

Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity
v Českých Budějovicích



Diplomová práce

Kvantifikace progrese virové infekce virů RaMV
a TuRSV pomocí real-time PCR

Tereza Kasalová

2008

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

Magisterská diplomová práce

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

Anotace:

The relative amount of viral RNA of two comoviruses (RaMV and TuRSV) in different parts of plant during infection was determined. The two viruses were compared according to their ability to spread and multiply in plants.

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, 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 dne 29. 4. 2008

Tereza Kasalová

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat svému školiteli Doc. RNDr. Karlovi Petrzikovi, CSc. za odborné vedení.

| | |
|--|-----------|
| 1. ÚVOD..... | 1 |
| 2. LITERÁRNÍ PŘEHLED | 3 |
| 2.1 Virus mozaiky ředkvičky..... | 3 |
| 2.2 Turnip ringspot virus | 6 |
| 2.3 Real - time PCR..... | 7 |
| 3. CÍLE PRÁCE..... | 10 |
| 4. MATERIÁL A METODY | 11 |
| 4.1 Biologický materiál | 11 |
| 4.2 Očkování rostlin..... | 11 |
| 4.3 Odebírání vzorků | 11 |
| 4.4 Izolace RNA | 12 |
| 4.5 Reverzní transkripce | 12 |
| 4.6 Real-time PCR | 13 |
| 4.7 Výpočty relativního množství virové RNA..... | 15 |
| 5. VÝSLEDKY | 17 |
| 6. DISKUZE | 18 |
| 7. ZÁVĚR | 21 |
| 8. REFERENCE..... | 22 |

1. ÚVOD

Počátky rostlinné virologie se datují do osmdesátých let devatenáctého století, kdy vědci objevili patogen, který byl odlišný od bakterií a hub (van der Want a Dijkstra, 2006). V roce 1882 se Adolph Mayer zabýval záhadnou nemocí tabáku, kterou později nazval „mozaikovou nemocí“. Mayer vyloučil houbu jako patogen způsobující mozaikovou nemoc, ale zároveň nedokázal určit bakterii, která by byla příčinou této nemoci (van der Want a Dijkstra, 2006). Díky Mayerovi se „mozaikovou nemocí“ tabáku začal zabývat i Martinus Willem Beijerinck. Zjistil, že původce záhadné nemoci je schopen projít porcelánovým filtrem, který se používal k zadržení bakterií. Stejně výsledky publikoval pár let před Beijerinckem i Dmitrij Ivanovski. Beijerinck prokázal, že agens způsobující „mozaikovou nemoc“ se pohybuje agarem a musí být tudíž tekutý nebo rozpustný. Také prokázal, že i přefiltrovanou šťávou z nemocných rostlin lze nemoc přenést (Bos L., 1999). Byl to Beijerinck, kdo si první uvědomil, že původce „mozaikové nemoci“ se liší od ostatních mikroorganismů. Později byly podobné patogeny objeveny i jako původci onemocnění lidí a zvířat a byly nazývány filtrovatelnými viry. Časem byl vynechán přívlastek filtrovatelný a zůstal pouze název virus (Bos L., 1999).

Další snahy vědců vedly ke stanovení chemických látek, ze kterých se viry skládají. Ve třicátých letech dvacátého století byly viry popsány jako komplex proteinu a nukleové kyseliny. Brzo poté byly poprvé pozorovány virové částice v elektronovém mikroskopu (Bos L., 1999).

Nejprve bylo na viry nahlíženo jen jako na původce nemocí. První názory byly takové, že stejný virus způsobuje všechny mozaikové nemoci rostlin. Další bádání a pokusy s očkováním různých druhů rostlin šťávou z nemocných rostlin přineslo poznání, že existuje více virů. Až toto poznání vedlo ke snaze jednotlivé viry dále zkoumat a popsat je. Popis virů zahrnoval nejen jejich pozorování elektronovým mikroskopem, ale i popis příznaků, které se po inokulaci virem objevovaly na rostlinách (van der Want a Dijkstra, 2006).

Byl zkoumán pohyb viru rostlinou, pohyb z buňky do buňky plazmodezmaty, stejně jako pohyb vaskulárním systémem rostliny při systémové infekci.

Sérologické metody a upravené Kochovy postuláty pro viry umožnily jasnou identifikaci virů jako původců konkrétních nemocí. S nástupem nových metod (sérologických a později molekulárních) se vědci začali více zabývat zkoumáním příbuzenských vztahů mezi viry a jejich klasifikací.

V dnešní době jsou to převážně metody molekulární biologie, které nám dovolují viry podrobně zkoumat, sekvenovat jejich genom a poznávat mechanismy replikace.

