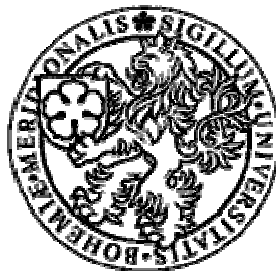


Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Biologická fakulta

Katedra genetiky



## Identifikace vláknitého viru infikující jetel luční (*Trifolium pratense*)



Bakalářská práce

Martina Bečková

Vedoucí práce: Doc. RNDr. Karel Petrzik, CSc.

Biologické centrum v.v.i. AV ČR, Ústav molekulární biologie  
rostlin, oddělení rostlinné virologie

České Budějovice 2007

## Identifikace vláknitého viru infikující jetel luční (*Trifolium pratense*)

Bečková, M., 2007: Identifikace vláknitého viru infikující *Trifolium pratense* [Identification of filamentous virus which infected red clover (*Trifolium pratense*)] - 32 p., Faculty of Biological Sciences, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

### Anotace:

Samples of red clover plants characteristic with dwarf growth were investigated with transmission electron microscopy. Most frequent virus particles observed there were filamentous ones of 300 to 800 nm long. Nucleic acid was isolated, transcribed and amplified using PCR with potexvirus- and potyvirus-specific primers 353G1, 353G2 (Petřík, K., unpublished data), P9502, P0502 (Revers et al., 1999) and Poty2/P4 (Gibbs and Mackenzie, 1997). Successful amplification with potexvirus-specific primers, sequencing and comparison with GenBank sequences revealed *White clover mosaic virus* (WCIMV) there. Coat protein gene of this virus was obtained with amplification and compared with complete sequence of WCIMV from GenBank. O-strain of WCIMV was identified.

Tato práce byla financována z projektů AV ČR:1QS5500510558 a AV0Z50510513.

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně, pouze s použitím citované literatury.

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

V Českých Budějovicích 8. května 2007

.....  
Martina Bečková

## Identifikace vláknitého viru infikující jetel luční (*Trifolium pratense*)

---

---

*Chtěla bych poděkovat svému školiteli Doc. RNDr. Karlu Petrzikovi, CSc. za optimismus, vstřícnost, trpělivost se kterou vedl moji práci i za cenné rady v celém jejím průběhu. Mé poděkování patří ovšem i kolektivu laboratoře za ochotu pomoci a příjemnou pracovní atmosféru. Děkuji také mé rodině a přátelům, kteří mě při práci podporovali.*

---

---

## OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>5</b>
Morfologie .....	5
Nukleové kyseliny a genová exprese.....	6
Přenos infekce.....	6
Taxonomie .....	6
Vláknité viry infikující nebo nalezené na Trifoliu.....	7
<b>MATERIÁLY A METODY</b> .....	<b>10</b>
Rostlinný materiál.....	10
Příprava vzorku pro TEM.....	10
Izolace nukleových kyselin .....	11
Primery.....	12
RT-PCR.....	12
Sekvenování.....	13
Precipitace .....	13
Příprava DIG-labelled sondy .....	14
Dot Blot hybridizace.....	14
Pufry:.....	15
<b>VÝSLEDKY A DISKUZE</b> .....	<b>16</b>
<b>ZKRATKY</b> .....	<b>18</b>
<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b> .....	<b>19</b>
Webové reference .....	19
<b>PŘÍLOHA</b> .....	<b>21</b>
Tab.1. Základní taxonomické rozdělení rostlinných virů .....	21

## Úvod

Viry jsou nebuněčné organismy, které infikují prakticky vše živé. Tato práce je zaměřena na viry rostlinné, jako původce mnoha onemocnění, které jsou často důsledkem ztráty kvality i kvantity zemědělských plodin a mohou tedy vést k velkým ekonomickým problémům. Následky mohou být zvláště dramatické v zemích jejichž ekonomika z velké části, nebo zcela závisí na konkrétním zemědělském produktu (Bos, L., 1999). S rychlostí replikace viru souvisí i časté mutace, které mohou



být ztrátové, nebo naopak výhodné a vést třeba k vytvoření rezistencí. Tedy i viry podléhají selekčním tlakům a i z tohoto důvodu je znalost fytovirů velmi důležitá.

Rostlinná virologie se tedy zabývá detekcí a diagnostikou původců rostlinných onemocnění. Citlivá detekce pak umožní včasné odhalení viru při produkci viruprostých osiv a sadby, jejichž použití je neúčinnější ochranou proti virózám.

## Morfologie

Rostlinný virus je řetězec jedné nebo více molekul nukleových kyselin, obvykle uzavřený v ochranném plášti nebo pláštích z proteinu nebo lipoproteinu, který je schopen organizovat svoji vlastní replikaci pouze uvnitř vhodných hostitelských buněk (Matthews, 1991).

Pro jejich vizualizaci se užívá transmisní elektronové mikroskopie TEM, která umožňuje rozlišit částice podle tvaru a velikosti. Byly pozorovány tvary izometrické, baciliformní, tyčkovité, vláknité, složené a komplexní. Tvar částice je pro viry charakteristickým rysem a jejich velikost je velmi variabilní. Průměr částice se pohybuje kolem 20 nm a nejdelší vláknité viry dosahují i přes 2000 nm. Za tvar i velikost odpovídá proteinový plášť (kapsid), který je tvořen jedním nebo více druhy proteinových molekul. Tyto molekuly rozpoznávají nukleovou kyselinu a navzájem se k sobě řadí podle fyzikálních a chemických afinit. Interakce mezi nukleovou kyselinou a proteinovým pláštěm je vysoce specifická a hraje důležitou roli v utváření konzervativní struktury virové částice. Uspořádání virového pláště určuje symetrii virové částice na helikální a kubickou (Navrátil, M.).

