

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

V Českých Budějovicích dne 30. 4. 2010

Podpis.....

## Poděkování

Velmi ráda bych poděkovala a vyslovila uznání všem, kteří mi pomáhali při vzniku této práce. Především vedoucímu mé diplomové práce Prof. Ing. Josefovi Špakovi, DrSc. za trpělivé vedení a množství praktických rad. Dále RNDr. Vlastimile Špakové, která mi vždy ochotně pomohla cennými informacemi. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat Mgr. Daniele Pavingerové, CSc. za pomoc při kultivaci rostlin. Zvláštní poděkování patří RNDr. Ivě Dostálkové, Ph.D., která mi velmi pomohla se statistickým zpracováním dat.

# OBSAH

<b>1. ÚVOD .....</b>	<b>7</b>
<b>2. LITERÁRNÍ PŘEHLED .....</b>	<b>8</b>
2.1 Možnosti ozdravení rostlin termoterapií a chemoterapií.....	8
2.2 Virus mozaiky ředkvičky .....	11
2.3 ELISA .....	12
2.4 Charakteristika protivirových látek .....	14
<b>3. CÍLE PRÁCE .....</b>	<b>17</b>
<b>4. MATERIÁL A METODY .....</b>	<b>18</b>
4.1 Kultivace rostlin .....	18
4.2 Inokulace rostlin .....	19
4.3 Příprava živného média s protivirovými látkami .....	19
4.4 ELISA postup .....	20
4.5 Pufry použité při metodě ELISA .....	22
4.6 Schéma pokusu .....	24
4.7 Statistické hodnocení dat .....	25
<b>5. VÝSLEDKY .....</b>	<b>26</b>
<b>6. DISKUZE .....</b>	<b>33</b>
<b>7. ZÁVĚR .....</b>	<b>36</b>
<b>8. POUŽITÉ ZKRATKY .....</b>	<b>37</b>
<b>9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>39</b>
<b>10. PŘÍLOHY .....</b>	<b>44</b>

# 1. ÚVOD

## 1.1 Metody ochrany proti rostlinným virům

Úspěšná ochrana proti 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. Velké možnosti skýtají nepřímé metody ochrany, zvláště využívající celého komplexu a sledu různých opatření (ve smyslu zvláštní integrované ochrany)(Kůdela,1989).

Nepřímé metody ochrany jsou zaměřeny hlavně na:

1. Likvidaci nebo jinou eliminaci zdroje nákazy (např. negativní výběr, hubení rezervoárových rostlin).
2. Zábranu nebo alespoň omezení všech možných způsobů přenosu virů z infekčních zdrojů (boj proti vektorům, omezení poranění 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 (Urban, 1983).

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 (Žemla, 1998).

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 (Čača, 1981).

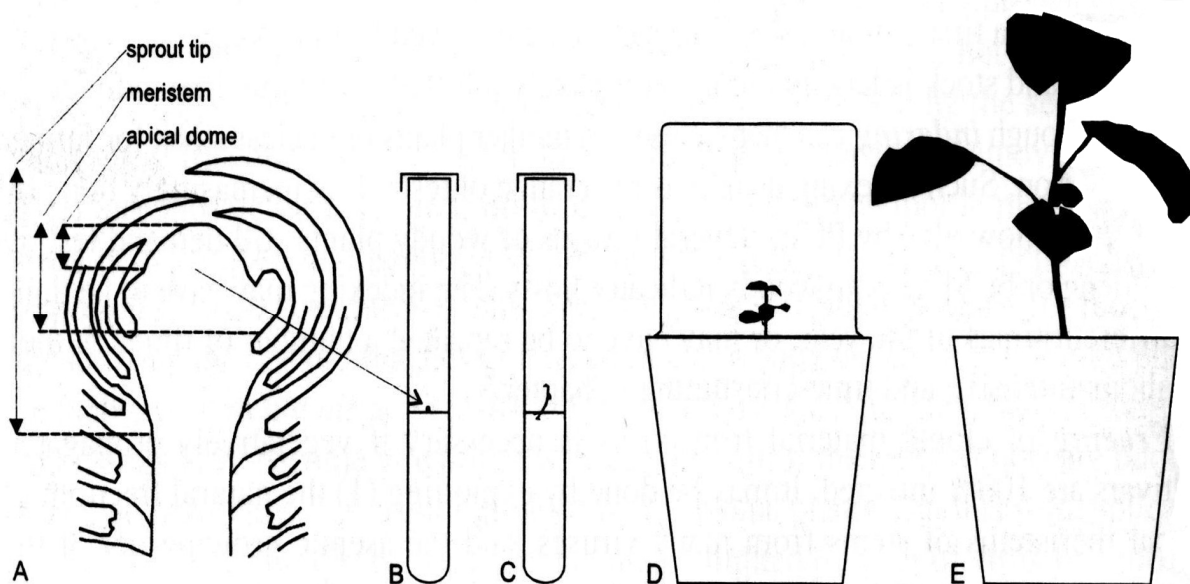
## 2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 2.1 Možnosti ozdravení rostlin termoterapií a chemoterapií

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. Termo 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).

Viruprosté rostliny musí být uchovány v technických nebo prostorových izolátech, aby nedocházelo k jejich opětovnému napadení virem, ke kontaktu s přenašeči rostlinných virů (hmyz). Viruprostý materiál se komerčně využívá k mikropropagaci (např. jahod, okrasných rostlin, brambor).

Obrázek 1: Postupy ozdravení rostlin pomocí meristémových kultur



A. Schematické znázornění podélného průřezu vrcholovou částí výhonku brambor, B.C Aseptická *in vitro* kultura připravená z vrcholové části meristému spolu s jedním nebo dvěma listy primordia celkem cca 0,5 mm dlouhý, D.E Následuje přenos viruprostých explantátů do půdy (Bos, 1999).

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 malou nebo žádnou genetickou variabilitu od původní infikované rostliny. Antivirotika by mohla způsobit genetickou variabilitu, ale prozatím to není vědecky podloženo (Pennazio 1997). Obavy šlechtitelů ze ztráty typických znaků v kultivarech mohou být připisovány menším fyziologickým změnám, které se mohou vyskytnout v regenerovaných rostlinách.