Stále však mnohé nevíme o množení viru v rostlinách. Nemáme žádné přesné informace o koncentraci viru v rostlině během infekce. Nevíme, kolikátý den po inokulaci je koncentrace viru v rostlině nejvyšší, a nevíme ani, jak se koncentrace viru mění v průběhu infekce v jednotlivých částech rostliny. Odpovědi na tyto otázky by nejen objasnily další podrobnosti ohledně virů, ale mohly by být využity i při ozdravování rostlin pomocí kultur meristémových vrcholů nebo k odhadnutí nejvhodnější doby k aplikaci různých ozdravných prostředků.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Virus mozaiky ředkvičky

Virus mozaiky ředkvičky (Radish mosaic virus – RaMV) objevil Tompkins roku 1939 v Kalifornii (Brunt *et al.*, 1996). V roce 1968 byl virus objeven v Japonsku (Tochihara, 1968), kde byl nejprve považován za jiný virus a nazván Radish enation mosaic virus. O rok později se zjistilo, že jde o izolát viru mozaiky ředkvičky (Campbell a Tochihara, 1969). První výskyt viru v Evropě byl zaznamenán v Jugoslávii (Štefanac a Mamula, 1972). Později byl virus nalezen v Maroku (Koenig a Fischer, 1981) a Iránu (Farzadfar *et al.*, 2004). Z tohoto výskytu se dá usuzovat, že virus je celosvětově rozšířen.

Příbuznost izolátů z různých částí světa byla posuzována pozorováním symptomů, okruhu hostitelských rostlin, které virus napadá, vektorů, které jsou schopny virus přenášet, ale hlavně pomocí sérologických testů – zvláště difuzního testu v agaru. Na základě těchto testů se zjistilo, že Radish enation mosaic virus je izolátem RaMV (Campbell a Tochihara, 1969). Štefanac a Mamula zjistili, že jugoslávský izolát HZ je sérologicky příbuzný avšak ne totožný s kalifornským izolátem RaMV. Jugoslávský izolát vykazoval i jisté rozdíly ve spektru hostitelských rostlin - neinfikoval ředkev, zato byl dobře adaptován na jiné rostliny čeledi *Brassicaceae* (Štefanac a Mamula, 1972). Při rozsáhlém testování izolátů z rozdílných lokalit a hostitelských rostlin v Čechách byla mezi těmito izoláty zjištěna sérologická variabilita. Heterologní reakce byly pozorovány i mezi izoláty z jednoho pole. Do těchto rozsáhlých pokusů byly zahrnuty také izoláty z Ruska a Itálie. Výskyt heterologních reakcí prokázal variabilitu mezi evropskými izoláty (Špak a Kubelková, 2000). Dnes má RaMV dvě sérologické podskupiny: izoláty z Kalifornie a Japonska a Evropské izoláty (ICTVdB Management, 2006).

RaMV se řadí do rodu *Comovirus*, který spolu s rody *Nepovirus* a *Fabavirus* patří do čeledi *Comoviridae* (Brunt *et al.*, 1996), která obsahuje neobalené rostlinné RNA viry. Název *Comovirus* je odvozen od *Cowpea mosaic virus* (CPMV), který je typickým představitelem tohoto rodu. Do rodu *Comovirus* jsou kromě RaMV a CPMV zařazeny další viry: *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 severe mosaic virus* (CPSVM), *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), *Ullucus virus C* (UVC) (ICTVdB Management, 2006). Do rodu *Comovirus* byl zařazen i nově objevený *Turnip ringspot virus* (TuRSV; Rajakaruna *et al.*, 2007).

Genom těchto rostlinných virů je rozdělen do dvou jednovláknových RNA s plus polaritou. Obě genomové RNA comovirů jsou zvlášť enkapsidovány do ikosahedrálních částic o průměru 28 nm (Pouwels *et al.*, 2002).

Spektrum hostitelských rostlin comovirů je poměrně úzké – většina comovirů, s výjimkou *Andean potato mottle virus*, *Squash mosaic virus* a viru mozaiky ředkvičky infikuje pouze rostliny čeledi *Leguminosae* (Komatsu *et al.*, 2007).

Virus mozaiky ředkvičky byl donedávna jediným comovirem, který napadá rostliny čeledi *Brassicaceae*. Přírodními hostiteli viru mozaiky ředkvičky jsou *Brassica campestris*, *B. campestris* ssp. *napus*, *B. oleracea*, *Raphanus sativus* a *Eruca sativa*. Mezi symptomy, které lze pozorovat na rostlinách infikovaných RaMV, patří mozaiky, deformace listů, kroužkovitost, chlorotické a nekrotické skvrny, systémové mozaiky. Za experimentálních podmínek je RaMV schopen infikovat rostliny z čeledí *Amaranthaceae*, *Chenopodiaceae*, *Brassicaceae*, *Cucurbitaceae*, *Solanaceae*. Mezi necitlivé hostitelské rostliny patří například *Beta vulgaris*, *Cucumis sativus*, *Cucurbita pepo*, *Vicia faba* (ICTVdB Management, 2006).



