

Biologická fakulta Jihočeské univerzity
v Českých Budějovicích



Bakalářská práce

Vyhledávací průzkum virů v
kaprad'orostech

Eva Hojerová
2007

Vedoucí práce: Doc. RNDr. Karel Petrzik CSc.

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 fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích, 9. 5. 2007.

.....
Eva Hojerová

Eva Hojerová (2007): Vyhledávací průzkum virů v kaprad'orostech. [Detection of viruses in pteridosperm. Bc. thesis, in Czech] -32 p, Faculty of Biological Sciences, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

Four methods were used for finding of viruses in ferns (*Pteridophyta*). Isometric virus-like particles were firstly found in several samples. Double stranded RNA of putative viral origin was isolated from another sample and spectrum of amplicons was obtained from another material managed as virus-containing.

Tato práce byla finančně podporována z projektů - AV0Z50510513 AV CR a GAAV č.QS5500510558.

Obsah

Úvod	5
Rostlinné viry	5
Kapradořosty	6
Kapradořina – virus	8
Fytoterapie	12
Fytodiagnostika	12
Cíle práce	14
Materiál a metody	15
Rostlinný materiál	15
Metody	15
Izolace dsRNA	15
Purifikace virů	16
Izolace RNA (RNeasy Mini Kit, Quiagen).....	17
Detekce potyvirů RT- PCR (Gibbs, 1997).....	17
Detekce virů metodou podle Allander a kol. (2001).....	18
Výsledky a diskuse	21
Vzorky	21
Izolace dsRNA	23
Purifikace virů	24
Detekce virů metodou podle Allander a kol. (2001).....	27
Detekce potyvirů RT- PCR (Gibbs, 1997).....	29
Závěr	30
Cítace	31

Úvod

Rostlinné viry

Viry jsou subcelulární patogeny tvořené molekulami nukleové kyseliny (jedné nebo více), obvykle obalené proteinovou nebo lipoproteinovou schránkou zvanou kapsida. Jejich nukleová kyselina kóduje enzymy, obalové a nestrukturní proteiny. Reprodukce viru je plně vázaná na buňku hostitele. Rostlinné buňky jsou chráněné buněčnou stěnou a viry samy o sobě nemohou proniknout do cytoplasmy (jako je tomu u živočišných virů – aktivní vstup přes receptory). Buněčnou stěnu překonávají v místech jejího poškození, prostřednictvím vektorů – hmyzem, houbou, háďátky, roztoči. Vztah mezi virem a jeho vektorem je často úzce specifický. Mezi hostiteli se viry šíří vegetativní cestou, pylem, semeny, kokoticí. K systémové infekci rostliny dochází prostým pohybem virových částic nebo virové nukleové kyseliny vodivým systémem a mezibuněčnými spoji - plasmodesmaty.

Pro účely výzkumu, rostlinolékařství a diagnostiky fytovirů se některé rostlinné viry mechanicky inokulují (přenáší kokoticí, vektory, roubováním) na diferenční indikátorové rostliny.

Od doby, kdy Dimitrij Ivanovský v roce 1892 poprvé popsal „patogenní“ agens, později pojmenovanou *virus*, je známo na 1765 druhů virů (VIDE databáze, 2005) a další se neustále objevují.

Stejně tak se objevují noví hostitelé a vektory.

Kaprad'orosty

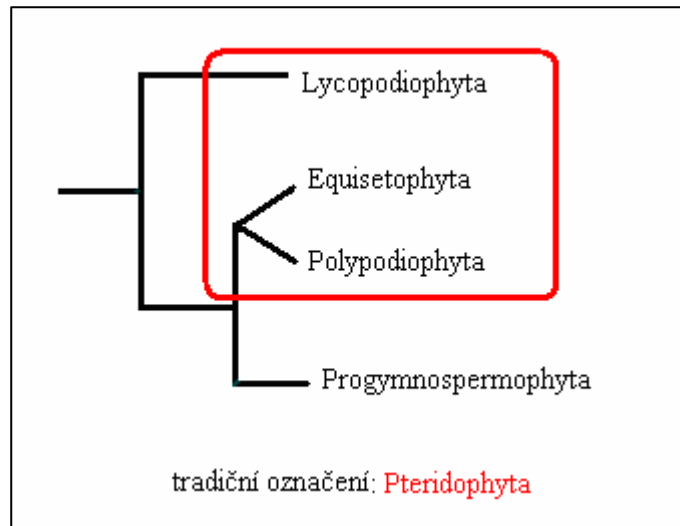


(*Dryopteris filix-mas*, *Lycopodium annotinum*)

Kaprad'orosty (*Pteridophyta*) jsou bazální skupinou cévnatých rostlin, jejichž zástupci patří k nejstarším rostlinám osídlujících Zemi, a to již přibližně 400 milionů let. Recentně je známo na 12 000 druhů celosvětově rozšířených kaprad'orostů osídlujících téměř všechny biotopy.

Vyskytují se především ve vlhku, stínu a na místech s extrémními podmínkami. Mezi jednotlivými rody nalézáme velkou diverzitu - ve fyziologii rostlin, reprodukční i životní strategii.

Kaprad'orosty jsou děleny do tří skupin: plavuně (*Lycopodiophyta*), přesličky (*Equisetophyta*), kapradiny (*Polypodiophyta*).



Podle: Štech, 2005
(<http://botanika.bf.jcu.cz/systematikaweb/systematikauvod.htm>)

Na území České republiky se vyskytují všechna tři oddělení, přičemž kapradiny jsou nejpočetnější a nejrozšířenější. Jejich nadzemní části nejsou (až na výjimky) zákonem chráněné (narozdíl od plavuní) a sběr je tedy téměř neomezený. Kapradiny jsou v rámci kaprad'orostů nejvhodnějším organismem pro náš záměr – najít v nich virus.

Kapradina – virus

Interakce těchto dvou organismů mohou existovat už miliony let. Zkoumání recentních vztahů by mohlo nastínit pravděpodobnost výskytu virů u fosilních kapradin, případně přispět k určení počátku viróz na naší planetě.

Přestože jsou kapradiny základní složkou mnoha ekosystémů i kulturními rostlinami estetického významu, není o interakcích kapradina – patogen mnoho studií ani poznatků. Přitom není žádný důvod pro absenci virů v těchto hostitelích. Viry byly nalezeny v množství krytosemenných rostlin, podstatně méně výskytů virů známe u zástupců nahosemenných rostlin:

Je to například *Arabis mosaic nepovirus* (ArMV) infikující cypřišovitě (*Cupressaceae*) a *Cycas necrotic stunt nepovirus* (CNSV) na cykasech (*Cycadaceae*) (<http://image.fs.uidaho.edu/vide/famly051.htm>). V čeledi borovicovitých (*Pinaceae*) se na smrcích (*Picea rubens*, *Picea mariana*) vyskytují viry rodu tobamovirus (Jakobi, 1992) a tenuivirus (Castello, 2000).

