

Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity
v Českých Budějovicích

Diplomová práce

Studium variability genů obalových proteinů
viru mozaiky ředkvičky

Marcela Holá
2008

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

Magisterská diplomová práce

Holá, M., 2007: 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.

Anotace:

The part of RNA2 genome segment of several isolates of Radish mosaic virus (RaMV) including capsid protein genes was sequenced. Variability of capsid protein genes among the isolates of Radish mosaic virus was studied.

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

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

Práce byla financována z prostředků projektu GAČR č. 522/07/0053, projektu AV0Z50510513 a z prostředků Katedry genetiky PřF JU.

V Českých Budějovicích dne 2. 1. 2008

Marcela Holá

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat hlavně svému školiteli Doc. RNDr. Karlovi Petrzikovi, CSc. za odborné vedení a pomoc a dále svým rodičům za podporu při studiu.

Obsah:

1. Literární přehled	1
1.1. Úvod.....	1
1.2. Virus mozaiky ředkvičky – klasifikace.....	1
1.3. Hostitelé, symptomy, přenos.....	2
1.4. Virové částice.....	3
1.5. Genom.....	3
1.6. Sérologie a příbuzenské vztahy	5
1.7. Cíl práce	5
2. Materiál a metody	6
2.1. Biologický materiál.....	6
2.2. Oživení a namnožení izolátů.....	6
2.3. Purifikace viru.....	6
2.4. Izolace celkové RNA	7
2.5. Reverzní transkripce a amplifikace.....	7
2.6. Purifikace produktů RT-PCR.....	9
2.7. Klonování.....	9
2.8. Kontrola klonů	9
2.9. Sekvenování	10
3. Výsledky	12
4. Diskuse	13
5. Závěr	17
6. Seznam použitých zkratk	18
7. Reference	19

1.Literární přehled

1.1 Úvod

Virus mozaiky ředkvičky je celosvětově rozšířený rostlinný virus, který parazituje zejména na rostlinách 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). V poslední době byl tento virus nalezen v Maroku (Koenig a Fischer, 1981) a Iránu (Farzadfar *et al.*, 2004).

Sérologické a biologické testy ukázaly, že japonské a americké izoláty jsou identické (Campbell a Tochihara, 1969). Později, když byly porovnány s jugoslávským izolátem HZ, objevily se v sérologických i biologických testech odlišnosti (Štefanac a Mamula, 1972). Evropské izoláty byly původně považovány za sérologicky uniformní, ale recentní studie (Špak a Kubelková, 2000) odhalila mezi těmito izoláty určitou odlišnost.

1.2.Virus mozaiky ředkvičky - klasifikace

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* (Mayo, 2005).

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* kromě *Radish mosaic virus (RaMV)* zahrnuje dále *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 (Rajakaruna, 2006).

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)*.

1.3. Hostitelé, symptomy, přenos

Virus mozaiky ředkvičky je jediným členem rodu *Comovirus*, který infikuje zejména druhy rostlin z čeledi *Brassicaceae*. Symptomy virové infekce jsou proměnlivé v závislosti 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 (Adams a Antoniwi, 2005).

Další hostitelé tohoto viru můžeme nalézt v čeledích *Solanaceae*, *Chenopodiaceae* a *Cucurbitaceae*. U těchto hostitelů se při infekci objevují lokální léze, ale infekce může probíhat i bez příznaků.

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 semený nebyl pozorován (Campbell a Colt, 1967).

1.4. Virové částice

Purifikát viru lze rozdělit centrifugací v hustotním sacharozovém gradientu na tři komponenty lišící se obsahem RNA: B – spodní, které obsahují RNA 1 a jejich sedimentační koeficient je 116 S, M – střední obsahují RNA 2, sedimentační koeficient je 97 S, T – horní jsou tvořeny prázdnými kapsidy, sedimentační koeficient 57 S (Adams a Antoniow, 2005). Viriony jsou izometrické a mají 30 nm v průměru (Campbell, 1964; Tochiwara, 1968).