Obr. 1: Příznaky RaMV na *S. alba* dvacet dní po inokulaci.

RaMV je dobře přenosný mechanickou inokulací, dá se přenést roubováním (ICTVdB Management, 2006), ale nepřenáší se semeny (Campbell a Colt, 1967). Jako všechny comoviry je přenosný hmyzem řádu *Coleoptera*, jmenovitě brouky *Phyllotreta spp.*, *Epitrix hirtipennis* a *Diabrotica undecimpunctata* (Adams a Antoniwi, 2005).

Viriony RaMV jsou sférické a mají průměr 30 nm (ICTVdB Management, 2006). Kapsidy viru jsou tvořeny dvěma obalovými proteiny L (large – velký) a S (small – malý), z nichž každý se v jednom virionu nachází v šedesáti kopiích (Žemla *et al.*, 1998). Virus produkuje v rostlinách tři druhy částic, které lze oddělit gradientovou centrifugací – částice B (bottom, sedimentační koeficient 116 S), M (middle, 97 S) a T (top, 57 S), z nichž pouze částice B a M nesou genomovou RNA. Částice T jsou prázdné (Davies, 1985; Adams a Antoniwi, 2005). Částice B obsahují jednu molekulu RNA1 a částice M jednu molekulu RNA 2. Oba druhy částic jsou nutné k infekci virem (Kassanis *et al.*, 1973).

Velikost genomu RaMV je asi 10 000 nukleotidů (ICTVdB Management, 2006). Je tvořen jednovláknovou RNA, která je rozdělena na dvě molekuly - RNA1 a RNA2. Obě genomové RNA mají na svém 3' konci poly(A) trakt a na 5' konci kovalentně vázán VPg protein (Davies, 1985). VPg protein RaMV je s RNA spojen fosfodiesterovou vazbou, které se účastní 5' koncový nukleotid RNA a serinové reziduum proteinu (Drygin *et al.*, 1987). VPg protein chrání 5' konce genomové RNA, účastní se replikace, sestavování virionů a interaguje s geny rezistence a modulace reakce hostitele na infekci (Rosypal *et al.*, 2002).

Každá genomová RNA je translatována, čímž vznikne jeden dlouhý polyprotein, který je štěpen na jednotlivé funkční proteiny virovou proteázou. Zatímco RNA1 kóduje proteiny účastnící se replikace, RNA2 kóduje strukturní proteiny a proteiny podílející se na pohybu virionů z buňky do buňky (Spall *et al.*, 1997).

Kompletní sekvence RNA1 je dlouhá přibližně 6000 nukleotidů. Produktem translace této RNA je 210 K protein, který je virovou proteázou rozštěpen na pět proteinů: kofaktor proteázy (35 K), helikázu (68 K), VPg protein (3 K), proteázu (24 K), RNA dependentní RNA polymerázu (81 K). Gen pro polymerázu kóduje protein dlouhý 707 aminokyselin, což je kromě polymerázy APMoV (703 aa) nejkratší polymeráza comovirů (Petrzik *et al.*, 2005). Každý z těchto proteinů obsahuje domény a motivy charakteristické pro comoviry (Komatsu *et al.*, 2007).

Asi 4000 nukleotidů dlouhá RNA2 obsahuje jeden čtecí rámec se dvěma AUG start kodony. Začne-li translace na prvním AUG (nt 417-419) je produktem 123 K protein, který je

proteázou štěpen na kofaktor potřebný pro replikaci a velký a malý obalový protein. Při translaci z druhého start kodonu (nt 783-785) vznikne protein o hmotnosti 108 K. Tento protein je štěpen za vzniku velkého a malého obalového proteinu a movement proteinu (MP). Translace RNA2 u RaMV pravděpodobně začíná častěji z druhého start kodonu, stejně jako u ostatních comovirů (Komatsu *et al.*, 2007). Movement protein, který se vyskytuje u většiny rostlinných virů, pomáhá viru šířit se v rostlině (Carrington *et al.*, 1996). Dá se předpokládat, že stejně jako u CPMV, MP viru mozaiky ředkvičky vytváří tubulární útvary, kterými jsou částice viru přepravovány z buňky do buňky (Pouwels *et al.*, 2002), a při tomto procesu interaguje svým C-koncem s virovými částicemi (Carvalho *et al.*, 2003; Bertens *et al.*, 2003).