Tobamoviry infikují též mechorosty. Konkrétně rody ploník (*Polytrichum*) a sečovka (*Barbilophozia*) (Polischuk, 2007).

Ani u řas není příliš široké spektrum virů. Jsou známy jako hostitelé dvou tříd virů – *Marnaviridae* (+ssRNA viry) a *Phycodnaviridae* (dsDNA viry) (<http://ictvdb.rothsmsted.ac.uk/Ictv/index.htm>).

Jak už bylo zmíněno, ani u kapradin není příliš mnoho skutečností informujících o jejich fyto-virech. Zde uvádím výčet dat o virech detekovaných v kapradinách publikovaných za přibližně posledních 50 let:

Již v 60. letech v práci Blattného a Pilouse (1953) je uváděno mnoho případů kaprad'orostů vykazujících chorobné zjevy s podezřením na virózový původ. V konkrétních případech popisují nanismus a blednutí, často spojené s předčasným

opadem lístků nebo jejich nahloučením na rostlině. Tyto příznaky byly nalezeny na slezinících (*Asplenium viride*, *A. trichomanes*, *A. ruta muraria*).

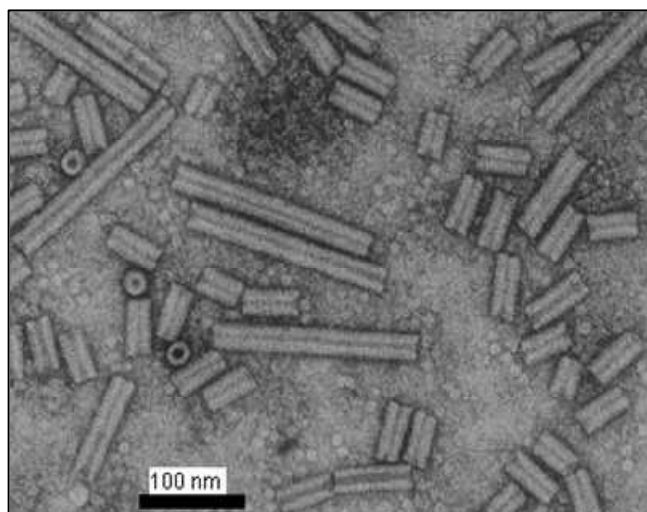
Taktéž asymetrie listů a lístků, různé deformace, barevné a jiné anomálie byly pozorovány na zástupcích kaprad'ovitých (*Dryopteridaceae*) a papradkovitých (*Woodsiaceae*).

V publikaci „Virusové choroby rastlín“ (Bojňanský, 1963) jsou popisována onemocnění s pravděpodobnou virovou etiologií. Jsou to především deformace a nesouměrnost listů, často doprovázené barevnými změnami. U druhu ledviník (*Nephrolepis*) se vyskytují nepravidelnosti ve zpeření a zbarvení listů a neklíčivost výtrusů.

Dále je zde popisována žlutá zakrslost kapradiny, kdy rostliny vykazují zakrslost a blednutí listů.

V roce 1967 byly v botanické zahradě Cambridžské univerzity (Cornwall) na pokroucených, skvrnitých a menších listech jeleního jazyku (*Phyllitis scolopendrium*) nalezeny částice viru připomínajícího tobnavirus (Hull, 1968). Virus měl částice tyčinkovitého tvaru o délce 135 nm a 320 nm a šířce 22 nm. Virus byl vyfocen na elektronovém mikroskopu, vyizolován a následně inokulován na vnímavé hostitele: temnotku (*Pellaea falcata*), *Phyllitis scolopendrium*, *Polystichum falcatum*, *Pteris cretica* var. *albo-lineata*, *P. Childsii*.

Typický genom tobnavirů tvoří dvoudílná lineární +ssRNA. RNA 1 (6800 nt) kóduje 4 nestrukturní proteiny – zajišťuje replikaci a pohyb částice, RNA 2 (1800 až 4500 nt) kóduje 3 obalové a transportní proteiny specifické pro přenos hád'átky (www.dpvweb.net).



Tobnavirus (Tobacco rattle virus), foto:
<http://www.dpvweb.net/notes/showem.php?genus=Tobnavirus>

Blatný a Králík (1970) prezentovali výskyt onemocnění u hasivky orličí (*Pteridium aquilinum*), připomínající příznaky působené viry. Šlo o žloutnutí, hnědnutí až nekrotizaci listových úkrojků nebo celých listů. Někdy též o nekrotizaci žilek a středního listového žebra. Blatný a Králík provedli pokus s přenosy tohoto ochuravění. Implantovali štěpy pletiva infikovaných hasivek do jedenácti bezpříznakých rostlin. Inokulace byla úspěšná ve čtyřech případech. Elektronovou mikroskopií pak zjistili přítomnost velkého množství izometrických částic, převážně o velikosti mezi 46 a 52 nm. Částice blíže specifikovány nebyly.

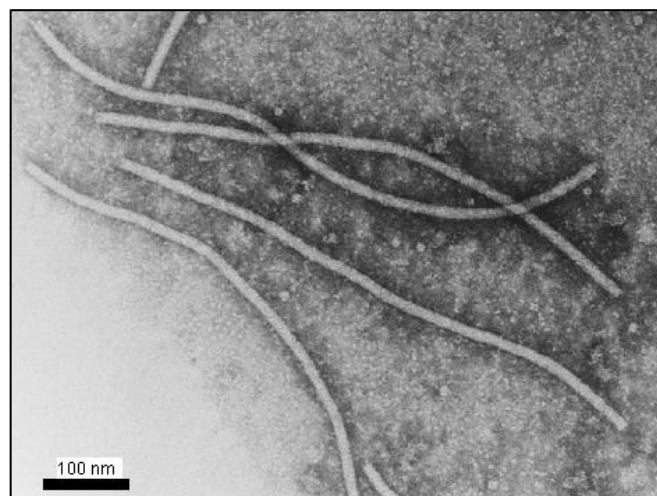
Další nález viru v kaprad'orostu byl zaznamenán v Německu (Büchen-Osmond, 2003).