Přehled rostlinných virů je uveden v tabulce (tab.1, viz příloha). Rostlinné viry jsou až na výjimky tvořeny jednoduchým nukleoproteinem bez vnějšího obalu. Pouze zástupci rodů *Reovirus*, *Fijivirus* a *Oryzavirus* mají dvouvrstevný proteinový plášť. Typický lipidový obal mají pouze zástupci *Rhabdoviridae*.

### **Nukleové kyseliny a genová exprese**

Nukleovou kyselinou je jednořetězcová/dvouřetězcová DNA („single/double stranded“ ss/dsDNA) nebo ss/dsRNA. +RNA (positive sense) funguje v hostitelské buňce jako mRNA a je překládána do sekvence aminokyselin bezprostředně po průniku do buňky, zatímco –RNA (negative sense) musí být přepsána virovou RNA polymerázou do komplementárního +RNA vlákna, které funguje jako mRNA a slouží též jako templát pro syntézu dalších vláken –RNA. Nukleová kyselina nese geny pro syntézu strukturních a nestrukturních proteinů důležitých pro virovou replikaci. Základními jsou geny pro polymerázovou transkriptázu a replikázu, transportní proteiny a plášťové proteiny.

Exprese virových genů je zprostředkována ribozomy a kompletním translačním systémem infikované buňky. Za čtení genetické informace viru pomocí tripletového kódu jsou zodpovědné enzymy a faktory hostitelské buňky stejně jako ve zdravé buňce. Virové funkční proteiny jsou obvykle syntetizovány velice rychle (během několika minut) po infekci buňky, strukturní proteiny jsou syntetizovány později. V průběhu infekce hostitelské buňky je tedy zvýhodňována virová genetická informace na úkor genetické informace buněčné. Translace buněčných mRNA během virové infekce může být ovlivněna proteolytickou inaktivací iniciačních faktorů translace, selektivní degradací buněčných mRNA, nebo změnou intrabuněčného prostředí vedoucího k preferenci virových mRNA (Navrátil, M.).

### **Přenos infekce**

Rostlinným virům, na rozdíl od bakteriofágů a živočišných virů, znemožňuje přímou interakci s cytoplazmatickou membránou buněčná stěna. Rostlinné viry tedy pronikají do hostitelské buňky pasivně a geneticky podmíněné interakce s receptory hostitelské buňky probíhají až v cytoplazmě. Infekčnost viru není vždy stejná a u řady zástupců se velmi liší.

Přenos je zprostředkován vektory, mechanickým poškozením, roubováním, semeny, pylem, dotykem rostlin apod. V rostlině se virus šíří z místa poškození plasmodezmaty z buňky do buňky (tomu často napomáhají specifické proteiny, které si virus kóduje např. TGB u *Potexvirů*), poté cévními svazky s asimiláty do kořenů a následně do celé rostliny (Bos, L., 1999).

### **Taxonomie**

Roku 1966 byla založena Mezinárodní komise pro taxonomii virů (International Committee for Taxonomy of Viruses, ICTV), která sjednotila informace dosud známých virů. Obecnými kritérii pro tvorbu systému se staly: typ nukleové kyseliny, symetrie proteinového pláště, přítomnost nebo absence pláště a replikační strategie viru. (tab.1, viz příloha) Nukleotidová sekvencí data jsou shromažďována v databázi *GenBank* (National Center of Biotechnology Information, NCBI).

## Identifikace vláknitého viru infikující jetel luční (*Trifolium pratense*)

### Vláknité viry infikující nebo nalezené na Trifolii

Rod *Trifolium* - jetel - je hostitelem celé řady rostlinných virů. V databázi VIDE (Plant Viruses Online) je uvedeno několik desítek virů schopných infikovat tento rostlinný rod. Jetel luční je schopno infikovat 35 virů, z nichž 12 má vláknité částice. Jsou to zástupci rodů *Potyvirus* (čeleď *Potyviridae*), *Carlavirus* a *Potexvirus* (čeleď *Flexiviridae*). Některé vlastnosti těchto virů jsou uvedeny v následující tabulce (tab.2). Tento výčet však nemusí být vyčerpávající a v našich vzorcích by se mohl vyskytovat i dosud nepopsaný virus s vláknitými částicemi.

**Tab.2: Viry s vláknitými částicemi infikující *Trifolium pratense* a některé jejich**

virus	rod	velikost (nm)	symptomy na jeteli	symptomy na tabáku
Bean yellow mosaic potyvirus	<i>Potyvirus</i>	750	mozaika	chlorotické léze
Clover yellow vein potyvirus	<i>Potyvirus</i>	760	mozaika a chlorotické páskování nebo bez příznaku	nekrotické žloutnutí listů, nesystematické
Pea mosaic potyvirus	<i>Potyvirus</i>	785 - 800	systemická mozaika	+ <sup>1</sup>
Plum pox potyvirus	<i>Potyvirus</i>	764	+	lokální léze
Watermelon mosaic 2 potyvirus	<i>Potyvirus</i>	760	+	+
Muskmelon vein necrosis carlavirus	<i>Carlavirus</i>	674	lokální léze, systemické listové a žilní nekrózy	<b>nevnímavý k infekci</b>
Pea streak carlavirus	<i>Carlavirus</i>	620	+	+
Red clover vein mosaic carlavirus	<i>Carlavirus</i>	645	systemická mozaika, žloutnutí žilek, listové deformace	+
Clover yellow mosaic potexvirus	<i>Potexvirus</i>	540	mozaika s nekrotickými pruhy	<b>nevnímavý k infekci</b>
Narcissus mosaic potexvirus	<i>Potexvirus</i>	550	+	<b>nevnímavý k infekci</b>
Viola mottle potexvirus	<i>Potexvirus</i>	480	+	<b>nevnímavý k infekci</b>
White clover mosaic potexvirus	<i>Potexvirus</i>	480	nekrotické skvrny, nepravidelná mozaika, někdy latentní	<b>nevnímavý k infekci</b>

1 - vnímavý k infekci; symptomy neuváděny

Některé rody čeledí *Potyviridae*, *Flexiviridae* a *Closteroviridae*, počty jejich druhů, rozsahy délek vláknitých zástupců a molekulová hmotnost plášťových proteinů jsou uvedeny v tabulce 3. Velikost částic neznámého vláknitého viru byla původně stanovena na 300 - 800 nm (Fránová, J., osobní sdělení) a tomuto rozmezí neodpovídá pouze velikost Closterovirů, jejichž délka se pohybuje mezi 1250 - 2200 nm.