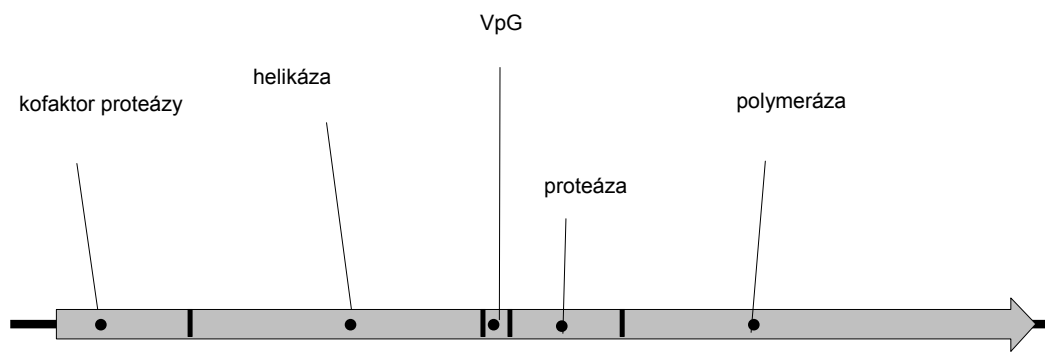
1.5. Genom

Genom viru mozaiky ředkvičky je tvořen lineární jednovláknovou RNA s pozitivní orientací. RNA je rozdělena do dvou segmentů, které jsou enkapsidovány každý zvlášť. Oba segmenty jsou primárně exprimovány do polyproteinů a ty jsou následně štěpeny virovou proteázou na funkční proteiny.

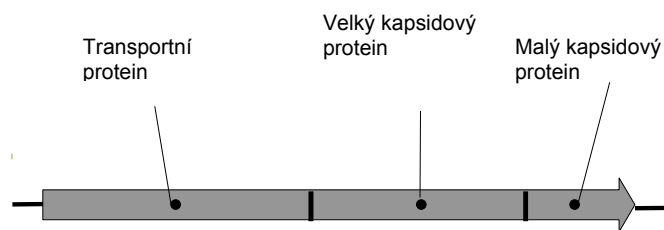
RNA 1 kóduje polyprotein o velikosti 200 k, který se štěpí na pět funkčních proteinů (viz. Obr 1.1): kofaktor proteázy (32 K), helikázu (58 K), VPg (4 K), proteázu (24 K) a RNA-polymerázu (87 K).

RNA 2 kóduje polyprotein o velikosti 105 k, resp. 95 k alternativní iniciací translace z druhého iniciačního kodónu, umístěného asi 350nt za prvním iniciačním kodónem. Z těchto polyproteinů vznikají velký (40 K) a malý (20 K) kapsidový protein a protein MP (48 k resp. 59 K), který se účastní tvorby tubulárních struktur mezi buňkami, prostřednictvím kterých se virus šíří (Žemla *et al.*, 1998).

RNA 1 ~ 6000nt



RNA 2 ~ 3500nt



Obr. 1.1: Schéma organizace genomu viru mozaiky ředkvičky

1.6. Sérologie a příbuzenské vztahy

Virus je dobrý imunogen. Sérologické difúzní testy poskytují dobrou reakci s jednoduchou precipitační linií. Z ostatních virů rodu Comovirus je RaMV sérologicky příbuzný BPMV, SqMV (Campbell, 1964), RCMV a CPMV (Bruening, 1978).

Izoláty RaMV z Kalifornie a Japonska byly sérologicky identické (Campbell a Tochihara, 1969), zatímco jugoslávský izolát HZ byl blízce příbuzný, ale v obou testech odlišitelný od kalifornského izolátu (Štefanac a Mamula, 1972). U izolátů z Jugoslávie, Velké Británie, Německa a Itálie nebyly nalezeny žádné odlišnosti (Plakolli a Štefanac, 1976). Díky této příbuznosti jsou izoláty nahlíženy spíše jako varianty jednoho druhu než jako rozdílné blízce příbuzné druhy.

Od roku 1985 byla prováděna v České Republice rozsáhlá studie výskytu RaMV v bobovitých pícech u nichž by mohl být výskyt RaMV ekonomicky významný. V rutinních sérologických testech byla pozorována sérologická variabilita, proto byla přezkoumána hypotéza Plakolliho a Štefanaca (1976) týkající se homogenity evropských izolátů RaMV (Špak a Kubelková, 2000). Byla zkoumána sérologická variabilita českých izolátů získaných z různých lokalit a různých rostlin. Dále byla zkoumána sérologická příbuznost mezi vybranými evropskými izoláty a americkým typem viru (Špak a Kubelková, 2000). Výsledky této detailní sérologické analýzy potvrdily sérologickou odlišnost jak mezi českými izoláty navzájem tak mezi českými a evropskými izoláty.