Vláknitý +ssRNA potyvirus o délce 785 nm a šířce 12-14 nm byl poprvé nalezen na kapradi samci (*Dryopteris filix-mas*) a osladiči (*Polypodium vulgare*). Virus byl přenášen neperzistentním způsobem mšicí (*Myzus persicae*; *Aphididae*). Jako vnímavé čeledě pro mechanickou inokulaci byly zjištěny kaprad'ovité a osladičovitě (*Dryopteridaceae*, *Polypodiaceae*).

Potyvirové viriony jsou pružné tyčinkovité částice 720-850 nm dlouhé a 12-15 nm široké. Skládají se z 95 % proteinů a 5 % nukleové kyseliny.

Typický lineární genom potyvirů tvoří +ssRNA. Genom je translatován v polyprotein, který je následně zpracován do 8 až 10 strukturních i nestrukturních proteinů (www.dpvweb.net). Potyviry se šíří prostřednictvím vektorů a infikují široké spektrum rostlinných hostitelů

(www.dpvweb.net).



Potyvirus (Potato virus Y), foto:
<http://www.dpvweb.net/notes/showgenus.php?genus=Potyvirus>

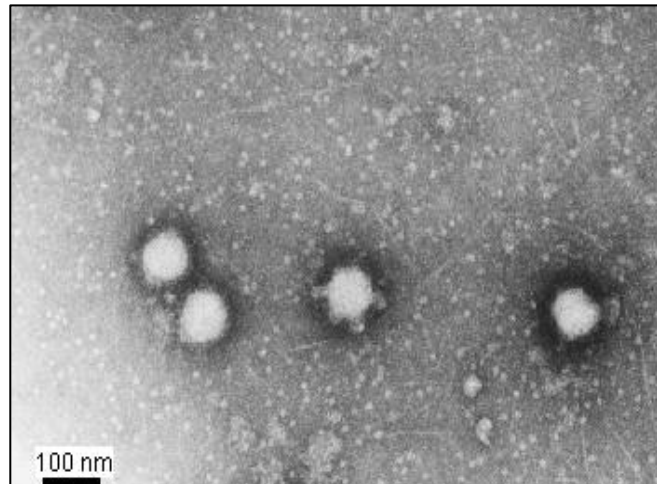
Při detekci Tomato Spotted Wilt Viru (TSWV) na okrasných rostlinách ve sklenících v Pensylvánii byl tento virus zaznamenán i na sleziníku (*Asplenium nidus*) (Hausbeck, 1992; Adam a Kegler, 1994). Sleziník vykazoval kroužkovou skvrnitost, nekrózu a chlorózu listů.

Další případ infekce kapradiny parožnatky (*Platyserium superbum*), rovněž virem TSWV, byl zaznamenán v Polsku (Parrella, 2003; Kaminska, 1994).

Tospoviry jsou sférické částice s kapsidem, variabilní v tvaru a velikosti (80-100 nm v průměru). Kapsid je složený ze dvou glykoproteinů G1 a G2. Viriony se skládají z 1-2 % nukleové kyseliny, 50 % proteinů a 20-30 % lipidů. Typický genom se skládá ze tří –ssRNA nebo dvojsmyslných ssRNA, značených RNA-L, M, S.

Nukleová kyselina kóduje RNA polymerázu a 4 proteiny.

Tospoviry mají široký okruh hostitelů, mezi nimiž jsou přenášeny třásněnkami. Každoročně způsobují velké ekonomické ztráty na zemědělských úrodách po celém světě(www.dpvweb.net).



Tospovirus (TSWV), foto:
<http://www.dpvweb.net/notes/showgenus.php?genus=Tospovirus>

Z tohoto výčtu je zřejmé, že v kaprad'orostech byly dosud nalezeny pouze viry tří rodů, všechny s RNA genomem, i když se nedá vyloučit, že v budoucnosti mohou být nalezeny i jiné viry s DNA genomem.

Fytoterapie

Uvedený výčet hostitelských rostlin a je infikujících virů není příliš široký ani pestrý. Tato skutečnost by mohla mít spojitost s antivirovou aktivitou některých kapradin.

Extrakt z listů kapradiny *Ampelopteris prolifera* působí jako inhibitor viru mozaiky okurky (CMV) v merlíku (*Chenopodium amaranticolor*) (de Winter, 2002).

Antivirové vlastnosti *Ampelopteris prolifera* byly popsány i v další práci (Pandey, 1984), kdy před a po vlastní virové inokulaci byly diferenční rostliny ošetřeny vodným extraktem z této kapradiny. Konkrétně se jednalo o inokulaci viru mozaiky tabáku (TMV) a viru mozaiky okurky (CMV) na tabák (*Nicotiana tabacum*, *N. glutinosa*) a merlík (*Chenopodium amaranticolor*). Nejvyšší inhibiční úspěšnost extraktu byla 1 hodinu před vlastní inokulací (až 80 %).

Fytodiagnostika

Mnohé patogeny jsou po infikaci rostliny příčinami anomálií a i okem rozlišitelných změn. Typické jsou tvarové deformace, malformace, barevné a jiné odlišnosti. Praxe ale ukazuje, že viry jsou často přítomny i v bezpříznakých rostlinách. Výběr vzorků se potom stává náhodným.

Virus také může být v počátečním stádiu infekce rostliny a tedy v příliš nízké koncentraci pro úspěšnou detekci. I proto se současné diagnostické, molekulárně biologické a sérologické metody používané k izolaci a identifikaci virů neustále zlepšují a zvyšuje se jejich citlivost.

Pro rutinní diagnostiku virů se nejčastěji používá sérologický test ELISA (imuno-enzymatické stanovení). Jeho použití ale předpokládá dostupnost protilátek proti konkrétnímu viru a proto je tento test vhodný jen pro detekci známých virů. Omezení mají i testy založené na amplifikaci nukleové kyseliny (PCR, RT-PCR), u kterých je zase nutná znalost sekvence aspoň části virového genomu. Přestože oba druhy testů je v některých případech možné použít pro detekci širší taxonomické

skupiny („univerzální“ antisérum nebo „univerzální“ amplifikační primery, např. proti potyvírům (Gibbs, 1997), nejsou to techniky schopné nalézt neznámý virus.