## Identifikace vláknitého viru infikující jetel luční (*Trifolium pratense*)

rod	Počet druhů	velikost (nm)	Plášťový protein (Mr x 10 <sup>3</sup> )
Capillovirus	3	600 - 1536	31 - 36
Carlavirus	35	610 - 700	26.2
Closterovirus	12	1250 - 2200	18 - 27
Potexvirus	27	470 - 580	37.7
Bymovirus	6	250 - 300; 500 - 600	30 - 47
Potyvirus	128	680 - 900	33 - 34
Trichovirus	4	640 - 760	22 - 27

**Tab.3:** Rody čeledi *Potyviridae*, *Flexiviridae* a *Closteroviridae* - uváděné počty druhů, délek vláknitých částic a molekulové hmotnosti plášťového proteinu. (Bos, L., 1999)

- Rody *Potyvirus* a *Bymovirus* patří do čeledi *Potyviridae*. Genom obsahuje pouze jeden čtecí rámec, který je překládán do polyproteinu a posttranslačně štěpen virovými proteázami.

+ssRNA genom potyvirů o délce přes 9000 nukleotidů má na 5' konci kovalentně připojen VPg protein a na 3' konci nekódující oblast, která končí sekvencí 25 - 100 adeninových zbytků (polyA konec). Polyprotein potyviru (cca 3000 aa) je posttranslačně štěpen virovými proteázami ve specifických místech na 8 funkčních proteinů. Dva z nich (Vpg a CP) jsou přítomny ve virové částici a 6 dalších (protein 1 a 3, helper komponent Hc-Pro, cytoplazmatické inkluze CI(Hel) a jaderné inkluze a (Vpg/pro) a b (Rep) se vyskytují v rámci částice a mohou být izolovány z infikované rostliny). Dva další proteiny označené 6K1 a 6K2 nebyly detekovány *in vivo* (obr.1) (Shukla, D.D. a kol., 1994; Bos, L., 1999).

Viriony potyvirů byly nalezeny v cytoplazmě, jádře, chloroplastu, Golgiho aparátu i buněčné vakuole. Dále se v infikované buňce mohou vyskytovat charakteristické cytoplazmatické (krystalická, amorfni a membránová tělíska) nebo jaderné inkluze (krystalická tělíska). Mnoho potyvirů je přenosných mšicemi (vektory) neperzistentním způsobem s různým stupněm efektivity. Tomuto přenosu napomáhá pomocný protein (HC-Pro). Několik málo potyvirů je přenosných širokou škálou vektorů, a některé jsou omezeny pouze na několik druhů mšic. Kromě vektorů mohou být přenosné mechanickou inokulací, roubováním, semeny i pylem. Infikují celou řadu rostlinných druhů. Jejich rozšíření je celosvětové a jsou běžné hlavně v tropických a subtropických oblastech. (ICTVdB, 00.057.0.01. Potyvirus)



**Obr.1:** Uspořádání genomu rodu *Potyvirus* (čeleď *Potyviridae*)

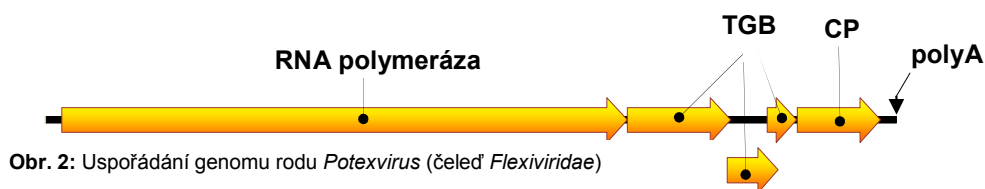
Na rozdíl od všech rodů čeledi *Potyviridae* mají Bymoviry dva typy částic obsahující dvoudílnou ssRNA a nejsou přenosné roubováním, kontaktem rostlin, semeny ani pylem. Přenos infekce je z infikované na zdravou rostlinu zprostředkován mechanickou inokulací, nebo zoosporami houby



## Identifikace vláknitého viru infikující jetel luční (*Trifolium pratense*)

*Polymyxa graminis* (řád *Plasmodiophorales*) parazitující na kořenech rostlin (Bos L., 1999, str.309). Virus může přetrvávat v klidových sporách několik měsíců nebo let. Může být tedy s půdou přenášen na dlouhé vzdálenosti větrem, kontaminovaným osivem nebo zemědělskými stroji. Viriony bymovirů byly nalezeny v cytoplazmě, kde také vytvářejí inkluze (amorfni nebo membránová tělíska) (ICTVdB, 00.057.0.03. Bymovirus).

▪ Rody *Potexvirus*, *Carlavirus*, *Capillovirus* a *Trichovirus* patří to čeledi *Flexiviridae*. ssRNA genom je cca 6000 - 8500 nukleotidů dlouhý, má na 5' konci metylovanou čepičku a na 3' konci polyA sekvenci. Infikují celou řadu jednoděložných i dvouděložných rostlinných druhů a jsou celosvětově rozšířeny.



Potexviry mají metylovanou čepičku ( $m^7GppA$ ), polyA konec a 5 otevřených čtecích rámců (ORF „Open Reading Frame”) (obr.2). První ORF kóduje RNA polymerázu, následující tři ORF tzv. TGB („triple gen block”) kódují proteiny, které zprostředkovávají pohyb mezi buňkami a zbývající ORF kóduje plášťový protein. Viriony byly nalezeny v cytoplazmě, jádru a buněčné vakuole. Stejně jako Potyviry obsahují cytoplazmatické a jaderné inkluze. Jsou přenosné roubováním a mohou být přenosné vektory, mechanickou inokulací, semeny (ne pylem) a kontaktem mezi rostlinami. Přenos vektory (členovci, hmyz, pavoukovci, roztoči) je neperzistentní a některé vyžadují pomocný virus (ICTVdB, 00.056.0.01. *Potexvirus*; NCBI).