Historii rostlinné terapie podává Pennazio (1997) a Faccioili a Marani (1998), kteří se zabývali eliminací rostlinných virů v *in vitro* kulturách. Z literatury je zřejmé, že zatím není ideální chemická látka ani ideální metoda, ale to není moc překvapující. Dosud bylo popsáno více než 1800 rostlinných virů, využívající jednu z těchto NK (dsDNA, ssDNA, dsRNA, +ss RNA, -ss RNA) a s různou replikační strategií. Může docházet k nálezům velkého množství rostlinných čeledí, rodů, druhů a kultivarů, které mohou vytvářet různé anatomické a biochemické změny 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 experimentálních metod pro inhibici rostlinných virů 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, meristemické ošetření, injekce do celé rostliny nebo aplikace na kořeny), se zdá, že obecně dochází ke zvýšení specifčnosti inhibiční reakce s rostoucí mírou organizace rostlinných pletiv.

Rychlý test na naočkovaných listech, který je spíše preventivní se ukázal být špatným ukazatelem antivirové aktivity pro odstranění viru z infikovaných tkání (Kluge, Ortel 1976). Na druhé straně léčba meristému pomocí antivirových chemických látek, které snižují nebo zcela zabraňují replikaci viru v rostoucí části, má vynikající předvídatelnost terapeutického úspěchu.

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 a 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 - ( $\beta$ -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 přidáním 20-50 mg / l látky do média. Novější studie 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 velmi pozitivní výsledky získány s ribavirinem ve Výzkumném a šlechtitelském ústavu ovocnářském s.r.o. v Holovousech, pro odstranění komplexu virové infekce z jabloní (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) následně k objevu velkého počtu nukleotidových analogů (acyklické nukleosid fosfonáty - ANPs, prototyp (S)-HPMPA). Od (S)-HPMPA (9 -[(S)-3-hydroxy-2-(phosphonomethoxy) propyl] adeninu) byly odvozeny tři látky, které byly na celém světě schváleny pro klinické použití: 1) (S)-HPMPC (1 - [(S)-3-hydroxy-2-(phosphonomethoxy) propyl] cytosin,) Vistide s@cidofovir pro léčbu cytomegalovirové renitis u pacientů s AIDS a léčba polyoma-, papilom-, adeno-, herpes-a poxvirus infekcí (dsDNA genom virů), 2) PMEAs (9 - [2 - (phosphonomethoxy) ethyl] adenine) pro léčbu chronické infekce virem hepatitidy (dsDNA genom virů) a 3) (R)-PMPA (9 - [(R) -2 - (phosphonomethoxy) propyl]adenine) pro léčbu HIV (retrovirus) infekce. Mnohé další ANPs jako deriváty DAP, a DAPy vykazují antivirové aktivity a účinnost srovnatelnou s mateřskými sloučeninami (S)-HPMPA a (S)-HPMPC, PMEAs a (R)-PMPA (de Clercq, 2007). (S)-HPMPC inhibují všechny doposud testované DNA viry (Holý, osobní sdělení 2009). Žádné z těchto látek nebyly doposud testovány na inhibici RNA polymerázy. Hodnocení aktivity ANPs proti DNA virům rostlin navrhl profesor Antonín Holý.

## 2.2 Virus mozaiky ředkvičky

Virus mozaiky ředkvičky je celosvětově rozšířený rostlinný virus, který napadá převážně rostliny z čeledi brukvovitých (*Brassicaceae*). Poprvé byl tento virus popsán v Kalifornii Tompkinsem (1939). Mnohem později byl nalezen v Japonsku (Tochihara, 1968). V Evropě byl poprvé nalezen v Jugoslávii v roce 1972 (Štefanac a Mamula, 1972). Virus mozaiky ředkvičky (*Radish mosaic virus*, RaMV) patří společně s dalšími čtrnácti druhy rostlinných virů do rodu *Comovirus*. Tento rod se řadí společně s rody *Nepovirus*, *Fabavirus*, *Cheravirus* a *Sadwavirus* do čeledi *Comoviridae*.

Rod *Comovirus* zahrnuje neobalené rostlinné viry s izometrickými kapsidami složenými ze 32 kapsomer (Adams, a Antoniw, 2005).

Genom je tvořen jednovláknovou RNA s pozitivní polaritou. Je rozdělen do dvou částí RNA 1 a RNA 2, které jsou enkapsidovány samostatně ve dvou různých typech částic. Kompletní genom je velký asi 10 000 nukleotidů, přičemž větší segment RNA 1 je okolo 6000 nukleotidů dlouhý a menší segment genomu RNA 2 je dlouhý asi 3500 nukleotidů. Každá ze dvou genomových RNA má na 5'- konci protein VPg, kovalentně navázaný fosfodiesterovou vazbou mezi 5'- terminačním nukleotidem a serinovým zbytkem VPg a na 3'- konci poly(A) řetězec ( Drygin et al.,1987).

Rod *Comovirus* dále zahrnuje *Andean potato mottle virus (APMoV)*, *Bean pod mottle virus (BPMV)*, *Bean rugose mosaic virus (BRMV)*, *Broad bean stain virus (BBSV)*, *Broad bean true mosaic virus (BBTMV)*, *Cowpea mosaic virus (CPMV)*, *Cowpea severe mosaic virus (CPSMV)*, *Glycine mosaic virus (GMV)*, *Pea green mottle virus (PGMV)*, *Pea mild mosaic virus (PMiMV)*, *Quail pea mosaic virus (QPMV)*, *Red clover mottle virus (RCMV)*, *Squash mosaic virus (SqMV)* a *Ullucus virus C (UVC)* prozatím je do tohoto rodu řazen i *Turnip ringspot virus*, který byl v nedávné době popsán a částečně osekvenován.

Z těchto čtrnácti virů je jich dosud alespoň částečně osekvenováno těchto osm: *Andean potato mottle virus (APMoV)*, *Red clover mottle virus (RCMV)*, *Squash mosaic virus (SqMV)*, *Cowpea severe mosaic virus (CPSMV)*, *Cowpea mosaic virus (yellow strain) (CPMV)*, *Turnip ringspot virus*, *Bean pod mottle virus (BPMV)*, *Bean rugose mosaic virus (BRMV)* a *Radish mosaic virus (RaMV)* (Holá, 2008).