1.7. Cíl práce

Cílem této práce bylo porovnání variability genů pro obalové proteiny některých izolátů RaMV.

2. Materiál a metody

2.1. Biologický materiál

Izoláty RaMV1, CB3, CB9, M12, M92, Vladivostok pocházejí ze sbírky oddělení Rostlinné virologie, Ústav molekulární biologie rostlin, AV ČR. Izolát RaMV1 byl nalezen v rostlině *Brassica napus* var. *silvestris* v blízkosti Českého Krumlova. Izoláty CB3 a CB9 pocházejí z rostlin *Sinapis alba* ze stejného pole nedaleko Českých Budějovic. Vladivostok, M92 a M12 jsou izoláty pocházející z Ruska. Izolát M12 pochází z rostliny *Brassica pekinensis* z botanické zahrady moskevské státní univerzity.

2.2. Oživení a namnožení izolátů

Z konzervovaných lyofilizovaných vzorků byly připraveny suspenze v 0,1 M fosfátovém pufru, pH 7 a skleněnou tyčinkou byly tyto směsi nanášeny na listy rostlin hořčice bílé (*Sinapis alba*), které byly předtím poprášeny karborundem. Po třech týdnech byly sklizeny rostliny s příznaky a uchovány při -20°C.

2.3. Purifikace viru

Virus byl z rostlin izolován diferenciální centrifugací. 100 g zmrazených listů bylo homogenizováno ve 100 ml 0,1 M fosfátového pufru, pH 7. Homogenát byl přefiltrován přes vrstvu gázy. Ke získané šťávě byla přidána čeridla: 10 obj. % n-butanolu a 5 obj.% chloroformu. Směs byla centrifugována 10 min při 10 000 x g. K supernatantu byla přidána 4 obj % PEG 6000 (Sigma) a 4 obj % NaCl. Přes noc byl virus precipitován za stálého míchání při 10°C. Virus byl oddělen centrifugací 15 min při 10 000 x g, byl odstraněn supernatant a sediment byl rozpuštěn v 0,01 M fosfátovém pufru, pH 7. Dále byl vzorek centrifugován tři hodiny při 50 000 x g. Sediment obsahující virus byl resuspendován v 0,01 M fosfátovém pufru, pH 7 a uchováván při -20°C.

2.4. Izolace celkové RNA

RNA byla izolována pomocí RNease purification kit (Sigma). K 50 μ l purifikátu viru bylo přidáno 450 μ l pufru RLT obsahujícího denaturující guanidin isothiokyanát, který inaktivuje RNázy. Pro odstranění zbytků rostlinných pletiv byla tato směs přenesena do kolonky a centrifugována 2 min na minicentrifuze při 10 000 x g.

Dále bylo k tomuto přefiltrovanému roztoku přidáno 0,5 objemu 99% etanolu. Tato směs byla přenesena do RNeasy mini spin kolonky obsahující silica-gelovou membránu, na níž byla při centrifugaci 15 sec při 10 000 x g navázána RNA. Pro odstranění kontaminujících látek bylo dále přidáno 700 μ l pufru RW1 a vzorek byl centrifugován 15 sec při 10 000 x g. Následně bylo přidáno 500 μ l pufru RPE a vzorek byl centrifugován 15 sec při 10 000 x g. RNA byla vymyta přidáním 30 μ l vody a centrifugací 1 min při 32 600 x g.

2.5. Reverzní transkripce a amplifikace

Pro amplifikaci jednotlivých úseků genů pro kapsidové proteiny byl použit Acces RT-PCR system Kit (Promega, Madison, USA). Tento dvouenzymatický systém je navržen pro jednokrokové provedení reverzní transkripce a amplifikace polymerázovou řetězovou reakcí specifické RNA. Systém využívá AMV reverzní transkriptázu z *Avian myeloblastosis* viru pro syntézu prvního vlákna cDNA a termostabilní *Tfl* – polymerázu z *Thermus flavus* pro syntézu druhého vlákna cDNA a DNA amplifikaci. Reakce probíhala v celkovém objemu 25 μ l. Konečné koncentrace jednotlivých složek směsi jsou uvedeny v tabulce 2.1.