*Carlavirus* na rozdíl od *Potexvirů* kóduje 1 až 2 strukturální proteiny, má 6 ORF (také TGB). Přenos infekce se od *Potexvirů* liší pouze nepřenosností kontaktem mezi rostlinami a možností přenosu pylem. Přenos vektory (členovci, hmyz) je semi- nebo neperzistentní. Viriony se vyskytují v cytoplazmě, chloroplastu, mitochondrii a vytvářejí cytoplazmatické inkluze (ICTVdB, 00.056.0.04. *Carlavirus*).

*Capilloviry* kódují 1 strukturální protein - plášťový protein (CP „coat protein”) a 2 nestrukturální proteiny. Nejsou přenosné vektory, avšak některé mechanickou inokulací nebo semeny. Viriony byly nalezeny v cytoplazmě nebo jádru a vytvářejí cytoplazmatické inkluze z amorfních tělísek (ICTVdB, 00.056.0.06. *Capillovirus*).

*Trichoviry* kódují stejný počet proteinů jako *Capilloviry*, mají 5 až 7 ORF. Jsou přenosné vektory (členovci, hmyzem, pavoukovci a roztoči) semiperzistentním přenosem, a je zapotřebí pomocného viru. Dále pylem do semen a někdy mechanickou inokulací nebo semeny. Nebyly nalezeny žádné inkluze, a viriony pouze v cytoplazmě (ICTVdB, 00.056.0.08. *Trichovirus*).

## Materiály a metody

Pro identifikaci viru byla využita transmisní elektronová mikroskopie (TEM) a dále provedena izolace nukleových kyselin, reverzní transkripce (RT), polymerázová řetězová reakce (PCR), Dot Blot hybridizace a sekvenování.

### Rostlinný materiál

V rostlinách jetele lučního (*Trifolium pratense*), který byl s příznaky zakrslosti odebrán z porostů šlechtitelské stanice v Hladkých Životicích, byla pozorována směsná infekce fytoplazmy a několika rostlinných virů. Bylo nalezeno několik typů virových částic (Fránová, J. a kol., 2005): ohebné vláknité částice o délce 300 - 800 nm (obr.3), ojedinělé obalené částice střelového tvaru typické pro rhabdoviry (obr.4) a bacilovité částice s viditelnou strukturou připomínající zástupce rodu *Varicosavirus* (obr.5). Vláknité viriony převažovaly ve všech vzorcích.

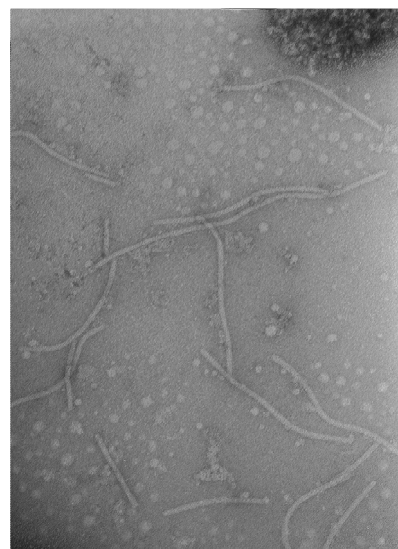
Mechanickou inokulací byl úspěšně přenesen pouze tento virus na laboratorního hostitele - tabák *Nicotiana occidentalis* 37B, jak bylo ověřeno elektronovou mikroskopií (Fránová, J. a kol., 2005). Rhabdoviry ani varicosaviry nejsou mechanicky přenosné.

Další vzorky byly odebírány náhodně v různých lokalitách Moravy, jižních, severních a středních Čech. Hlavním příznakem infekce byla zakrslost rostliny. Testováno bylo listové pletivo rostlin z čeledi bobovitých (*Fabaceae*): jetel luční (*Trifolium pratense*), jetel plazivý (*Trifolium repens*), vikev úzkolistá (*Vicia angustifolia*).

### Příprava vzorku pro TEM

Preparát pro transmisní elektronovou mikroskopii byl připraven smáčecí metodou. Vzorek byl nanesen na kovovou síťku potaženou uhlíkovým filmem a barven uranylacetátem. Testováno bylo listové pletivo.

Délky vláknitých virů z pořízených snímků byly změřeny pomocí křivky v programu AutoCAD 2006 (Computer-aided design).



**Obr.3:** Viriony částečně purifikovaného vláknitého viru z jetele lučního kontrastované uranylacetátem. Zvětšení 60 000x. Foto: Fránová, J.

### **Izolace nukleových kyselin**

Izolace RNA byla provedena použitím RNeasy Mini kitu (QIAGEN) a RNA Blue (kat.č. 013, Top-Bio, Česká republika) podle návodů.

#### ***RNeasy Mini kit (QIAGEN)***

- 100 µl listového pletiva bylo homogenizováno se 450 µl pufru RLT obsahujícího guanidin isothiokyanatan.
- Homogenát byl centrifugován při 15 000 g po 2 minuty přes kolonu, která odstraňuje buněčný materiál. (Projde jen malé množství buněčného materiálu, který vytvoří pellet na dně zkumavky.)
- K 450 µl supernatantu byla přidána polovina objemu 96% etanolu, promícháno a centrifugováno 8 000 g 15 sekund přes kolonu, která zachytí RNA.
- Kontaminující látky byly z membrány odstraněny promývacími pufrými (RW1, RPE obsahujícími etanol) a centrifugovány vždy při 8 000 g.
- Následně byla RNA extrahována z membrány do 30 µl H<sub>2</sub>O centrifugací při 15 000 g 1 minutu.
- Všechny centrifugace byly prováděny při 20 - 25°C.