Virus mozaiky ředkvičky je jediným členem rodu *Comovirus*, který infikuje zejména druhy rostlin z čeledi *Brassicaceae*. Symptomy virové infekce závisí na druhu rostliny, jejím stavu, podmínkách prostředí a koncentraci viru v rostlině. RaMV způsobuje

mozaiky, chlorotickou a nekrotickou kroužkovitost, nekrózy žilek, deformace listů, případně systémové nekrózy. Některé hostitelské rostliny např. *Brassica rapa perviridis* jsou v citlivosti k RaMV heterozygotní. Další vykazují v citlivosti k RaMV značné rozdíly, např. *Brassica rapa var. rapifera* je rezistentní, *Brassica oleracea capitata* a *Brassica campestris* jsou k RaMV citlivé (Holá, 2008).

Mezi další hostitele tohoto viru patří *Beta vulgaris*, *Brassica campestris*, *Brassica campestris ssp. chinensis*, *Brassica campestris ssp. pekinensis*, *Brassica campestris ssp. rapa*, *Brassica campestris ssp. napus*, *Brassica juncea*, *Brassica oleracea ssp. botrytis*, *Brassica oleracea ssp. capitata*, *Chenopodium album*, *Chenopodium amaranticolor*, *Chenopodium foetidum*, *Chenopodium foliosum*, *Chenopodium murale*, *Chenopodium quinoa*, *Cucumis sativus*, *Curcubita maxima*, *Datura stramonium*, *Gomphrena globosa*, *Nicotiana megalosiphon*, *Nicotiana tabacum*, *Raphanus sativus*, *Sinapis alba*, *Spinacia oleracea* (ICTVdB Management, 2006)

Virus je přenášen buď mechanickou cestou při poranění rostliny, nebo hmyzem sajícím na rostlinách a to zejména brouky *Phyllotreta* spp., *Epitrix hirtipennis* a *Diabrotica undecimpunctata*. Přenos semeny nebyl pozorován. Virové částice byly nalezeny ve všech částech hostitelské rostliny (Kasalová, 2008).

### 2.3 ELISA ( Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

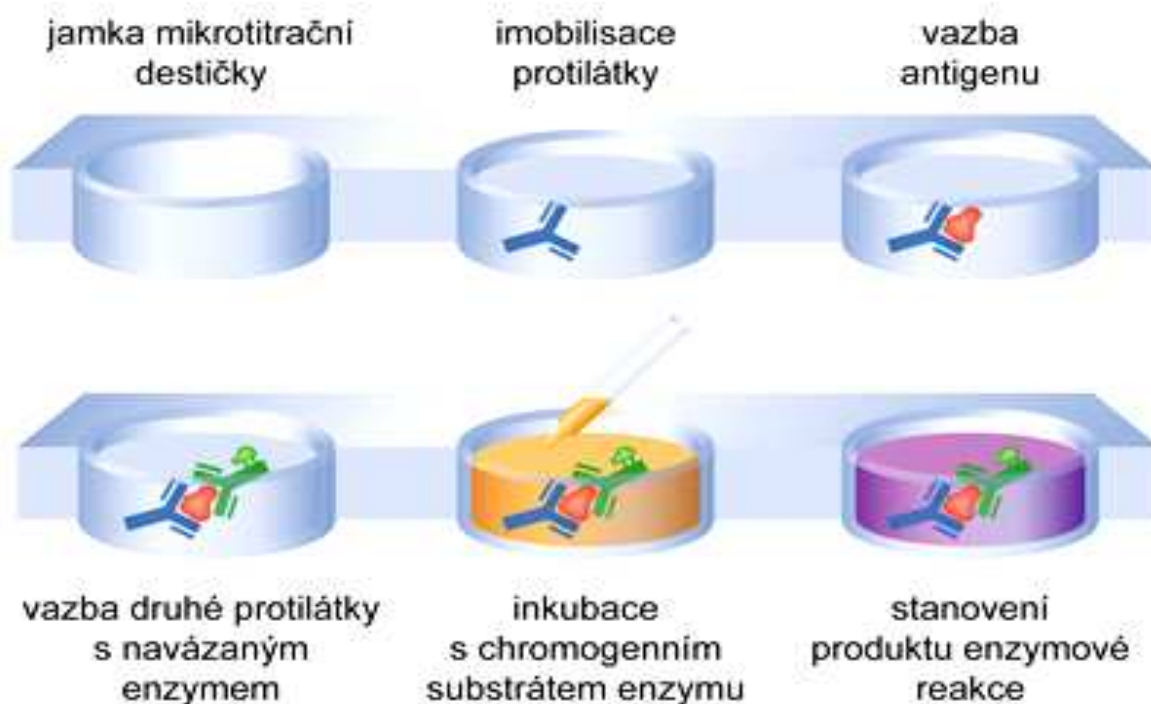
ELISA je jednou z nejpoužívanějších metod při virové diagnostice. Princip této metody spočívá v reakci antigenu s protilátkou, která je značena enzymem. Dochází k barevné změně, která je způsobena reakcí enzymu se substrátem.

Na mikrotitrační destičku se naváže specifická protilátka IgG, na kterou se poté naváže antigen 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 (Double antibody sandwich- enzyme linked immunosorbent assay), 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 i údaje o sérologické příbuznosti izolátů virů, případně stanovit sérotyp

viru. Ve všech případech je výstupní informací provedeného ELISA testu soubor hodnot absorbance (Navrátil, 2009).

Obrázek 2: Schéma metody ELISA (Kodíček, 2007)



## 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 antigenních determinant neboli epitopů. Antigenní determinantu představuje určitá skupina atomů na povrchu molekuly antigenu a charakterizuje jeho specifickou 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) (Vítková, 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 obsahující protilátky proti původnímu imunogenu. Specifičnost polyklonálních protilátek velice závisí na imunizačním protokolu, resp. na tom, v jaké fázi imunitní odpovědi zvířete jsou z něj protilátky získávány (Tonar, 2002).

## **2.4 Charakteristika protivirových látek**

**Ribavirin** (1 - ( $\beta$ -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 bylo dosaženo velmi pozitivních výsledků s ribavirinem při výzkumu a šlechtění Pomologie s. r. o. v Holovousech, pro odstranění komplexu virové infekce z jabloní (Paprštein et al., 2007). Přídavek 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 jabloně (Hasen a 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 (IOBC 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)-HPMPA (S)-HPMPA (9 -[(S)-3-hydroxy-2-(phosphonomethoxy) propyl] adeninu) byly odvozeny látky, které byly na celém světě schváleny pro klinické použití.

Acyklické nukleosidfosfonáty jsou katabolicky stabilní sloučeniny. Po chemické stránce viz níže popsany vzorec.