Tab.2. 1: finální koncentrace složek reakční směsi RT-PCR

Složky reakční směsy	Výsledná koncentrace
AMV/ <i>Tfl</i> 5X reakční pufr	5 μ l
dNTP Mix (10 mM každý dNTP)	0,2 mM
Primer 1	1 μ M
Primer 2	1 μ M
Rnáza inhibitor	5 U
25 mM MgSO ₄	1 mM
AMV reverzní transkriptáza	0,1 U/ μ l
<i>Tfl</i> DNA polymeráza	0.1 U/ μ l
RNA	1 μ g – 1 pg
Sterilní voda	14,3 μ l

Reakce byla prováděna na gradientovém termocykleru, PTC – 200 Peltier Thermal Cyler (Biotech), při následujícím programovém schématu:

- 45 min při 45°C – syntéza cDNA
- 2 min při 94°C – denaturace
- 35 cyklů:
 - 30 sec 93°C - denaturace
 - 1 min teplota optimalizovaná pro nasedání primerů
 - 2 min 70°C – syntéza DNA
- 10 min při 68°C

Získané produkty byly kontrolovány agarozovou gelovou elektroforézou (1% agarosa v 1 x TBE pufru o složení 8,9 mM Tris, 8,9 mM kyselina boritá, 0,1 mM EDTA, barvení: SyberGreen)

2.6. Purifikace produktů RT-PCR

Získané amplikony byly buď izolovány z gelu pomocí Qiaex II Gel Extraction Kit (Qiagen) nebo purifikovány GeneElute PCR DNA Purification Kit (Sigma).

V případě purifikace kitem GeneElute PCR DNA Purification Kit (Sigma) bylo kolony napipetováno 0,5 ml Column Preparation Solution a centrifugováno 1 min při 12 000 x g. Ke 100 µl PCR produktu bylo přidáno 500 µl Binding Solution a směs byla přenesena do kolony. Vzorek byl centrifugován 1 min při 12 000 x g. DNA byla navázána na silika - gelovou membránu kolony. Kontaminující látky byly vymyty přidáním 0,5 ml Wash Solution, obsahujícím etanol, do kolony a centrifugací 1 min při 10 000 x g. Dále byla kolonka centrifugována 2 min při maximální rychlosti, aby byl odstraněn zbylý etanol. DNA byla vymyta přidáním 50 µl vody a centrifugací 1 min při maximální rychlosti

2.7. Klonování

Produkty amplifikace byly klonovány pomocí TOPO[®] TA Cloning Kit for Sequencing (Invitrogen). Tento kit umožňuje rychlé klonování produktů amplifikovaných *Taq* - polymerázou do vektoru.

Tab.2. 2: Reakční směs pro ligaci

PCR produkt	3 µl
roztok soli	1 µl
TOPO [®] vector	1 µl
voda	1 µl

2.8. Kontrola klonů

pCR[®] 4-TOPO[®] umožňuje přímou selekci rekombinantů na základě bílo/modrého zbarvení bakteriálních kolonií na miskách s IPTG/X-gal. Živné agary, na které se bakterie vysévaly, byly potřeny X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galaktopyranosid) a IPTG (isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid). Bílé pozitivní kolonie byly analyzovány metodou PCR za použití PPP Master Mix (TopBio) a primerů M13 Forward (-20) a M13 Reverse.

Tab.2. 3: Sekvence a pozice primerů M13 Reverse a M13 Forward (-20).

Primer	sekvence	Pozice na plasmidu
M13 Reverse	5' - GTAAAACGACGGCCAG- 3'	205 – 221
M 13 Forward (-20)	5'-CAGGAAACAGCTATGAC- 3'	355 – 370

Reakční směs obsahovala: 10 µl PPP Master Mix

8 µl vody

ā 0,5 µl primerů a jako templát na špičku párátko nabraná kolonie z misky

PCR cyklus:

- 35 cyklů:
 - 30 sec 93°C - denaturace
 - 30 sec teplota optimalizovaná pro nasedání primerů
 - 30 sec 72°C – syntéza DNA
- 10 min při 72°C

2.9. Sekvenování

Pro sekvenování byly použity primery s odpovídající lokalizací. Sekvenční reakce byla prováděna pomocí kitu BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems).

Tab. 2.2: Reakční směs.