#### ***RNA Blue ( Top-Bio, Česká republika)***

- 100 mg listového pletiva bylo homogenizováno v 1 ml RNA Blue a homogenát ponechán ve zkumavce (Ependorf) 5 minut při 20°C.
- K homogenátu bylo přidáno 0.2 ml chloroformu, promícháno a opět inkubováno 5 minut při pokojové teplotě.
- Po centrifugaci při 12 000 g po dobu 10 minut při 4°C, byla odebrána horní bezbarvá vodní fáze.
- K fázi bylo přidáno 0.5 ml izopropylalkoholu a inkubováno 10 minut při 4°C.
- Poté centrifugováno při 12 000 g po dobu 10 minut při 4°C (po centrifugaci se RNA nachází na dně a po stranách zkumavky).
- Supernatant byl odstraněn a k sedimentu přidán 1 ml 75% etanolu; promícháno a sedimentováno centrifugací 5 minut při 4°C.
- Supernatant byl odstraněn a sediment vysušen na cetrivapu 5 - 10 minut.
- Po vysušení byl sediment rozpuštěn v 50 µl H<sub>2</sub>O.

## Identifikace vláknitého viru infikující jetel luční (*Trifolium pratense*)

### **Primery**

Pro RT-PCR a sekvenační reakce byly použity tyto primery:

321E8            5'- CGT GTA TCT TCT AGT CTT CAT TGT - 3'  
321E7            5'- GGA TAA GTA ATA AGA GGG GCA ATA - 3'  
353G1 up        5'- TTYCTNAARTCNARTGGGTCA - 3' (Petrzik, K., nepublikované údaje)  
353G2 re        5'- GCATCAAAGTGGGRCCTTC - 3' (Petrzik, K., nepublikované údaje)  
P9502/CPUP, poty.re P0502 (Revers a kol., 1999)  
Poty2/P4 (Gibbs a Mackenzie, 1997)

### **RT-PCR**

Pro amplifikaci genu CP proteinu byl použit „Access RT-PCR System Kit“ (Promega, Madison, USA), obsahující AMV reverzní transkriptázu a *Tfl*-polymerázu. V jedné reakci tak dochází k reverzní transkripci a následně k amplifikaci získané DNA.

### **Reakční směs:**

Access Quick 2x pufr	10 µl
primery (321E7,321E8) po	1 µl (20 µmol/l)
AMV	0.5 µl (x U)
RNA izolát	1 µl
H <sub>2</sub> O	6.5 µl
Celkem	20 µl

### **Programové schéma:**

**RT:** 45 minut při 48°C  
3 minuty při 94°C

**PCR :** 30 cyklů: 30 sekund při 94°C (denaturace)  
30 sekund při 50°C (annealing)  
1 minuta při 68°C (extension)  
5 minut při 72°C

### **Gel**

Pro kontrolu amplifikovaného produktu byla použita agarózová gelová elektroforéza (1.5% agaróza v 0.5 x TBE pufru, pH = 8.3; barveno: syber green).

### **Sekvenování**

Amplifikační DNA produkty byly přečištěny pomocí kitů „Gen Elute™ PCR Clean - Up Kit nebo Gen Elute™ Gel Extraction Kit“ (Sigma, USA):

- Bylo použito kolonky s membránou pro zachycení nukleové kyseliny. Membrána byla promývána roztoky obsahujícími etanol a vysušena centrifugací. Poté byla nukleová kyselina z membrány vymyta 30  $\mu$ l elučního pufru.
- Při extrakci z gelu předcházelo tomuto postupu rozpuštění gelu s PCR produktem v rozpouštěcím roztoku při 60°C a přidáním izopropanolu, který zabrání opětovnému ztuhnutí při snížení teploty.
- Všechny centrifugace byly prováděny při 12 000 g - 14 000 g.

Pro sekvenaci byly použity stejné primery, jako pro RT-PCR (321E7 a 321 E8).

Sekvenační reakce byla provedena pomocí kitu „Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction“ (Promega) a výsledky zpracovány programem VectorNTI 8.

#### **Sekvenační reakce:**

MIX (Sequencing PR-100)	2 $\mu$ l
pufr 5x	3 $\mu$ l
primer (321E7/321E8)	1 $\mu$ l (20 $\mu$ mol/l)
PCR produkt	6 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	8 $\mu$ l
celkem	20 $\mu$ l

#### **Programové schéma:**

30 cyklů: 10 sekund při 96°C  
5 sekund při 50°C  
4 minuty při 60°C

#### **Precipitace:**

- K 20  $\mu$ l produktu bylo přidáno 80  $\mu$ l 75% izopropanolu, ponecháno 15 minut při 20°C a poté centrifugováno při 17 000 g a 4°C po dobu 15 minut.
- Supernatant byl odsán a k sedimentu přidáno 200  $\mu$ l 70% etanolu, promícháno a centrifugováno při 17 000 g a 4°C po dobu 5 minut.
- Supernatant byl odsán a sediment vysušen na cetrivapu (10 - 15 minut).

## Identifikace vláknitého viru infikující jetel luční (*Trifolium pratense*)

### **Příprava DIG-labelled sondy (DIG-labelling kit, Boehringer, Mannheim)**

- 54 µl izolované DNA bylo denaturováno 5 minut.
- Ochlazeno na ledu.
- Do zkumavky chlazené na ledu bylo přidáno: 12 µl směs náhodných hexamerů  
12 µl dNTP  
36 µl H<sub>2</sub>O (doplnění objemu na 114 µl)  
+ 6 µl Klenow
- Inkubováno 1 hodinu při 37°C.
- Reakce byla zastavena 12 µl 0.2M EDTA, 15 µl 4M LiCl a 450 µl předchlazeného 95% etanolu.
- Inkubováno 30 minut při -70°C.
- Centrifugováno 20 minut při 14 000 g.
- Supernatant byl odstraněn a sediment promyt 200 µl 70% etanolu.
- Sediment vysušen na centrifapu.