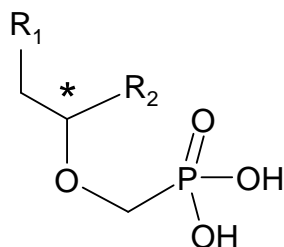
R<sub>2</sub>....H.....PMEA

R<sub>2</sub>....CH<sub>2</sub>OH.....HPMPC

R<sub>2</sub>....CH<sub>3</sub>.....PMPA

R<sub>2</sub>...H.....PMEDAP

R<sub>1</sub>....Purin nebo Pyrimidin



**PMEA** (9 - [2 - (phosphonomethoxy) ethyl] adenine )

Jsou účinné proti retrovirům včetně HIV, který způsobuje onemocnění AIDS (Heijtkink et al., 1993; Ying et al., 2000a, b). Tato skupina acyklických nukleotidů též potlačuje replikaci DNA virů. PMEA a od ní odvozené orální profarmakum bis(POM)-PMEA jsou účinné i proti hepatitidě B. Lék pod názvem Hepsara TM byl nedávno v USA a Evropě schválen pro léčbu chronické HVB (Heijtkink et al., 1993; Ying et al., 2000a, b).

**(R) - PMPA** (9 - [(R) -2 - (phosphonomethoxy) propyl] adenine) (Heijtkink et al., 1993; Ying et al., 2000a,b)

Patří mezi nejúčinnější od nukleosidů odvozené antiretrovirální látky vůbec. Tenofovir [(R)-PMPA, Viread<sup>R</sup>] je účinný proti HIV a HBV. V USA i Evropě byl jako lék již schválen.

**(S) - HPMPC** (1 - [(S)-3-hydroxy-2-(phosphonomethoxy) propyl] cytosin,)

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.

**PMEDAP** (9 - (2-Phosphonmethoxyethyl) - 2,6- diaminopurin)

Je silný inhibitor replikace viru lidské imunodeficiency (HIV) a potlačuje tvorbu nádorů. (De Clercq, 2007).

## **Mechanismy účinku acyklických nukleosid fosfonátů:**

### **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) ( Holý, 2009).

### **3. CÍLE PRÁCE**

Zhodnocení protivirové účinnosti ribavirinu a acyklických nukleosid fosfonátů na virus mozaiky ředkvičky.

Inokulace rostlin virem RaMV a stanovení relativního obsahu viru v rostlinách imunologickou metodou ELISA.

Stanovení fytoxicity látek v pekingském zelí.

Následné zpracování údajů do tabulek a grafů a poté statistické zhodnocení.



## 4. MATERIÁL A METODY

### 4.1 Kultivace rostlin

K pokusu jsme použili Pekingské zelí (*Brassica oleracea* var. *pekinensis*), odrůdu typu Manoko F1. Výsev semen a kultivaci rostlin jsme prováděli v magentách (viz příloha 1). To jsou nádoby 97 mm vysoké. Do nádoby jsme vložili filtrační papír, který sloužil jako opora.

#### Sterilizace semen

Ke sterilizaci jsme použili roztok SAVA, v poměru SAVO:H<sub>2</sub>O = 1:9. Doba působení byla 10 minut, během této doby bylo nutné zkumavky se semeny několikrát protřepat. Poté jsme semena pětkrát propláchli sterilní destilovanou H<sub>2</sub>O, vždy cca 2min, za důkladného protřepání.

#### Vysetí zelí

Sterilní pinzetou jsme převedli vždy čtyři semena do kultivační nádoby = magenty (kultivační krabička s papírovými můstky a s kultivačním médiem MS s vitamíny).

#### Rozsazení pekingského zelí

Po týdenní kultivaci jsme opatrně rozsadily rostliny za pomoci dvou dlouhých pinzet. Při delší kultivaci jsme po 3 týdnech kultivace provedli výměnu starého média za nové (pomocí 10 ml pipety, 15ml média). Rostliny jsme kultivovali za následujících podmínek: teplota 23°C, fotoperioda 16 hod., intenzita osvětlení 90  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ . Vše jsme prováděli za sterilních podmínek ve flowboxu.

Jako živnou půdu jsme použili základní tekuté médium MS (Murashige a Skoog, 1962) s vitamíny (Duchefa) bez růstových regulátorů. Do MS jsme přidali testované protivirové látky. Po 3 týdnech jsme prováděli výměnu živného média za nové. Rostliny jsme kultivovali za následujících podmínek: teplota 23°C, fotoperioda 16 hod., intenzita osvětlení 90  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ . Vše jsme prováděli za sterilních podmínek ve flowboxu.

## 4.2 Inokulace rostlin

### Příprava inokula

Odběr listů jsme prováděli ze skleníku z rostlin hořčice bílé *Sinapis alba* L. 3 týdny po inokulaci. Inokulum RaMV, ředění 1:5 (1. pokus) a 1:10 (2. pokus) (hmotnost/objem) v homogenizačním pufru. Obsah jsme rozmixovali tloučkem tak, aby vznikla šťáva, dále se hmota přecedila přes 2krát složený monofil do malé kádinky (průměr 3cm, výška 5cm) ve flowboxu. Sterilizaci inokula jsme prováděli přes bakteriální filtr, pomocí injekční stříkačky do sterilní kádinky. Vše probíhalo na ledu, aby nedošlo ke snížení infekčnosti viru. Nakonec jsme do roztoku přidali sterilní karborundum (SiC<sub>4</sub>), které rozrušuje buněčnou stěnu rostlin a vytvoří pro virus ideálnější podmínky pro vstup do rostliny.

### Naočkování

Pomocí špejle s vatovým smotkem jsme listy potřeli šťávou z infekčních rostlin, smíchaným se sterilním karborundem. Aplikaci jsme prováděli na první pravé děložní lístky. Poté jsme 3 týdny rostliny kultivovali, aby se příslušný virus mohl rozmnožit v dostatečné koncentraci.

## 4.3 Příprava živného média pro kultivaci

Příprava média s látkami PMEA, (R) - PMPA, PMEDAP, (S) - HPMPC, Ribavirin.

Nejprve jsme sterilně ve flowboxu odměřili 10 – 20 ml tekutého MS média, navázili příslušné množství protilátky a čpavku. Po rozpuštění látky jsme upravili pH na 5,7 a roztok následně ve flowboxu vysterilizovali pomocí mikrofiltru - 20 µm Millipore a doplnili sterilním MS médiem do požadovaného objemu. Po rozpuštění látky se roztok zakalí, po úpravě zákal zmizí.