Jedním z postupů, jak získat genetický materiál neznámého viru, je metoda popsaná Allanderem (2001), kterou byla prokázána přítomnost a posléze i identita neznámých virů z rodu parvovirus ze vzorků hovězího séra. Postup je vhodný na detekci jak RNA-, tak DNA-virů:

Postup předpokládá, že viry se vyskytují v infikovaném organismu i ve formě virových částic, jejichž obal chrání uvnitř uložené nukleovou kyselinu. Analýza vzorku v původní práci byla prováděna z krevního séra. Vzorek byl přefiltrován a přítomné viry koncentrovány centrifugací. Případná hostitelská DNA byla odstraněna štěpením Dnázou I. Následovalo vyizolování DNA a RNA z virových částic. Virový genom (DNA nebo RNA) byl *in vitro* převeden do podoby dsDNA a štěpen restrikčním enzymem *Csp6*, který vytvořil kohezní konce pro následnou ligaci s adaptorem NCsp (hybridizované oligonukleotidy NBam24, AGG CAA CTG TGC TAT CCG AGG GAG; a NCsp11, TAC TCC CTC GG). Ligační směs byla pak templátem pro následnou PCR prováděnou primerem NBam24. Tím byly připraveny především amplikony ohraničené sekvencemi adaptoru, které by měly představovat pouze části virových genomů. PCR produkty byly analyzovány na agarózovém gelu. Silné bandy byly vyříznuty, klonovány a sekvenovány.

Často využívanou technikou pro detekci fytovirů je elektronová mikroskopie. Transmisní elektronová mikroskopie byla použita i v této práci.

V tomto i v ostatních postupech se pravděpodobnost objevení viru zvyšuje s jeho vzrůstající koncentrací ve vzorku.

Cíle práce

Cílem této práce je prakticky zvládnout výše uvedené metody a další laboratorní postupy. Jejich prostřednictvím pak najít v kaprad'orostech rostlinný virus a popřípadě určit jeho další vlastnosti.

Materiál a metody

Rostlinný materiál:

Vzorky listů jednotlivých zástupců rodů hasivky (*Pteridium*), bukovince (*Phegopteris*), papradky (*Athyrium*), pérovníku (*Matteucia*), kapradě (*Dryopteris*) a osladiče (*Polypodium*) byly sbírány v jižních, středních a severních Čechách. Dále na jižní a západní Moravě. Několik málo vzorků v zahraničí – Norsku, Švédsku a Chorvatsku.

Metody:

Izolace dsRNA:

- v třecí misce byl zhomogenizován vzorek kapradiny – 1,0 g čerstvého pletiva (0,2 g sušiny) s 0,5 ml 1 % bentonitu a 2 ml 1 x STE
- převedeno do 50 ml kyvety
- přidáno 8 ml 1x STE, 1 ml 10 % SDS a 9,0 ml 1 x STE s 16 % etanolu
- necháno 30 minut na třepačce
- centrifugováno 15 minut při 8 000 g a 10 °C
- supernatant byl odpipetován a přidán 96 % etanol (na 10 ml vzorku...2,1 ml etanolu)
- centrifugováno 3 minuty při 5 000 g a 10 °C
- dsRNA byla zachycena na kolonce připravené z 0,5 g vláknité celulózy v injekční stříkačce
- byl aplikován vzorek který byl promyt 75 ml 1 x STE s 16 % etanolu
- byl přidán 1 ml STE, necháno 1 minutu stát, protlačeno a k získanému eluátu dsRNA byl přidán stejný objem izopropanolu
- centrifugováno 5 minut při 17 000 g a 4 °C
- sediment dsRNA byl promyt 75 % etanolem a vysušen ve vakuovém koncentrátoru (speed-vac, Omni-Bio)
- získaná RNA byla resuspendována v 10 µl vody

Ke kontrole výsledků byla použita **elektroforéza na polyakrylamidovém gelu:**

- připraven 6 % gel:
 - 1,2 ml 50 % zásobního roztoku akrylamidu
 - 140 μ l 10 % amonium persulfátu
 - 1 ml 10 x TBE pufru
 - 1 ml 10 x TEMED
 - 7,66 ml H₂O
- po zpolymerování byl na gel nanesen celý objem izolované dsRNA v 4 μ l vkladacího pufru
- elektroforéza probíhala v 1 x TBE pufru při 100 V do vyputování signální barvy
- gel byl barven 10 minut v 1 μ g/ml roztoku etidium bromidu a pozorován pod UV lampou

Purifikace virů

- bylo rozmixováno 100 g čerstvého materiálu (20 g suchého) v 100 ml 0,1 M fosfátového pufru, pH = 7
- vzniklý homogenát byl filtrován přes silonovou tkaninu a čeřen 1 hodinu na míchadle spolu s 10 ml butanolu a 10 ml chloroformu
- centrifugováno 5 minut při 8 000 g a 15 °C
- viry byly sráženy přes noc při 10 °C ze supernatantu 4 obj. % NaCl a 4obj. % PEG 6 000 (Sigma)
- hrubý purifikát byl připraven diferenční centrifugací při 14 600 g , po resuspendování centrifugováno 2 minuty při 8 000 g, virus byl sedimentován ultracentrifugací 2 hodiny při 40000 g
- resuspendováno v 0,01 M P-pufru pH = 7, uloženo při – 20 °C

Ke kontrole výsledků byla použita **transmisní elektronová mikroskopie:**

- preparát připraven smáčecí metodou:

- na kapku purifikátu viru o objemu 20 µl byla položena na 5 min pouhlikovanou stranou mikroskopická síťka, poté byla osušena a obarvena 2 % roztokem uranylacetátu
- preparát byl pozorován v transmisním elektronovém mikroskopu (JOEL 1010) při zvětšení 30 – 150 000

Izolace RNA (RNeasy Mini Kit, Qiagen)

- k 100 µl purifikátu bylo přidáno 450 µl pufru RLT a poloviční objem 96 % ethanolu, promícháno a napipetováno do růžové kolonky (zachycení molekul RNA)
- centrifugováno 15 sekund při 10 000 g
- kontaminanty byly vymyty pufrům RW1 a pufrům RPE s etanolem
- RNA byla vymyta centrifugací 30 µl H₂O

Detekce potyvirů RT-PCR (Gibbs, 1997)

Pro detekci byla použita metoda RT-PCR (reverzní transkripce a polymerázová řetězová reakce) za použití poty-specifického primeru 321E6 (5'-TGAGGATCCTGGTGYATHGARAAYGG-3') a oligo (dT)₁₇ primeru pro reverzní transkripci.