### **Dot Blot hybridizace**

- Nylonová membrána byla napuštěna 2xSSC a na vlhkou membránu nanášeny vzorky (2 µl PCR produktu).
- Vzorky fixovány 20 minut ve flowboxu pod UV.
- Prehybridizace 1 hodinu při 68°C v hybridizačním pufru (20 ml).
- Bylo denaturováno 15 µl sondy po dobu 5 minut, ochlazeno na ledu .
- Sonda byla přidána do 7 ml hybridizačního pufru (v něm nylonová membrána) a inkubována přes noc při 68°C.
- Membrána byla promyta 2x po 5 minutách v 2xSSC při 20°C, 2x po 15 minutách v 0.1xSSC při 68°C (50 ml/100 cm<sup>2</sup>) a 1 minutu v promývacím pufru při 20°C.
- Inkubována 30 minut v pufru 2 na třepačce při 20°C (100ml).
- Reakce s anti-DIG-AP IgG ředěné 1 : 5000 v pufru 2, 30 minut na třepačce při 20°C (1 µl anti-DIG-AP IgG a 5 ml pufru 2).
- Dále byla membrána vymývána 2x po 15 minutách pufrům 1 při 20°C a stabilizována po 2 minuty v pufru 3.
- Barevná reakce: 45 µl NBT a 30 µl x-fosfátu v 10 ml pufru 3.
- Inkubováno ve tmě.
- Po vývoji barvy byla membrána promyta po 5 minut v pufru 4.

Identifikace vláknitého viru infikující jetel luční (*Trifolium pratense*)

**Pufry:**

20xSSC	100 ml
3M NaCl	17.53 g
0.3M citronan sodný	8.82 g
pH	7.0

Pufr 1	1l
0.1M kys. maleinová	11.60 g
0.15M NaCl	8.76 g
pH	7.5

10% blokovací roztok v pufru 1

Pufr 3	0.5 l
1M Tris	6.05 g
3M NaCl	2.92 g
0.5M MgCl <sub>2</sub>	5.83 g
pH	9.5

Pufr 4	250 ml
1M Tris	2.5 ml
0.5M EDTA	0.5 ml
pH	8.0

Hybridizační pufr	250 ml
20xSSC	62.5 ml
10% blokovací roztok	25.0 ml
10% laurylsarcosyl	2.5 ml
10% SDS	0.5 ml

Promývací pufr	
Pufr 1	250 ml
Tween 20	0.75 ml

## Výsledky a diskuze

**Data nebyly publikovány, a z tohoto důvodu nejsou prezentovány elektronickou cestou. Originál této práce v tištěné podobě je archivován v knihovně biologických ústavů AV ČR a Biologické fakulty JU v Českých Budějovicích.**



## Závěr

Neznámý vláknitý virus nalezený ve vzorcích jetele lučního (vzorek 12/13), pocházející ze šlechtitelské stanice v Hladkých Životicích, jsme identifikovali na základě transmisní elektronové mikroskopie a metody amplifikace *in vitro* pomocí rodově specifických primerů zachycující viry rodu Potexvirus jako **White clover mosaic virus** WCIMV kmenu O. Sekvence plášťového proteinu vzorku 12/13 je umístěna v databázi GenBank DQ784572 (Fránová, J. a kol., 2006). Dále jsme otestovali čtyřicet vzorků bobovitých rostlin odebraných náhodně z pěti lokalit. Virus jsme prokázali ve čtyřech vzorcích jetele lučního a v pěti jetele plazivého. Čtyři získané kompletní sekvence plášťového proteinu byly porovnány s kompletní sekvencí WCIMV z GenBank NC\_003820 (Forster, R.L. a kol., 2006). Mutace jsme zjistili ve třiceti pozicích a jednalo se pouze o tranzice. Celková variabilita byla stanovena na 5.23%.

Nejvíce substitucí se vyskytovalo ve třetích pozicích a na aminokyselinovou sekvenci neměly žádný vliv. Dále jsme odhalili čtyři substituce v první, a jednu ve druhé pozici, které se projeví změnou aminokyseliny. V nukleotidových sekvencích se objevovaly mutace omezené pouze na jetel luční nebo jetel plazivý. Jsou patrné i v aminokyselinových sekvencích, kde tři záměny jsou patrné jen u jetele plazivého, jedna u jetele lučního a jedna záměna je společná oběma druhům.

Z nízkého počtu mutací je patrné, že se jedná o konzervovanou oblast a pro virus je sekvence plášťového proteinu, jako jediného strukturního proteinu, důležitým prvkem jeho existence. Neotestovali jsme však mnoho vzorků a získali jen málo sekvencí, abychom mohli uvést podrobnější závěry. Virus je zřejmě běžně rozšířen v mírných oblastech, ale jeho koncentrace v rostlině nemusí být příliš vysoká.

Kromě WCIMV se ve vzorcích mohly vyskytovat i vláknité částice jiného viru, ale pokud nebyl přenosný mechanickou inokulací a jeho koncentrace v rostlině nebyla dostatečně vysoká, nepodařilo se nám jej detekovat. U testovaných vzorků jetele jsme se setkali se zakrslostí rostliny a řada těchto vzorků byla na WCIMV pozitivní. Zakrslost však mohla být způsobena jiným virem nebo působením kombinace virů, které jsme ve směsné infekci vzorku 12/13 neobjevili. Je-li tento virus původcem zakrslosti jetele lučního, případně jiných rostlin, má jeho výskyt velký význam v pěstitelství a hospodářství.