Příprava: Předem připravené, rozpuštěné, sterilní MS médium s vitamíny

Ředění: 50 mg látky/ 1 (litr) =5 mg/100ml

Celkový objem 100 ml MS s vitamíny + chemikálie

**Chemikálie:** PMEa, PMEDAP, (S) - HPMPC, (R) - PMPA byly získány od profesora RNDr. A. Holého DrSc., Ústav organické chemie a biochemie AVČR Praha, Ribavirin od firmy Duchefa.

Navážka: 5 mg = 0,005g na vahách.

Látky jsme rozmíchali v digestoři, v malé kádince, pomocí navažovací lžičky ve 20 ml sterilně odebraného MS média +120 µl roztoku čpavku. Úpravu pH na 5,7 jsme provedli pomocí kyseliny chlorovodíkové a hydroxidu draselného. Sterilizaci jsme provedli ve flowboxu pomocí injekční stříkačky a mikrofiltru. Výsledný objem je 5mg/100ml tedy 50 mg látky na 1 litr MS+vit. Všechny roztoky jsme uchovávali v ledničce při 4°C.

#### **4.4 ELISA postup**

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

##### **1. Potažení desky**

Používali jsme označené mikrotitrační desky NUNC polysorp (viz příloha č.2), IgG proti RaMV, potahovací pufr.

IgG jsme promíchali s potahovacím pufrům v koncentraci 2µg/ml a poté napipetovali do každé jamky 200µl pomocí automatické pipety. Přikrytou a označenou desku jsme vložili do lednice přes noc na 18 hodin při 4°C.

##### **2. Promytí desky**

Desky jsme promývali na promývačce AYSYS (viz příloha č. 3). Proces trvá cca 15minut.

### **3. Odběr vzorků**

Ve flowboxu jsme sterilně odebrali mladé listy rostlin z magent (nejméně 0,2 g), ihned po odebrání jsme je zvážili na přenosných vahách Kern (váživost do 0,01g). Vážili jsme na sáčcích pro homogenizaci Bioreba AG Švýcarsko (již nesterilně), které jsme předem označili a po zvážení popsali hmotností navážky. Vzorky jsme uchovávali vždy v chladu.

### **4. Homogenizace vzorků**

Do homogenizačních sáčků (viz příloha č. 4) jsme přidali vzorek a příslušné množství extrakčního pufru v poměru 1:10 tedy např. 0,25g listu+2,5ml homogenizačního pufru. Homogenizovali jsme na homogenizačním přístroji až do úplného rozdrcení lístků.

### **5. Pipetování vzorků**

Homogenizované vzorky jsme pipetovali ze zadní komory sáčku, do již předem potažených a promytých mikrotitračních destiček pro ELISA testy. Do každé jamky jsme pipetovali 200 $\mu$ 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 pozitivní kontrolu jsme použili vzorek rostliny infikované virem RaMV, jako negativní kontrolu pekingské zelí z magenty inokulované pouze pufrem.

### **6. Promytí desky od vzorků**

Promytí po vložení desky programem VZORKY (důkladnější promytí), jedna deska cca 20 minut. Promytí jsme prováděli opět na promývače.

### **7. Pipetování konjugátu**

Připravili jsme si z chladničky konjugát proti RaMV. Ředění 1 : 3000. Po dostatečném promíchání bylo pipetováno automatickou pipetou 200 $\mu$ l do každé jamky včetně kontrol a blanku. Destičky jsme vložili do termostatu na 3 hodiny při 37°C.

### **8. Promytí desky od konjugátu**

Desky jsme promývali na promývače programem ELISA cca 15minut na jednu desku.

## 9. Pipetování substrátu

Substrát- 4-Nitrophenylphosphatedisodiumsalthexahydrate-(SIGMA)

Do kádinky v temnu jsme pipetovali vypočítané množství substrátového pufru, poté přidali 5 mg tablety substrátu a na míchadle se substrát rozpustil. Výsledná koncentrace byla 1mg/ml.

Do každé jamky jsme pomocí automatické pipety pipetovali 200 $\mu$ l substrátu. Je nutné substrát uchovávat v temnu a při pokojové teplotě. Měření jsme prováděli po 40 minutách.

## 10. Měření na Spektrofotometru

K měření jsme použili program KIMW. Měření jsme prováděli na přístroji Spectra classic při vlnové délce světla 405nm a při teplotě 18-25°C. Zvolili jsme ikonu MĚŘIT DESKU a SPOČÍTAT. Vypočtená hodnota alespoň pro jednu jamku u pozitivní kontroly musela přesáhnout 1,0. Pro stabilitu při fotografování desky je možné zastavit štěpení přidáním 50  $\mu$ l roztoku NaOH do každé jamky.

## 4.5 Pufry použité při metodě ELISA

### Očkovací pufr

Jako očkovací pufr jsme použili 0,1 M fosfátový pufr, pH se upravuje 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

### Potahový pufr

pH 9,6      1000 ml

$\text{Na}_2\text{CO}_3$       1,59 g

$\text{NaHCO}_3$       2,93 g

$\text{NaN}_3$       0,20 g

### Promývací pufr

Poznámka: nejprve smíchat fosfáty

pH 7,4 pro 2000 ml dest. vody

$\text{NaCl}$       16,00 g

$\text{KH}_2\text{PO}_4$       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 <sub>3</sub>	0,40 g

### **Konjugátový pufr**

pH 7,4 pro 1000 ml

TRIS	2,40 g
NaCl	8,00 g
PVP MW 24 000	20,00 g
TWEEN 20	0,50 g
BSA	2,00 g
MgCl <sub>2</sub> . 6 H <sub>2</sub> O	0,20 g
KCl	0,20 g
NaN <sub>3</sub>	0,20 g