- reakce probíhala na iCycleru podle schématu:
 - 45 minut 48 °C
 - 3 minuty 95 °C
 - 35 cyklů: 1 minuty při 94 °C
 - 1 minutu při 40 °C
 - 2 minuty při 72 °C
- reakční směs:
 - 2 µl RNA
 - 10 µl Access Quick MIX
 - 5,5 µl H₂O

0,5 µl AMV
1 µl primeru 321E6
1 µl primeru oligo(dT)₁₇

Ke kontrole výsledků byla použita **agarózová gelová elektroforéza (1,5 %)**:

- 0,35 g agarózy bylo rozvařeno v 25 ml 0,5 x TBE
- po ztuhnutí byly do jednotlivých zubů aplikovány obarvené vzorky a marker
- elektroforéza probíhala v 1 x TBE pufru při 80 – 100 V
- gel byl pozorován pod UV lampou

Detekce RNA virů metodou podle Allander a kol. (2001)

➤ k purifikátu bylo přidáno 100 U DNázyI a 1 µl směsi RNáz a reakce byla inkubována 1 hod při 37 °C, za přítomnosti pouze DnasyI necháno inkubovat 60 minut při 37 °C

➤ byla vyizolována RNA (RNeasy Mini Kit, Qiagen)

➤ byla provedena RT-PCR (iCycler) podle reakčního schématu:

45 minut při 48 °C

3 minuty při 94 °C

30 cyklů: 2 minuty při 48 °C

6 vteřin při 94 °C

2 minuty při 68 °C

- reakční směs:

11,5 µl RNA

12 µl Access Quick

1 µl random primer

0,5 µl AMV

➤ produkt byl přečištěn kitem (QIAquick PCR purification Kit, QIAGEN):

- k 25 µl vzorku bylo přidáno 25 µl TE a 5 x celkového objemu PB

- centrifugováno 1 minutu při 10 000 g
- přidáno 0,5 ml PE, centrifugováno 1 a 2 minuty při 15 000 g, produkt byl vymyt do 50 μ l TE

➤ cDNA byla štěpena restrikním enzymem Csp6I a bylo přidáno 6 μ l pufru B

- inkubováno 1 hodinu při 37 °C, poté byla směs opětovně přečištěna

➤ precipitace

- ke vzorku byl přidán stejný objem izopropanolu a byl ochlazen na ledu
- centrifugováno 15 vteřin při 15 000 g a 4 °C
- bylo přidáno 250 μ l 70 % etanolu
- centrifugováno 4 minuty při 15 000 g
- etanol byl vylit a vysušen (speed-vac, Omni-Bio)
- sediment byl resuspendován ve vodě

➤ ligace:

2 μ l adaptoru (5'-AGGCAACTGTGCTATCCGAGGGAG-3') a (5'-TACTCCCTCGG-3')

2 μ l ligačního pufru

1 μ l T4 DNA ligázy

15 μ l H₂O

- směs byla ligována přes noc při 4 °C

➤ PCR

1 μ l DNA ligační směsi

0,5 μ l Taq-polymerázy

1 μ l primeru 321M3 (5'-AGGCAACTGTGCTATCCGAGGGAG-3')

1 μ l dNTP

2 μ l pufru

14,5 μ l vody

Reakce probíhala na přístroji „Mini Cycler™“, schéma programu:

30 cyklů: 30 vteřin při 94 °C

60 vteřin při 55 °C

180 vteřin při 72 °C

10 minut při 72 °C

Ke kontrole výsledků byla použita **agarózová gelová elektroforéza (1,5%)**.

- proužky byly vyříznuty z gelu a opětovně přečištěny kitem (QIA quick PCR purification Kit, QIAGEN)
 - byla provedena PCR amplifikace (viz. předešlé schéma), produkty byly zkontrolovány na agarózové gelové elektroforéze
- byla provedena sekvenace

Výsledky a diskuse

Přítomnost fytovirů v kapradinách byla detekována celkem čtyřmi metodami. Jednalo se o tradiční metody dnes již rutinní fytodiagnostiky – izolace dsRNA viru (Valverde, 1990), purifikace virů (Methods in Virology, 1967), detekce potyvirů prostřednictvím RT-PCR a univerzálního primeru (Gibbs and Mackenzie, 1997), izolace RNA viru prostřednictvím komerčního kitu a novější metodou DNase-SISPA (Allander, 2001).

Výsledky byly vyhodnocovány na elektroforetických gelech (polyakrylamidový, agarózový) nebo elektronovým mikroskopem.

Vzorky

Jednotliví zástupci z rodů hasivky (*Pteridium*), bukovince (*Phegopteris*), papradky (*Athyrium*), pérovníku (*Matteucia*), kapradě (*Dryopteris*) a osladiče (*Polypodium*) byly náhodně sbírány na několika lokalitách v České republice. Několik málo vzorků pochází ze zahraničí - Norska, Švédska a Chorvatska. Žádný ze sebraných vzorků vizuelně nevykazoval typické příznaky virové infekce.

Byly sbírány nadzemní části rostlin – trofofylní i sporotrofofylní listy. Vzorky byly bezprostředně po sebrání zpracovány nebo byly usušeny.

Celkem bylo zpracováno 64 vzorků.

Dokumentální fotografie vzorků:



Izolace dsRNA

Touto metodou bylo zpracováno a na polyakrylamidových gelech vyhodnoceno 6 vzorků (Tab. 1). U vzorku číslo 4a se projevil 1 slabý proužek, odhadovaná velikost je cca 2610 bp. Tato velikost odpovídá rostlinným dsRNA virům z čeledi *Reoviridae*. Kvůli nízké koncentraci nebylo možné jeho další zpracování.

Tabulka 1:

vzorek	hostitel	polyakrylamidový gel - nález-	poznámka
1a	A. filix-femina	-	
2a	A. filix-femina	-	
3a	A. filix-femina	-	
4a	D. filix-mas	+	slabý proužek, 2610 bp
5a	D. filix-mas	-	
6a	D. filix-mas	-	

Gel:

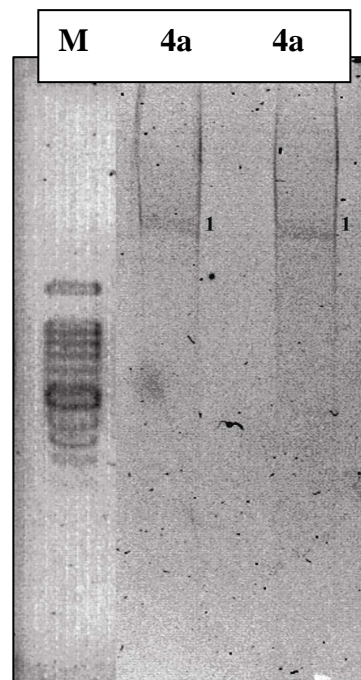
M-100bp marker (velikosti fragmentů (bp) odshora směrem dolů: 1500, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, 50)

4a – 10 μl vzorku

4a – 15 μl vzorku

Proužek 1 o velikosti cca 2610 bp.

(Poznámka: obrázek gelu byl spojen ze dvou různých fotografií.)