## Zkratky

aa	„amino acid“ aminokyselina
CP	„coat protein“ plášťový protein
cDNA	„copy DNA“ = RNA přepsaná reverzní transkriptázou do DNA
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dsRNA/DNA	„double strand“ dvojláknová RNA/DNA
ssRNA/DNA	„single strand“ jednovláknová RNA/DNA
mRNA	„messenger RNA“ „posel“ RNA nesoucí přepis genu z DNA k překlada do proteinu
nt	„nukleotid“ nukleotid
ORF	„open reading frame“ otevřený čtecí rámeček
pb	„bp - base pair“ česky pb – pár bází
PCR	„polymerase chain reaction“ polymerázová řetězová reakce
RNA	ribonukleová kyselina
RT	„reverse transcription“ reverzní transkripce
sp.	„species“ druh
TEM	„transmission electron microscopy“ transmisní elektronová mikroskopie
TGB	„triple gen block“

## Seznam použité literatury

- Bos, L.: Plant viruses, unique pathogens – textbook of plant virology. Backhuys Publishers leiden. 1999, str. 147 - 149, 247, 305, 309.
- Fránová, J., Paltrinieri, S., Botti, S., Šimková, M., Bertaccini, A. (2005) Clover dwarf - complex virus and phytoplasma disease. 6<sup>th</sup> International Symposium Recent Advances in Plant Biotechnology, Č. Budějovice 12-16.9.2005., str. 83.
- Fránová, J., Petrzik, K., Bečková, M., Jokešová, H. (2006) Identification of potexvirus from virus mixed infection of red clover. XVIIIth Czech and Slovak Plant Protection Conference, 12. - 14.9.2006., str. 19.
- Gibbs, A., Mackenzie, A. (1997) A primer pair for amplifying part of the genome of all potyvirids by RT-PCR. Journal of Virological Methods, 63: 9-16.
- Revers, F., Van der Vlugt, R.A.A., Souche, S., Lanneau, M., Lot, H., Candresse, T., Le Gall, O. (1999) Nucleotide sequence of the 3' terminal region of the genome of four Lettuce mosaic virus isolates from Greece and Yemen. Archives of Virology, 144: 1619-1626.
- Shukla, D.D., Ward, C.W., Brunt, A.A.: The Potyviridae. CAB INTERNATIONAL 1994, str. 74, 78 - 79.

### Webové reference

- Forster, R.L., Bevan, M.W., Harbison, S.A., Gardner, R.C. (2006) The complete nucleotide sequence of the potexvirus white clover mosaic virus. National Center for Biotechnology Information NCBI, NC\_003820.
- Franova, J., Petrzik, K., Beckova, M., Jokesova, H. (2006) Identification of potexvirus from virus mixed infection of red clover. National Center for Biotechnology Information NCBI, DQ784572.
- International Comitee for Taxonomy of Viruses, ICTV.
- ICTVdB - The Universal Virus Database, version 4. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/>
- ICTVdB Management (2006). 00.056.0.01.021. White clover mosaic virus. In: ICTVdB - The Universal Virus Database, version 4. Büchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA.
- ICTVdB Management (2006). 00.056.0.01. Potexvirus. In: ICTVdB - The Universal Virus Database, version 4. Büchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA.

Identifikace vláknitého viru infikující jetel luční (*Trifolium pratense*)

- ICTVdB Management (2006). 00.056.0.04. Carlavirus. In: ICTVdB - The Universal Virus Database, version 4. Büchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA.
- ICTVdB Management (2006). 00.056.0.08. Trichovirus. In: ICTVdB - The Universal Virus Database, version 4. Büchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA.
- ICTVdB Management (2006). 00.056.0.06. Capillovirus. In: ICTVdB - The Universal Virus Database, version 4. Büchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA.
- ICTVdB Management (2006). 00.057.0.01. Potyvirus. In: ICTVdB - The Universal Virus Database, version 4. Büchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA.
- ICTVdB Management (2006). 00.057.0.03. Bymovirus. In: ICTVdB - The Universal Virus Database, version 4. Büchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA.
- Viruses Identification Data Exchange VIDE (Boswell and Gibbs, 1983; Boswell and Gibbs, 1986; Boswell, Dallwitz, Gibbs and Watson, 1986; Brunt, Crabtree and Gibbs, 1990; Büchen-Osmond, Crabtree, Gibbs and McLean, 1988; Watson, Dallwitz, Gibbs and Pankhurst, 1988; Brunt et al., 1996).
- Virus Taxonomy: 8th Reports of the International Committee on Taxonomy of Viruses. C.M. Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L.A. (eds), Academic Press, 1162 pp. (2005) Elsevier, Publication Date: 27 May 2005.
- Skripta UP Olomouc - Navrátil, M.: Základy virologie na <http://genetika.upol.cz>.

Identifikace vláknitého viru infikující jetel luční (*Trifolium pratense*)

## Příloha

Tab.1. Základní taxonomické rozdělení rostlinných virů (Virus Taxonomy, 2005; ICTVdB).