### **Substrátový pufr**

pH 9,8 pro 1000ml

DEA	97,00 ml
NaN <sub>3</sub>	0,20 g

### **Extrakční pufr (je stabilní 3 měsíce)**

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 <sub>3</sub>	0,20 g

## **4.6 Schéma pokusu**

### **Časové schéma první pokus:**

Vyseto: 23.10.2008

Přesazeno: 30.10.2008

Inokulace virem: 6.11.2008

ELISA(1): 27.11.2008

Přidání látek (Ribavirin, PMPA): 28.11.2008

ELISA(2): 18.12.2008

Přidání látek (HPMPC, PMEDAP, PMEAA): 17.12.2008

ELISA(3): 8.1.2009

ELISA(4): 27.1.2009

ELISA(5): 16.2.2009

### **Časové schéma druhý pokus:**

Vyseto: 9.2.2009

Přesazeno: 13.2.2009 a 16.2.2009

Inokulace virem: 24.2.2009

ELISA(1): 16.3.2009

Přidání látek: 16.3.2009

ELISA(2): 7.4.2009

ELISA(3): 27.4.2009

ELISA(4): 18.5.2009

## 4.7 Statistické hodnocení dat

Při plánování experimentů jsme konzultovali s Dr. I. Dostálkovou počty rostlin nezbytné pro statistické hodnocení. Analýzou variance jsme stanovili 13-15 rostlin, při 2 opakováních každého vzorku pro eliminaci chyb při pipetování a podobně. Dále jsme vycházeli z předpokladu úhynu některých rostlin v magentách a možné kontaminace při odběru vzorků (počáteční stanovení koncentrace viru v rostlinách a následné 3-4 odběry v intervalu 3 týdnů).

Naměřené hodnoty absorbance v ELISA spektrofotometru jsme exportovali do MS Excel pro zpracování tabulek a grafů s využitím kontingenčních tabulek. Z nich byla data exportována do programu Statistica v. 9. 0 (Stat. Soft.) pro provedení analýzy variance a Tukey HSD testu.



## **5. VÝSLEDKY**

Následující pasáž o rozsahu 7 stran obsahuje utajované skutečnosti a je obsažena pouze v archivovaném originále diplomové práce uloženém na Zemědělské fakultě JU.

## 6. DISKUZE

### Fytotoxicita látek

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 Helliot et al. (2003), kteří poprvé testovali vliv účinnosti v různém stupni koncentrace (10, 25, 50 mg / l) PMEDAP, PMEa a (R) - PMPA během tří 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 banánovníkem ukazuje nutnost testu fytotoxicity účinných antivirotik pro jednotlivé druhy rostlin před jejich použitím v praxi.

### Protivirový účinek látek

Cílem práce bylo zcela první hodnocení protivirového účinku ribavirinu a acyklických nukleosid fosfonátů k viru mozaiky ředkvičky. Navíc metodou zcela nově vyvinutou pro tento účel. Pokusy byly součástí řešení grantového projektu, v němž byl RaMV vybrán jako zástupce rodu *Comovirus* pro srovnání s dalšími viry rodu *Tymovirus* a *Potyvirus* s rozdílnými místy replikace viru v rostlině, genomem apod. Obtížnost pokusů vyplývala ze skutečnosti, že pekingské zelí, které je příznakovým hostitelem jiných virů brukvovitých, je pouze latentním hostitelem RaMV. Ideálním hostitelem je hořčice bílá, na které byl virus udržován.

Proto bylo nejprve nezbytné ověřit průběh infekce, který, jak je zřejmé z výsledků 1. pokusu, byl problematický. Možným důvodem je adaptace viru na jiného hostitele (ze *Sinapis alba* na *Brassica pekinensis*). Důsledkem byly nízké počty infikovaných rostlin s dostatečnou koncentrací viru pro pokusy. I když jsme v druhém pokuse zvolili

nižší ředění inokula (možnost snížení účinků inhibičních látek v inokulu), průběh infekce byl pomalý a plně se rozvinul až 3 týdny po přidání látek.

Porovnání prvního a druhého opakování pokusu dále ovlivnil vysoký rozdíl v relativní koncentraci viru v rostlinách a vysoké hodnoty SD, které ovlivňovaly průkaznost rozdílů. Vzhledem k technickým problémům v průběhu experimentů je pro definitivní vyhodnocení účinků ANPs na RaMV nezbytné provést 3. opakování pokusu. Přes značné technické potíže, jsme však získali poměrně reprezentativní výsledky částečně shodné v obou pokusech.

Z výsledků 2. pokusu je překvapivé zjištění, (S) - HPMPC a PMEDAP vykazaly dokonce vyšší protivirový účinek než ribavirin, který byl do pokusů zařazen jako standard - dosud patrně nejúčinnější látka proti rostlinným RNA virům, i když rozdíl mezi těmito látkami nebyl statisticky významný. Zcela unikátní je zjištění protivirové aktivity (R) - PMPA. Naše experimenty potvrdily, že pro snižování obsahu viru je nezbytná dlouhá doba expozice látek na virus.

Účinnost ribavirinu byla v minulosti testována v širokém rozsahu experimentálních podmínek a bylo zjištěno, že je působí nejméně na 20 rostlinných virů (Hansen, 1989). Mechanismus jeho protivirového účinku byl částečně objasněn Parker (2005). Ribavirin se používá v mnoha laboratořích na výrobu bezvirového materiálu (např. Awan et al., 2007; Verma et al., 2005). Bezvirozní prýty mohou být získány z meristemů 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). Proto jsme zapojili ribavirin do naší studie nejen pro 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. Jedná se o prioritní výsledky základního výzkumu, které není možné srovnat s literárními údaji.

Antivirová aktivita (S)-HPMPC a PMEDAP a (R) - PMPA na ssRNA replikaci RaMV 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 proti

ssRNA rostlinným virům jsou srovnatelné s ribavirinem, ačkoli byly provázeny jejich vyšší fytotoxicitou. Nadále tyto látky zůstávají jako potenciální kandidáti pro další testování v nižších koncentracích a s různými kombinacemi virů. Je rovněž nutné ověřit, zda je možné snížení koncentrace viru v rostlinách na úroveň detekčního limitu ELISA a odběru bezvirózních meristémů. Naproti tomu látka PME A zjevně nevykazovala žádný antivirový účinek proti ssRNA viru.