Purifikace virů

Purifikací a následnou transmisní elektronovou mikroskopií bylo zpracováno 27 vzorků (Tab. 2). Podezřelé částice byly vyfoceny a vyhodnoceny. Na fotografiích vzorků 11, 22 a 27 jsou pravděpodobně viry.

Izometrická částice o průměru cca 20 nm na fotografii ze vzorku 11 odpovídá velikostem virů z čeledí *Comoviridae*, *Idaeoviridae*, *Nanoviridae*, *Luteoviridae*, *Tymoviridae* a *Sobemoviridae*. Mohlo by se tedy jednat o zástupce některé z nich..

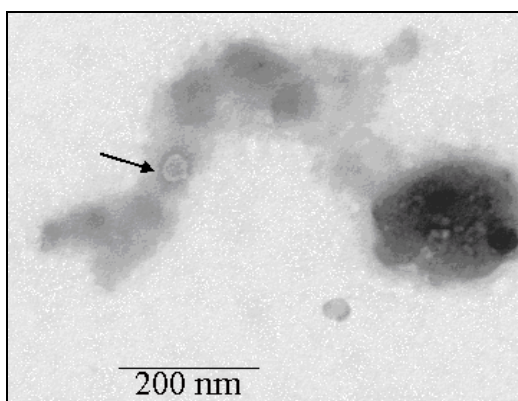
Na fotografii ze vzorku 22 jsou zachyceny izometrické částice s pravidelnou šestibokou strukturou. Částice se zde vyskytují v různých velikostech, nejvíce jsou zastoupené ve velikostním rozmezí 18-24 nm. Velikostí a tvarem připomínají viry z rodů: nanovirus, babuvirus a panicovirus.

Pokud se potvrdí správnost, že se jedná o virus (aspoň v jednom z uvedených případů), představuje tento nález první případ izometrického viru v kaprad'orostech.

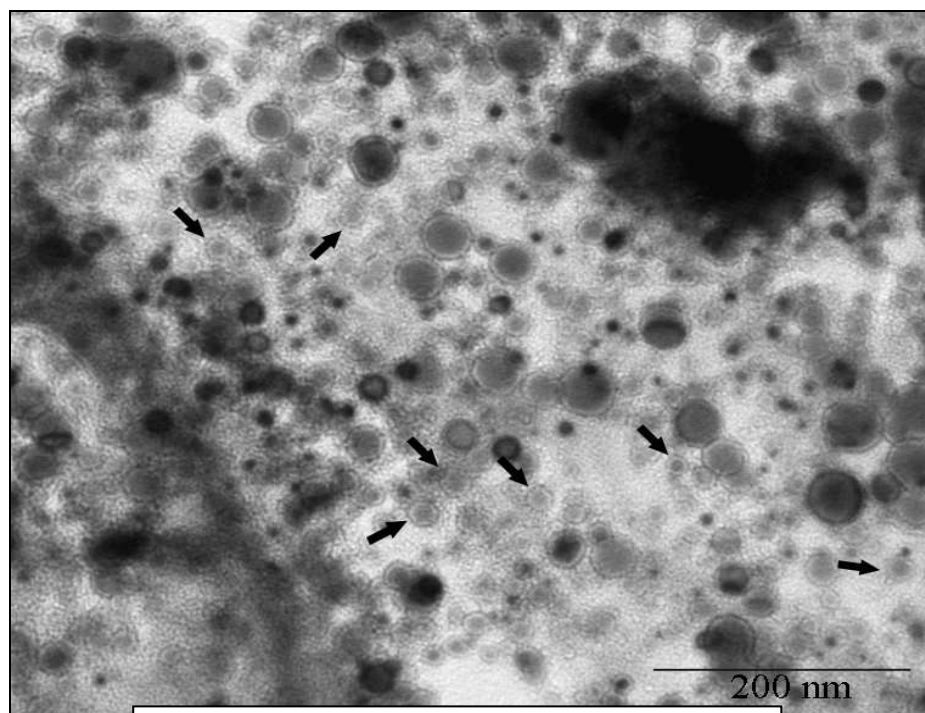
Vlákna na fotografii vzorku č. 27 délkou a šířkou (cca 500 a 710 nm x 11 nm) se nejvíce podobají vláknitým virům z rodů: alexivirus, bymovirus, carlavis a rymovirus. Mohlo by se tedy jednat o zástupce některého z rodů výše uvedených nebo jeho fragment.

Molekulárními testy (detekce potyvirů, metoda podle Allandera) doposud nebyla přítomnost viru ve vzorku potvrzena. Může to být způsobeno koncentrací viru ve vzorku, která by tedy byla pod jejich detekční hranici.

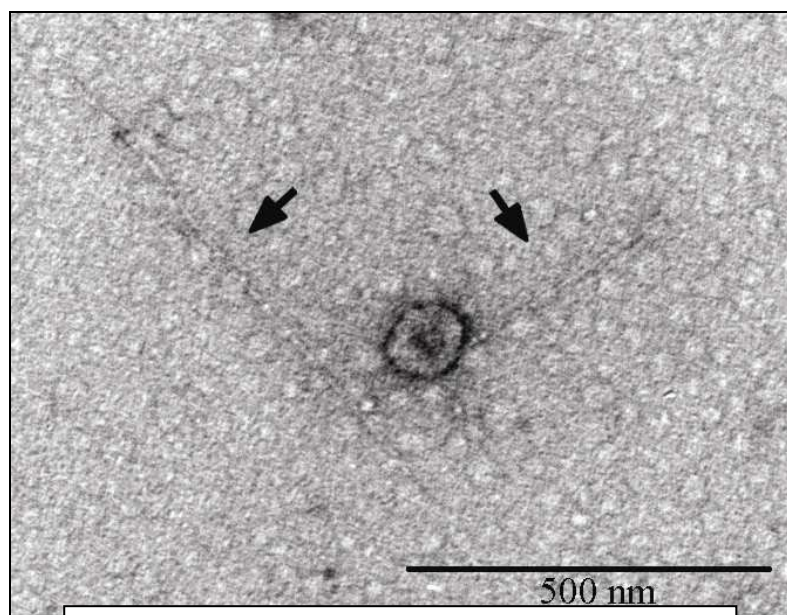
Preparát ze vzorku 15 byl poškozen a nebylo možné prohlédnout ho v elektronovém mikroskopu. Poškození vzniklo nejspíše neopatrným zacházením při zhotovování preparátu.