Ready Reaction Premix	4 µl
primer 20 pmol	2 µl
templát	10 ng (3µl)
Big Dye Sequencing pufr	6 µl
voda	5 µl

Reakce byla prováděna na gradientovým termocykleru, PTC – 200 Peltier Thermal Cyclers (Biotech), při následujícím programovém schématu:

:

- 35 cyklů:
 - 10 sec 96°C
 - 30 sec 93°C - denaturace
 - 5 sec při 50°C
 - 4 min při 60°C
- 5 min při 60°C

3. Výsledky

Následující pasáž o rozsahu 9 stran obsahuje utajované skutečnosti a je obsažena pouze v archivovaném originále diplomové práce uloženém na Přírodovědecké fakultě JU.

4. Diskuse

RaMV je lehce mechanicky přenosný virus a oživení sbírkových izolátů bylo bezproblémové. Mechanická inokulace na hostitele byla velmi úspěšná. U izolátů RaMV1, CB3, CB9 a Vladivostok se příznaky objevily přibližně u dvou třetin naočkovaných rostlin. U izolátů M12 a M92 byla úspěšnost přenosu o něco nižší a příznaky se objevily u poloviny rostlin. Tato nižší úspěšnost přenosu může být způsobena odlišností mezi moskevskými a českými izoláty, která byla potvrzena sérologickými (Špak a Kubelková, 2000) i molekulárními metodami (viz. výsledky).

Geny pro obalové proteiny jsou v rámci rodu poměrně málo konzervované. Kritickým krokem se proto stalo navržení primerů. Při sekvenování prvního izolátu RaMV1 byl nejprve získán úsek o velikosti 202 bp zaklonováním a osekvenováním produktů amplifikovaných pomocí degenerovaných primerů 206N9 a 206P0. Primery tedy hybridizovaly nespecificky, podle předpokládané pozice hybridizace ohraničují tyto primery úsek o velikosti 1779bp. Nespecificky rovněž hybridizoval primer 108D4, který společně s primerem 206P0 amplifikoval úsek dlouhý 510 bp, podle očekávané pozice hybridizace měl být úsek ohraničený těmito primery dlouhý 1688 bp. Tato nespecifická hybridizace byla způsobena použitím nízké hybridizační teploty při RT-PCR. Ostatní primery již hybridizovaly v předpokládaných místech.

V případě amplifikace s použitím degenerovaných primerů nebylo možné tyto primery současně použít pro sekvenování, protože sekvenační záznam byl nečitelný. Tyto produkty musely být zaklonovány a sekvenovány M13 primery. U amplifikací se specifickými primery byly tyto primery použity i pro sekvenování bez problémů.

Podobnost RaMV s ostatními komoviry se pohybuje od 41% u *Bean pod mottle virus* AY744933 (Zhang a Ghabrial, 2004) do 30% u *Andean potato mottle virus* P38485 (Shindo *et al.*, 1993). Ostatní komoviry s výjimkou APoMV vykazují mezi sebou homologii vyšší. Fylogenetické vztahy vypočtené z aminokyselinových sekvencí genů pro obalové proteiny řadí RaMV a APMoV samostatně od ostatních komovirů. Tyto výsledky odpovídají fylogenetické analýze založené na aminokyselinové sekvenci RNA dependentní RNA polymerázy (Petřík *et al.*, 2005, Komatsu *et al.*, 2007), RNA1 polyproteinu a RNA2 polyproteinu (Komatsu *et al.*, 2007). Toto samostatné postavení RaMV a APMoV a jejich nízká homologie

s ostatními komoviry, může být vysvětlena jejich odlišností od ostatních komovirů v hostitelském pásmu. RaMV je jediným komovirem parazitujícím na rostlinách čeledi *Brassicaceae*, APMoV parazituje na rostlinách z čeledi *Solenaceae*. Hostiteli BPMV, SqMV, RCMV, CPMV a CPSMV jsou rostliny z čeledi *Leguminosae*.