## 7. ZÁVĚR

- 1) Bylo experimentálně ověřeno použití nové metody testování protivirotických sloučenin proti rostlinným virům, založené na rychle rostoucích brukvovitých rostlinách v *in vitro* podmínkách v kapalném mediu, pro virus mozaiky ředkvičky.
- 2) Byla vyhodnocena fytotoxicita a protivirotická účinnost ribavirinu a acyklických nukleosid fosfonátů (R)-PMPA, PMEa, PMEDAP a (S)-HPMPC na virus mozaiky ředkvičky.
- 3) Ribavirin, který jsme použili jako standard pro porovnání účinnosti protivirotické aktivity acyklických nukleosid fosfonátů, vykázal předpokládaný protivirotický účinek proti RaMV.
- 4) Acyklický nukleosid fosfonát PMEa nevykázal protivirotický účinek a téměř žádnou fytotoxicitu ve srovnání s kontrolními rostlinami v obou provedených pokusech.
- 5) Acyklické nukleosid fosfonáty (S)-HPMPC a PMEDAP a (R) – PMPA vykazovaly shodně mírné protivirotické účinky v obou experimentech, (S)-HPMPC a PMEDAP ale zároveň i vyšší fytotoxicitu než ribavirin. Tyto látky jsou potenciálními kandidáty na testování proti dalším rostlinným virům a pro pokusy s ozdravením vegetativně množených plodin, dřevin a okrasných rostlin od virové infekce..
- 6) Vzhledem k technickým problémům v průběhu experimentů je pro definitivní vyhodnocení účinků ANPs na RaMV nezbytné provést 3. opakování pokusu.

## 8. POUŽITÉ ZKRATKY

(S) - HPMPA - 9 -[(S)-3-hydroxy-2-(phosphonmethoxy) propyl] adenine

*ACLSV* - *Apple chlorotic leaf spot virus* (virus chlorotické skvrnitosti jabloně)

*AIDS* - *Acquired Immune Deficiency Syndrome* (Syndrom získaného selhání imunity)

AMP – Adenosin monofosfát

ANPs – acyklické nukleosid fosfonáty

*ASGV* – *Apple stem grooving virus* (virus žlábkovitosti kmene jabloně)

BSA - bovine serum albumine (hovězí sérový albumin)

CMP – cytosin monofosfát

CMV - Cytomegalovirus

DAS- ELISA – Double antibody sandwich- enzyme linked immunosorbent assay

DNA - deoxyribonukleová kyselina

dsDNA - dvouvláknová DNA

dsRNA – dvouvláknová RNA

EBV - Virus Epstein-Barrové

ELISA – Enzyme- linked immunosorbent assay

GMP - guanosin monofosfát

*HIV* - *Human Immunodeficiency Virus* (*virus lidské imunitní nedostatečnosti*)

HPMP- N-[3-hydroxy-2-(fosfonmethoxy)propyl

HPMPC - 1-[3-hydroxy-2-(phosphonmethoxy)propyl]cytosine

HPV - human papilloma virus (lidský papilloma virus)

HSV - Herpes simplex virus

HVB - hepatitis B virus

IgG – Imunoglobulin G

KCl – chlorid draselný

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  – hydrogenfosforečnan draselný

$\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  – chlorid hořečnatý

MS - Murashige a Skoog medium

$\text{Na}_2\text{CO}_3$  – uhličitan sodný

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  - dodekahydrát hydrogenfosforečnanu draselného

NaCl – chlorid sodný

$\text{NaHCO}_3$  - hydrogenuhličitan sodný

$\text{NaN}_3$  - azid sodný

NaOH – hydroxid sodný

NDP - nukleosiddifosfát

NK- nukleová kyselina

NTP - nukleosidtrifosfát

PCR - polymerase chain reaction (polymerázová řetězová reakce)

PMEA – 9 - (2-phosphonylmethoxyethyl) adenine

PMEDAP - 9 - (2-Phosphonomethoxyethyl) - 2,6- diaminopurin

PMP - N-[2-(Phosfonomethoxy)propyl] deriváty

PMPA -(2-phosphonylmethoxypropyl)adenine

RaMV – *Radish mosaic virus*

RNA – Ribonukleová kyselina

ssDNA- Jednovláknová DNA

ssRNA – Jednovláknová RNA

VPg – viral protein genome-linked

VZV- *Varicella-zoster virus*

## 8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ADAMS, M.J., ANTONIW, J.F. DPVweb: An open access internet resource on plant viruses and virus diseases. *Outlooks on Pest Management* 16, 268-270, 2005.

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.

BALZARINI, J., HOLÝ, A., JINDRICH, J., NAESENS, L., SNOECK, R., SCHOLS, D., DE CLERCQ, 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-phosphonmethoxypropyl)-2,6-diamino-purine. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37, 332–338, 1993

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.

BOS, L.: Plant viruses, unique and intriguing pathogens – a textbook of plant virology. Backhuys Publisher Leden, 1999, 358 s.

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.

ČAČA, Z a kol. : Zemědělská fytopatologie. Státní zemědělské nakladatelství. Praha, 1981, 344s.

DE CLERCQ, E.: The acyclic nucleoside phosphonates from inception to clinical use: Historical perspective. *Antiviral Res.* 75, 1-13, 2007.

DE FAZIO, G., ALBA, APC, Vicente, M., DE CLERCQ, E.: Antiviral activity of S-adenosylhomocysteine hydrolase inhibitors against plant viruses. *Antiviral Research* 13, 219-226, 1990.

DRYGIN, Y.F., SAPOTSKY, M.V., BOGDANOVA, A.A.: Radish mosaic virus VPG characteristic and linkage with virion RNAs. *The Journal of General Virology* 215, 247-251, 1987.



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

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

HANSEN, A.J., LANE, W.D.: Elimination of apple chlorotic leafspot virus from apple shoot cultures by ribavirin. *Plant Disease*, vol. 69, no. 2, p. 134-135, 1985.

HELLIOT, B., SWENNEN, R., POUMAY, Y., FRISON, E., LEPOIVRE, P., PANIS, B.: Ultrastructural changes associated with cryopreservation of banana (*Musa* spp.) highly proliferating meristems. *Plant Cell Rep* 21, 690-698, 2003.  
21, 690–698.

HERTEL, J., LINDEMEYER, M., MENZEL, P.: Conserved RNA Secondary Structures in Comoviridae Genomes, . Available from www: < <http://www.bioinf.uni-leipzig.de/Leere/PRAKTIKUM/Protokolle/WS02/vitacola/protocol.html#ictvdes>, 2002.

HEIJTINK, R.A., De WILDE, G.A., KRUIJNING, J., BERK, L., BALZARINI, J., De CLERCQ, 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, 141–153, 1993.

HOLÁ, M.: Studium variability genů obalových proteinů viru mozaiky ředkvičky. [A study of variability of capsid protein genes of Radish mosaic virus. Mgr. Thesis, in Czech] -31 p., Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic, 2007.