typ	NK	čeleď	rod	Tvar	druh
DNA	ssDNA	<i>Geminiviridae</i>	<i>Mastrevirus</i>	gem	Maize streak virus
			<i>Curtovirus</i>	gem	Beet curly top virus
			<i>Begomovirus</i>	gem	Bean golden yellow mosaic virus
			<i>Topocuvirus</i>		Tomato pseudo-curly top virus
		<i>Nanoviridae</i>	<i>Nanovirus</i>	iso	Subterranean clover stunt virus
	<i>Babuvirus</i>		iso	Banana bunchy top virus	
	dsDNA-RT	<i>Caulimoviridae</i>	<i>Caulimovirus</i>	iso	Cauliflower mosaic virus
			<i>Soymovirus</i>	bac	Soybean chlorotic mottle virus
			<i>Cavemovirus</i>		Cassava vein mosaic virus
			<i>Tungrovirus</i>	bac	Rice tungro bacilliform virus
<i>Badnavirus</i>			bac	Commelia yellow mottle virus	
<i>Petuvirus</i>			bac	Petunia vein clearing virus	
RNA	ssRNA-RT	<i>Metaviridae</i>	<i>Metavirus</i>		<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Ty 3 virus
		<i>Pseudoviridae</i>	<i>Pseudovirus</i>	iso + env	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Ty 1 virus
			<i>Sirevirus</i>	iso	Glycine max SIRE1 virus
	dsRNA	<i>Partitiviridae</i>	<i>Alphacryptovirus</i>	iso	White clover cryptic virus 1
			<i>Betacryptovirus</i>	iso	White clover cryptic virus 2
		<i>Reoviridae</i>	<i>Fijivirus</i>	iso	Fiji disease virus
			<i>Phytoreovirus</i>	iso	Wound tumor virus
			<i>Oryzavirus</i>	iso	Rice ragged stunt virus
		-	<i>Endornavirus</i>	-	<i>Vicia faba</i> endornavirus
		-	<i>Varicosavirus</i>	rod	Lettuce big-vein associated virus
	ssRNA (-)	<i>Bunyaviridae</i>	<i>Tospovirus</i>	iso + env	Tomato spotted wilt virus
		<i>Rhabdoviridae</i>	<i>Cytorhabdovirus</i>	bac + env	Lettuce necrotic yellow virus
			<i>Nucleorhabdovirus</i>	bac + env	Potato yellow dwarf virus
	ssRNA (+)	<i>Bromoviridae</i>	<i>Alfavirus</i>	bac	Alfalfa mosaic virus
			<i>Ilarvirus</i>	iso+bac	Tobacco streak virus
			<i>Bromovirus</i>	iso	Brome mosaic virus
			<i>Cucumovirus</i>	iso	Cucumber mosaic virus
			<i>Oleavirus</i>	iso/bac + pol	Olive latent virus 2
		<i>Closteroviridae</i>	<i>Closterovirus</i>	fil	Beet yellows virus
			<i>Crinivirus</i>	fil	Lettuce infectious yellows virus
			<i>Ampelovirus</i>	fil	Grapevine leafroll-associated virus
		<i>Comoviridae</i>	<i>Comovirus</i>	iso	Cowpea mosaic virus
			<i>Fabavirus</i>	iso	Broad bean wilt virus 1
			<i>Nepovirus</i>	iso	Tobacco ringspot virus
		<i>Flexiviridae</i>	<i>Potexvirus</i>	fil	Potato virus X
			<i>Mandarivirus</i>	fil	Indian citrus ringspot virus
			<i>Allexivirus</i>	fil	Shallot virus X
			<i>Carlavirus</i>	fil	Carnation latent virus
			<i>Foveavirus</i>	fil	Apple stem pitting virus
			<i>Capillovirus</i>	fil	Apple stem grooving virus
<i>Vitivirus</i>	fil		Grapevine virus A		
<i>Trichovirus</i>	fil	Apple chlorotic leaf spot virus			

Identifikace vláknitého viru infikující jetel luční (*Trifolium pratense*)

	<i>Luteoviridae</i>	<i>Luteovirus</i>	iso	Barley yellow dwarf virus - PAV
		<i>Polerovirus</i>	iso	Potato leafroll virus
		<i>Enamovirus</i>	iso	Pea enation mosaic virus-1
	<i>Potyviridae</i>	<i>Potyvirus</i>	fil	Potato virus Y
		<i>Rymovirus</i>	fil	Reygrass mosaic virus
		<i>Bymovirus</i>	fil	Barley yellow mosaic virus
		<i>Macluravirus</i>	fil	Maclura mosaic virus
		<i>Ipomovirus</i>	fil	Sweet potato mild mottle virus
		<i>Tritimovirus</i>	fil	Wheat streak mosaic virus
	<i>Sequiviridae</i>	<i>Sequivirus</i>	iso + pol	Parsnip yellow fleck virus
		<i>Waikavirus</i>	iso + pol	Rice tungro spherical virus
	<i>Tombusviridae</i>	<i>Tombusvirus</i>	iso	Tomato bushy stunt virus
		<i>Carmovirus</i>	iso	Carnation mottle virus
		<i>Necrovirus</i>	iso	Tobacco necrosis virus A
		<i>Dianthovirus</i>	iso	Carnation ring-spot virus
		<i>Machlomovirus</i>	iso	Maize chlorotic mottle virus
		<i>Avenavirus</i>	iso	Oat chlorotic stunt virus
		<i>Aureusvirus</i>	iso	Pothos latent virus
		<i>Panicovirus</i>	iso	Panicum mosaic virus
	<i>Tymoviridae</i>	<i>Maculavirus</i>	iso	Grapevine fleck virus
		<i>Tymovirus</i>	iso	Turnip yellow mosaic virus
		<i>Marafivirus</i>	iso	Maize rayado fino virus
	-	<i>Cheravirus</i>	iso	Cherry rasp leaf virus
	-	<i>Benyvirus</i>	rod	Beet necrotic yellow vein virus
	-	<i>Furovirus</i>	rod	Soil-borne wheat mosaic virus
	-	<i>Hordeivirus</i>	rod	Barley stripe mosaic virus
	-	<i>Idaeovirus</i>	iso	Raspberry bushy dwarf virus
-	<i>Ourmiavirus</i>	bac	Ourmia melon virus	
-	<i>Pecluvirus</i>	rod	Peanut clump virus	
-	<i>Pomovirus</i>	rod	Potato mop-top virus	
-	<i>Sadwavirus</i>	iso	Satsuma dwarf virus	
-	<i>Sobemovirus</i>	iso	Southern bean mosaic virus	
-	<i>Tobamovirus</i>	rod	Tobacco mosaic virus	
-	<i>Tobravirus</i>	rod	Tobacco rattle virus	
-	<i>Umbravirus</i>	-	Carrot mottle virus	

Zkratky: zdvojený „geminat“ (**gem**), baciliformní (**bac**), vláknitý „filamentous“ (**fil**), s lipidovým obalem „enveloped“ (**env**), izometrické (**iso**), mnohostěnný „polyhedral“ (**pol**), tyčkovitý „rod-like“ (**rod**)