Velký obalový protein RaMV je kódován 1124 nukleotidy, které jsou přepisovány do sekvence 375 aminokyselin. Liší se tak o jednu aminokyselinu od *Bean pod mottle virus* AY744933 (Zhang a Ghabrial, 2004), *Cowpea mosaic virus* NP_613285 (Wazenbeek *et al.*, 1983), *Cowpea severe mosaic virus* NP_619517 (Chen a Bruening, 1992), které mají velikost velkého obalového proteinu 374 aminokyselin a *Red clover mottle virus* NP_620464 (Shanks *et al.*, 1986), jehož obalový protein je velký 376 aminokyselin. *Andean potato mottle virus* P38485 (Shindo *et al.*, 1993) má oproti RaMV velký obalový protein o 12 aminokyselin delší. Gen pro malý obalový protein je tvořen 736 nukleotidy a kóduje protein o velikosti 245 aminokyselin, což z něj dělá největší CPS mezi komoviry. Velikostí se nejvíc blíží RCMV, který má 214 aminokyselin a CPMV, jehož malý obalový protein je tvořen 213 aminokyselinami. BPMV má malý obalový protein kratší než RaMV o 47, APMoV o 48 a CPSMV o 50 aminokyselin. Největší rozdíl je mezi malým obalovým proteinem RaMV a SqMV, kde obalový protein SqMV je kratší o 61 aminokyselin.

Malý obalový protein je narozdíl od velkého obalového proteinu u komovirů variabilnější nejen v délce, ale také v primární sekvenci aminokyselin (viz. výsledky). Toto zjištění je v souladu s výsledky Galla *et al.* (1995) i Haudenshielda a Palukaitise (1998).

Na základě homologie s ostatními komoviry bylo nalezeno pravděpodobné štěpné místo mezi velkým a malým obalovým proteinem (viz. výsledky). Stejně jako u ostatních komovirů je i u RaMV1 konzervovaný glutamin v pozici -1. Alanin v pozici -4 je kromě SqMV a BPMV rovněž konzervován u všech komovirů včetně RaMV1. V poloze -6 se u všech komovirů s výjimkou RCMV vyskytuje leucin. Dále má RaMV v poloze -2 prolin stejně jako RCMV a APMoV a v poloze -3 mají RaMV a SqMV serin. Prolin v poloze -5 je unikátní pro RaMV. Identický motiv byl nalezen i u japonského izolátu RaMV (Komatsu *et al.*, 2007) a izolátu CB9 (viz. výsledky).

Při amplifikaci a sekvenování jednotlivých izolátů byly získány pouze krátké amplikony. Nejdelší úsek byl získán u izolátu CB9 – 892bp, který se v nukleotidové

sekvenci odlišuje od RaMV1 ve 3%. V místech hybridizací primerů ale u něj nebyla pozorována žádná odlišnost od RaMV1. U ruských izolátů byly získány pouze amplikony ohraničené primery 242I5 317R1. Vladivostok je v této sekvenci s RaMV1 shodný z 98%, izoláty M12 a M92 pouze ze 70%. Je tedy pravděpodobné, že místa nasedání primerů jsou u těchto izolátů variabilní. Např. místo hybridizace reverzního primeru 317R0, které spadá do získaných sekvencí se u Vladivostoku liší od sekvence RaMV jedním nukleotidem a u izolátů M12 a M92 čtyřmi nukleotidy.

Podobnost mezi izoláty RaMV, CB3, CB9, Vladivostok a japonským izolátem RaMV (viz. výsledky) odpovídá rozpětí hodnot zjištěnému při porovnání homologie mezi třemi osekvenovanými izoláty SqMV (Kimble AF059533, Arizona AF059532 (Haudenschild a Palukaitis, 1998) a CH 99/211 DQ868881 (Gu *et al.*, 2006) a pěti izoláty BPMV (K-D1 AF330206, K-Ho1 AF330208, V-W1 AF330209, I-JH1 AF330210 (Clark *et al.*, 2000) a K - Hancock1 AF394607 (Gu a Ghabrial, 2005). U SqMV byla v nukleotidové sekvenci zjištěna nejnižší homologie 88,8% a nejvyšší 98,8%. Identita v aminokyselinové sekvenci vykazovala nejnižší hodnotu 96,4% a nejvyšší 98,7%. U pěti izolátů BPMV byla nejnižší zjištěná hodnota nukleotidové sekvence 96,6%, nejvyšší 98,9%. V sekvenci aminokyselin byla zjištěna nejnižší homologie 98,6% a nejvyšší 100%. Výrazně nižší homologie se projevila mezi moskevskými izoláty M12, M92 a RaMV – pouhých 70% při porovnání nukleotidové sekvence a 77,4% homologie v aminokyselinové sekvenci.