Vzorek č. 11, izometrický virus o velikosti cca 20 nm



Vzorek č. 22, izometrické částice s pravidelnou šestibokou strukturou o velikosti cca 18-24 nm



Vzorek č. 27, vlákna o velikostech cca: 500 nm a 710 nm x 11 nm

Tabulka 2:

vzorek	hostitel	preparát	TEM - nález-	poznámka
1	A. filix-femina	+	-	
2	D. filix-mas	+	-	fotografie
3	P. vulgare	+	-	
4	D. filix-mas	+	-	fotografie
5	D. filix-mas	+	-	fotografie
6	D. filix-mas	+	-	fotografie
7	D. filix-mas	+	-	fotografie
8	D. dilatata	+	-	fotografie
9	D. filix-mas	+	-	
10	D. filix-mas	+	-	
11	D. filix-mas	+	+	fotografie
12	A. filix-femina	+	-	fotografie
13	A. filix-femina	+	-	fotografie
14	D. filix-mas	+	-	fotografie
15	D. filix-mas	-	-	poškozená mřížka
16	P. lobatum	+	-	
17	P. aquilinum	+	-	
18	M.struthiopteris	+	-	
19	P. connectilis	+	-	
20	A. filix-femina	+	-	
21	P. aquilinum	+	-	fotografie
22	A. distentifolium	+	+	fotografie
23	A. distentifolium	+	-	
24	D. filix-mas	+	-	fotografie
25	P. vulgare	+	-	
26	D. filix-mas	+	+	fotografie
27	P. aquilinum	+	-	

Detekce virů metodou podle Allander a kol. (2001)

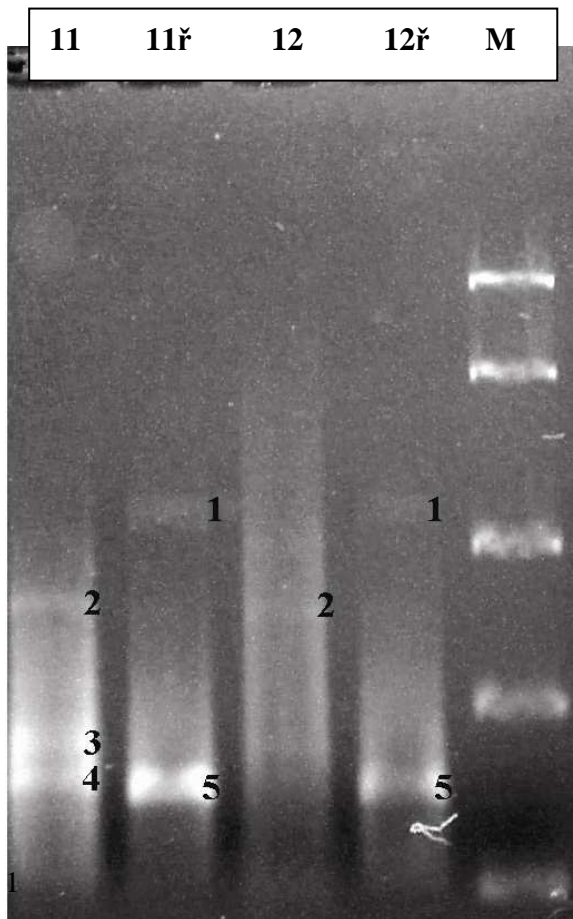
Touto metodou, která má zachytit libovolný DNA či RNA virus o koncentraci od 10^5 částic/ml, bylo zpracováno 16 vzorků (Tab. 3).

Ke vzorkům číslo 11, 18, 19, 20 a 21 byl (kromě 100U DnázyI) přidán 1 μ l směsi Rnáz a reakce byla inkubována 1 hod při 37 °C.

Nálezy na agarózových gelech u vzorku 11 a 12 byly pozitivní. Z obou vzorků byly nejsilnější proužky vyříznuty, přečištěny kitem (QIA quick PCR purification Kit, QIAGEN), amplifikovány na PCR a opětovně proběhla elektroforéza na agarózovém gelu. Dva největší produkty (cca 1110 bp a 680 bp) byly sekvenovány a výsledky byly porovnány s databází v GenBank. Získané sekvence neodpovídaly nukleové kyselině RNA ani DNA virů.

Tabulka 3:

vzorek	hostitel	agarózový gel -nález-	sekvenace	poznámka
8	D. dilatata	-	-	
9	D. filix-mas	-	-	
11	D. filix-mas	+	+	+ RNáza
12	A. filix-femina	+	+	
13	A. filix-femina	-	-	
14	D. filix-mas	-	-	
18	M. struthiopteris	-	-	+ RNáza
19	P. connectilis	-	-	+ RNáza
20	A. filix-femina	-	-	+ RNáza
21	P. aquilinum	-	-	+ RNáza
22	A. distentifolium	-	-	
23	A. distentifolium	-	-	
24	D. filix-mas	-	-	
25	P. vulgare	-	-	
26	D. filix-mas	-	-	
27	P. aquilinum	-	-	



Gel:

Vzorky 11, 11 (100x ředěný), 12, 12 (100x ředěný) – velikosti proužků cca:

1 – 1110 bp

2 – 680 bp

3 – 270 bp

4 – 210 bp

5 – 180 bp

M – Middle Range marker (velikosti fragmentů (bp) odshora směrem dolů:

5000, 2000, 850, 400, 100)

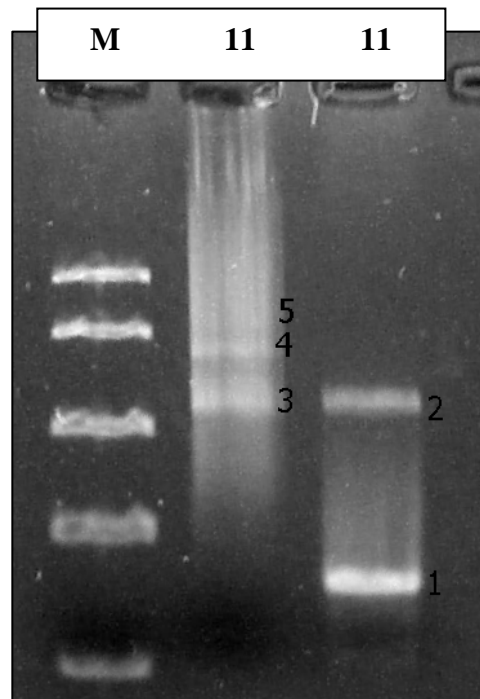
Příklad amplifikace stejného vzorku 11 zpracovaného podle metody Allander (2001).