HOLÝ, A.: Osobní sdělení, 2009.

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

ICTVdB Management 00.018.0.01.013. Radish mosaic virus. In: *ICTVdB - The Universal Virus Database*, version 4. Büchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA, 2006.

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, s. 51-64, 1993.

KASALOVÁ, T.: Kvantifikace progresu virové infekce virů RaMV a TuRSV pomocí real-time PCR [Quantification of infection progression of RaMV and using real-time PCR. Mgr. Thesis, in Czech ]- 34p., Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic, 2008.

KLUGE, S., ORTEL, C. Pruefung von Virazol auf die Vermehrung des Gurkenmosaik-Virus (cucumber mosaic virus) und des Nelkenschekung-Virus (carnation mottle virus). *Arch. Phytopathol. Pflanzenschutz* 14-219, 1976.

KODÍČEK, M.: *ELISA*. From *Biochemické pojmy : výkladový slovník* [online]. Praha: VŠCHT Praha. Available from www: <[http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid\\_es-002/ebook.html?p=elisa](http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=elisa)> schéma ELISA, 2007.

KÚDELA, V. a kol.: *Obecná fytopatologie*. Academia. Praha ,1989,388s.

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

NAVRÁTIL, M. :[genetika.upol.cz/vyuka/materialy/OBVSb/elisa.pdf](http://genetika.upol.cz/vyuka/materialy/OBVSb/elisa.pdf) ,2009

NEČAS, T., KRŠKA, B.:[http://tilia.zf.mendelu.cz/ustavy/551/ustav\\_551/aplice/soubory/metody\\_elisa.pdf](http://tilia.zf.mendelu.cz/ustavy/551/ustav_551/aplice/soubory/metody_elisa.pdf), 2006.

PANATTONI, A., D'ANNA, F., CRISTANI, C., TRIOLO, E.: Grapevine vitivirus A eradication in *Vitis vinifera* explants by antiviral drugs and thermotherapy. *J. Virol. Methods* 146, 129-135, 2007 a.

PANATTONI, A., D'ANNA, F., TRIOLO, E.: Antiviral activity of tiazofurin and mycophenolic acid against Grapevine Leafroll-associated Virus 3 in *Vitis vinifera* explants. *Antiviral Res.* 73, 206-211, 2007b.

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*, 29-35, 2007.

PAPERŠTEIN, F., SEDLÁK, J., SVOBODOVÁ, L., POLÁK, J., HASSAN, M., BRYXIOVÁ, M. Předběžné výsledky ozdravování jabloní a hrušní metodou termoterapie *in vitro*. *Vědecké práce ovocnářské*, sv.20, s. 73-80, 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, 67-82, 1997.

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* 86:103-110, 2006.

ŠTEFANAC, Z., MAMULA, D.: A strain of radish mosaic virus occurring in Turnip in Yugoslavia. *Annals of Applied Biology* 69, 229-34, 1972.

TONAR, R.: <http://www.lfp.cuni.cz/histologie/education/guides/ihc/node1.html>. 2002

URBAN, Z. : *Základy fytopatologie*. Státní pedagogické nakladatelství. Praha, 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: 239-247, 2005.

VÍTKOVÁ, M., MACKOVÁ, Z., FUKAL, L., LAPČÍK, O.: Enzymová imunoanalýza pro stanovení isoflavonoidů. *Chem. Listy* 98, 1135-1139, ISSN 0009 – 2770, 2004.

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, 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, 79–83, 2000a.

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, 161–165, 2000b.

ŽEMLA, J.: Všeobecná virológia, Slovac Academic Press akademie, 1998.

<http://www.bioreba.ch/>

<http://www.merci.cz/>

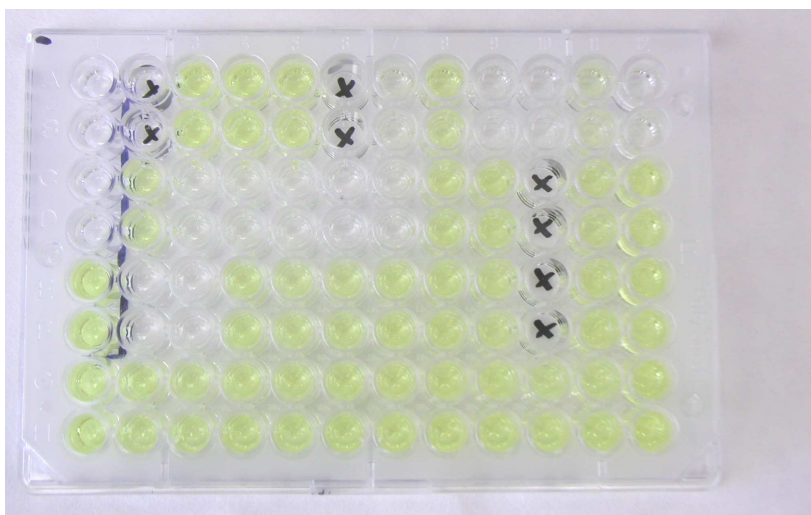
Fotografie J. Špak, 2009.

## 9. PŘÍLOHY

Příloha 1: Magenta- kultivační nádoba (<http://www.surgicalshop.com/>)



Příloha 2: Mikrotitrační destička- výsledek ELISA testu (Špak, 2009)



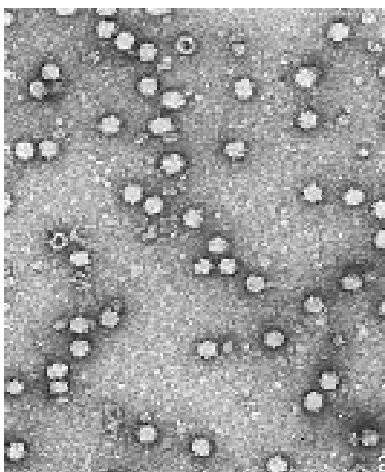
Příloha 3: Promývačka (<http://www.merci.cz/>)



Příloha 4: Homogenizační sáčky (<http://www.bioreba.ch/>)



Příloha 5: Částice viru RaMV v elektronovém mikroskopu (Hertel et al, 2002)



Příloha 6: Rostlina pekingského zelí v kultivační nádobě (Špak, 2009)



Příloha 7: Příznaky RaMV na *Sinapis alba* dvacet dní po inokulaci (Kasalová, 2008)