Izolát RaMV1 je ve získané aminokyselinové sekvenci identický s izolátem CB3. Toto zjištění odpovídá i výsledkům sérologických testů prováděných dvojitým difúzním testem v agaru (Špak, Kubelková, 2000). Jako homologní se v sérologických testech projeví i izoláty RaMV1 a CB9, které se ve získané aminokyselinové sekvenci liší ze 2%. Porovnání RaMV1 a japonského izolátu RaMV BAF75831 (Komatsu *et al.*, 2007) vykazuje 93% homologii. Japonský izolát RaMV se v sérologických testech jeví identický s americkým izolátem RaMV (Campbell a Tochihara, 1969). Americký izolát je sérologicky homologní s RaMV1 (Špak a Kubelková, 2000). Je možné, že tyto nízké nehomologie nejsou ve dvojitém difúzním testu rozlišitelné.

Z ruských izolátů byl v sérologických testech použit jen izolát M12, který byl homologní s ostatními testovanými ruskými izoláty. Pro sérologické testy s českými izoláty byl z těchto homologních ruských izolátů vybrán izolát M15. RaMV1 a M15 se od sebe v sérologických testech liší (Špak a Kubelková, 2000).

Tato odlišnost byla potvrzena i metodami molekulární biologie. RaMV1 a M12 se od sebe ve získané aminokyselinové sekvenci liší ze 30%.

5. Závěr

Byla poprvé zjištěna sekvence obou obalových genů pro kapsidové proteiny RaMV. Byly získány sekvence genů pro obalové proteiny několika sbírkových izolátů RaMV. Tyto sekvence byly přeloženy do sekvencí aminokyselin a byla zjištěna přirozená variabilita genů pro obalové proteiny a porovnána s variabilitou příbuzných virů. Byla diskutována korelace sekvenčních dat s daty sérologickými.

6. Seznam použitých zkratek

AMV - reverzní transkriptáza z Avian Myeloblastosis Viru

APMoV - *Andean potato mottle virus*

BPMV - *Bean pod mottle virus*

CB9, CB3 – izoláty RaMV

CP – obalové proteiny

CPMV - *Cowpea mosaic virus*

CPSMV - *Cowpea severe mosaic virus*

dNTP - deoxyribonukleotid trifosfát

EDTA - ethylen - diamin tetraoctová kyselina

IPTG - isopropyl - β - D – thiogalaktopyranosid

M12, M92 – izoláty RaMV

MP - movement protein (transportní protein)

PCR - polymerase chain reaction (polymerázová řetězová reakce)

PEG - polyetylen glykol

RaMV - *Radish mosaic virus*

RCMV - *Red clover mosaic virus*

RT - reverzní transkripce

SqMV - *Squash mosaic virus*

Taq - DNA polymeráza z *Thermus aquaticus*

TBE - Tris-Borate-EDTA pufr

Tfl - DNA polymeráza z *Thermus flavus*

X-gal - 5 - bromo - 4 - chloro - 3 - indolyl - β -D - galaktopyranosid

7. Reference

Adams, M.J. a Antoniw, J.F. (2005). DPVweb: An open access internet resource on plant viruses and virus diseases. *Outlooks on Pest Management* **16**, 268-270.

Bruening, G. (1978). Comovirus group. *C.M.I./A.A.B. Description of plant viruses* 199.

Campbell, R.N. (1964). Radish mosaic virus, a crucifer virus serologically related to strains of bean pod mottle virus and to squash mosaic virus. *Phytopathology* **54**, 1418 – 1424.

Campbell, R.N. a Colt, W.M. (1967). Transmission of radish mosaic virus. *Phytopathology* **57**, 502-509.

Campbell, R.N. a Tochiara, H. (1969). Radish enation mosaic virus is a strain of radish mosaic virus. *Phytopathology* **59**, 1756 – 1757.

Clark, A.J., Gu, H., de Sa, P., Pfeiffer, T.W., Tolin, S.A. a Ghabrial, S.A. (2000). Genetic diversity among isolates of Bean pod mottle virus. Nepublikováno.

Drying, Y.F., Sapotsky, M.V. a Bogdanova, A.A. (1987). Radish mosaic virus VPG characteristic and linkage with virion RNAs. *The Journal of General Virology* **215**, 247-251.