Gel:

M – Middle Range marker (velikosti fragmentů (bp) odshora směrem dolů: 5000, 2000, 850, 400, 100)

11 – vzorek 11 (5 μ l)

11 – vzorek 11 (2 μ l)



(Foto Petrzik)

Detekce potyvirů RT-PCR

V této práci byl pro RT-PCR použit poty-specifický primer 321E6 (5'-TGAGGATCCTGGTGYATHGARAAYGG-3' - Gibbs and Mackenzie, 1997) a oligo (dT)₁₇ primer pro reverzní transkripci. Bylo zpracováno 14 vzorků (Tab. 4), přičemž žádný nevyšel pozitivně.

Negativní výsledky si vysvětlujeme nepřítomností virů nebo nízkou koncentrací virů ve vzorcích.

Tabulka: 4

vzorek	hostitel	RT - PCR	agarózový gel -nález-
3	<i>P. vulgare</i>	+	-
4	<i>D. filix-mas</i>	+	-
5	<i>D. filix-mas</i>	+	-
6	<i>D. filix-mas</i>	+	-
7	<i>D. filix-mas</i>	+	-
8	<i>D. dilatata</i>	+	-
9	<i>D. filix-mas</i>	+	-
10	<i>D. filix-mas</i>	+	-
11	<i>D. filix-mas</i>	+	-
12	<i>A. filix-femina</i>	+	-
13	<i>A. filix-femina</i>	+	-
14	<i>D. filix-mas</i>	+	-

Závěr

Cílem práce bylo zjistit, zda je možné v kaprad'orostech detekovat přítomnost fytovirů, o kterých jsou jen velmi kusé a neúplné informace.

Vzorky listů jednotlivých zástupců rodů *Pteridium*, *Phegopteris*, *Athyrium*, *Matteucia*, *Dryopteris* a *Polypodium* byly sbírány v Čechách, na Moravě a v zahraničí – Norsku, Švédsku a Chorvatsku. Výběr byl náhodný - žádný ze sebraných vzorků neměl typické příznaky virové infekce.

S výjimkou relativně specifické detekce potyvírů jsem ostatními metodami získala výsledky, které naznačují přítomnost fytovirů.

Přímým důkazem je přítomnost izometrické virové částice o rozměru 20 nm ve vzorku č. 11 a velkého množství izometrických částic s pravidelnou šestibokou strukturou o průměru od 18 nm do 24 nm ve vzorku 22. Taktéž vláknité částice (cca 500 nm a 710 nm x 11 nm) ve vzorku 27 by mohly být virového původu.

Rovněž úspěšná izolace dsRNA ve vzorku 4a naznačuje, že v dané rostlině je přítomná RNA dalšího organismu, podle známých údajů pravděpodobně viru.

Nejslibnější výsledek byl získán metodou podle Allandera, kdy ve dvou vzorcích bylo namnoženo spektrum produktů, které by mohly být virového původu.

Citace

Adam G., Kegler H. (1994). Tomato spotted wilt virus and related tospoviruses. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* **28**: 483-504

Allander T., Emerson S.U., Engle R.E., Purcell R.H., Bukh J. (2001). A virus discovery method incorporating DNase treatment and its application to the identification of two bovine parvovirus species. *Proceedings of the National Academy of Science* **98**: 11609-11614

Blattný C, Králík O. (1970). Virózy u hasivky orličí. Sbor.Prací 3.celost. Konf. Ochr. Rostlin, Praha 1970, 186-193

Blattný C, Pilous Z. (1953). Příspěvek k poznání ochuravění pokládáných za virosy nebo z viros podezřelých u mechorostů (Bryophyta) a kaprad'orostů (Pteridophyta). *Československá Biologie* **2**: 81-88

Bojňanský V. a kol. (1963) Vírusové choroby rastlín. Slovenské vydavateľstvo pôdohospodárskej literatúry, Bratislava 1963, str. 480-482

botanika.bf.jcu.cz/systematikaweb/systematikauvod.htm

Brunt, A.A., Crabtree, K., Dallwitz, M.J., Gibbs, A.J., Watson, L. and Zurcher, E.J. (eds.) (1996 onwards). 'Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database. Version: 20th August 1996.' URL <http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/vide/>

Büchen-Osmond, C. (Ed) (2003). 00.057.0.91.005. Fern virus. In: ICTVdB - The Universal Virus Database, version 3. ICTVdB

Castello, J. D., Rogers, S. O., Bachand, G. D., Fillhart, R. C., Murray, J. S., Weidemann, K., Bachand, M., and Almond, M. A. (2000). Detection and partial characterization of tenuiviruses from black spruce. *Plant Disease* **84**: 143-147

de Winter, W., 2002. **Ampelopteris prolifera** (Retz.) Copel. [Internet] Record from Protabase. Oyen, L. P. A. § Lemmens, R. H. M. J. (Editors). PROTA (Plant resources of Tropical Africa / Ressources végétales de l'Afrique tropicale), Wageningen, Netherlands. <http://database.prota.org/search.htm>

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

Hausbeck M. K., Welliver R. H., Derr M. A., Gildow F. E. (1992). Tomato spotted wilt virus survey among greenhouse ornamentals in Pennsylvania. *Plant Disease* **76**: 795-800

Hull R. (1968). A virus disease of hart's tongue fern. *Virology* **35**: 333-335

ICTVdB - The Universal Virus Database, version 3.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/>

Jacobi V., Castello J. D., (1992) Infection of red spruce, black spruce, and balsam fir seedlings with tomato mosaic virus. *Canadian Journal of Forest Research* **22**(7): 919–924

Jacobi V., Castello J. D., Flachmann M. (1992). Isolation of tomato mosaic virus from red spruce. *Plant Disease* **76**: 518-522

Kaminska M., Korbin M., 1994. New natural hosts of tomato spotted wilt virus. *Acta Horticulturae* **377**: 123-128

Maramorosch K., Koprowski H., Methods in Virology, Academic Press, New York · London 1967, 3. vydání, str.: 99-111; 522-571

Pandey A. K. and Bhargava K. S. (1984). Effect of *Ampelopteris proliferata* leaf extract on the activity of tobacco mosaic and cucumber mosaic viruses. *Indian Phytopathology* **37** (2): 271 - 277

Valverde R.A., Nameth S. T., Jordan R. L., (1990). Analysis of double-stranded RNA for plant virus diagnosis. *Plant Disease* **74**: 255-258

Parrella G., Gognalons P., Gebre-Selassié K., Vovlas C. and Marchoux G. (2003). Invited Review An update of the host range of tomato spotted wilt virus. *Journal of Plant Pathology* **85**: 227-264

Polischuk V., Budzanivska I., Shevchenko T., Oliynik S. (2007) Evidence for plant viruses in the region of Argentina Islands, Antarctica . *FEMS Microbiology Ecology* **59** (2), 409–417

www.dpvweb.net