Farzadfar, S. a Pourrahim, R. (2004). Occurrence of Radish mosaic virus on Cauliflower and Turnip Crops in Iran. *Plant Diseases* **88**, 909.

Gall, O.Le, Candresse, T. a Dunez, J. (1995). A multiple alignment of the capsid protein sequences of nepoviruses and comoviruses suggests a common structure. *Archives of Virology* **140**, 2041 – 2053.

Gu, Q., Peng, B., Deng, C., Liang, X., Meng, J., Liu, L. a Li, L. (2006) Subgrouping of an isolate of squash mosaic virus from Shanxi province of China. Nepublikováno.

- Gu, H. a Ghabrial, S.A. (2005). The Bean pod mottle virus proteinase cofactor and putative helicase are symptom severity determinants. *Virology* **333**, 271-283.
- Han, S.S., Yoshida, K., Karasev, A.V. a Iwanami, T. (2002). Nucleotide sequence of a Japanese isolate of Squash mosaic virus. *Archives of Virology* **147**, 437-443.
- Haudenshield, J.S. a Palukaitis, P. (1998) Diversity among isolates of squash mosaic virus. *The Journal of General Virology* **79**, 2331-2341.
- Chen, X. a Bruening, G. (1992). Nucleotide sequence and genetic map of cowpea severe mosaic virus RNA 2 and comparisons with RNA 2 of other comoviruses. *Virology* **187**, 682 – 692.
- Koenig, R. a Fischer, H.U. (1981). A Moroccan radish mosaic-virus isolate from turnip. *Plant Diseases* **68**, 758–760.
- Komatsu, K., Hashimoto, M., Maejima, K., Ozeki, J., Kagiwada, S., Takahashir, S., Yamaji, Y. a Namba, S. (2007). Genome sequence of a Japanese isolate of Radish mosaic virus: the first complete nucleotide sequence of a crucifer – infecting comovirus. *Archives of Virology* **152**, 1501 – 1506.
- Mayo, M.M. (2005). Changes to virus taxonomy 2004. *Archives of Virology* **150**, 189 – 198.
- Plakolli, M. a Štefanc, Z. (1976). Serological and other relationships among the isolates of radish mosaic virus. *Phytopathologische Zeitschrift* **87**, 114 – 119.
- Petrzik, K., Holá, M. a Špak, J. (2005) Complete nucleotide sequence of radish mosaic virus RNA polymerase gene and phylogenetic relationships in the genus *Comovirus*. *Acta Virologica* **49**, 271 – 275.

Rajakaruna,P., Khandekar,S., Meulia,T. a Leisner,S.M. (2006). Identification and host relations of Turnip mosaic virus, a novel Comovirus from Ohio.
Nepublikováno.

Shindo, N., Vicente, A.C., Krengiel, R. a de Oliveira, D.E. (1993). Nucleotide sequence analysis of an Andean potato mottle virus middle component RNA cDNA clone: comparisons of the encoded proteins with those of other comoviruses.
Intervirology **36**, 169-180.

Špak, J. a Kubelková, D. (2000) Serological variability among European isolates of radish mosaic virus. *Plant pathology* **49**, 295-301

Štefanac, Z. a Mamula, D. (1972). A strain of radish mosaic virus occurring in turnip in Yugoslavia. *Annals of Applied Biology* **69**, 229 – 34.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. a Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* **24**, 1596-1599.

Tochihara, H. (1968). Radish enation mosaic virus. *Annals of the Phytopathological Society (Japan)* **34**, 129-136.

Tompkins, C.M. (1939). Two mosaic diseases of annual stock. *Journal of Agricultural Research* **58**. 119-130.

van Wezenbeek, P., Verver, J., Harmsen, J., Vos, P. a van Kammen, A. (1983). Primary structure and gene organization of the middle-component RNA of cowpea mosaic virus.
EMBO J. **2**, 941-946

Zhang, C. a Ghabrial, S.A.(2005).Characterization of an intermolecular recombinant RNA1 from a partial diploid strain of Bean pod mottle virus. Nепublikováno.

Žemla, J., Čiampor, F. a Labuda, M. (1998). D14. Komovírussy (Čelad' *Comoviridae*). *Špeciálna virológia*, 166-168, SAV Bratislava 1998.