2.2 Turnip ringspot virus

Turnip ringspot virus (TuRSV) byl objeven v roce 1996 v Ohiu. Na rostlinách čeledi *Brassicaceae* byly pozorovány chlorotické skvrny a mozaiky (Rajakaruna *et al.*, 2007). První publikace o viru se objevila až v roce 2007. Protože virus byl objeven teprve nedávno, mnoho o něm zatím není známo.

Elektronová mikroskopie odhalila ikosahedrální částice o průměru asi 28 nm a na základě alignmentu osekvenovaných fragmentů z RT-PCR byl virus zařazen do rodu *Comovirus*. Byla zjištěna velikost obalového proteinu 40 K, což odpovídá velikosti obalového proteinu u comovirů.

Pomocí RT-PCR byly získány krátké sekvence RNA tohoto nového viru. Při porovnání těchto úseků s odpovídajícími úseky RNA viru RaMV byla zjištěna homologie 70,1% na nukleotidové úrovni a 78,7% na aminokyselinové úrovni pro RNA1. Homologie s ostatními comoviry byla nižší.

TuRSV je mechanicky přenosný na rostliny čeledi *Brassicaceae*. Při inokulaci různých ekotypů *A. thaliana* byly pozorovány různé symptomy – některé rostliny po inokulaci odumřely, jiné ekotypy se ukázaly být vůči infekci odolné (Rajakaruna *et al.*, 2007).

V roce 2007 byl virus objeven v izolátu z čínského zelí z Ruska. To ukazuje na výskyt viru nejen v Americe, ale také v Evropě (Koloniuk *et al.*, 2008).

2.3 Real - time PCR

Real-time PCR je molekulární metoda založená na principu klasické PCR (polymerázové řetězové reakce). Při klasické PCR je amplifikovaný produkt detekován po proběhnutí reakce pomocí gelové elektroforézy. Při real-time PCR je produkt detekován a měřen po každém cyklu, což umožňuje detekci produktu a zároveň kvantifikaci výchozího množství templátu. Odpadá potřeba gelové elektroforézy, čímž se zkracuje čas potřebný pro získání výsledků.

Při real-time PCR je možno pracovat také s RNA, pak mluvíme o real-time RT PCR. Real-time RT PCR je zvláště používána pro expresní analýzy (Leong *et al.*, 2007; Bustin, 2000), kde je díky vysoké citlivosti a snadnému provedení ideálním nástrojem pro detekci a kvantifikaci mRNA.

Detekce PCR produktu v průběhu reakce je umožněna přidáním fluorescenční barvy do reakční směsi. Zvýšení množství PCR produktu se odrazí ve zvýšení fluorescence. Speciální cycler, ve kterém reakce probíhá, měří fluorescenci po každém cyklu a zaznamenává údaje.

Tyto údaje jsou posléze softwarem vyneseny do grafu, kde na ose x leží jednotlivé cykly (např. 1-35) a na ose y je vynesena fluorescence. Křivka amplifikační reakce má dvě fáze: exponenciální, ve které se množství PCR produktu zdvojnásobí v každém cyklu a neexponenciální plateau fázi, kde došlo k vyčerpání některé z komponent reakce.

Na počátku reakce je fluorescence nízká a nedetekovatelná. S průběhem reakce se postupně hromadí množství PCR produktu, čímž narůstá i fluorescence. Cyklus, ve kterém se nahromadilo tolik PCR produktu, že fluorescence byla detekována, se nazývá threshold cycle (C_t). Hodnoty C_t jsou různé pro jednotlivé vzorky a závisí na počátečním množství templátu. Větší množství templátu znamená, že méně cyklů stačí na dostatečný (detekovatelný) nárůst fluorescence. Takový vzorek má nižší C_t . Hodnota C_t je stanovena v exponenciální části, kdy žádná z reakčních komponent není limitující (Bustin, 2000).

K ověření spolehlivosti reakce slouží standardní křivka. K sestrojení standardní křivky je zapotřebí provést reakci s ředící řadou templátů. Standardní křivka se sestrojí vnesením logaritmu množství templátu (nebo ředícího faktoru) oproti C_t pro dané ředění. Standardní křivka je většinou produkována softwarem, který také spočítá korelační koeficient. Korelační koeficient nám dává informaci o tom, jaká je variabilita mezi replikáty a zda je amplifikace stejně efektivní pro různé výchozí koncentrace templátu (Dorak, 2006). Korelační koeficient

nám také ukazuje chybu při ředění a pipetování. Optimální hodnota korelačního koeficientu je $\geq 0,990$.

PCR produkty je možné ověřit analýzou křivky tání (melt-curve analysis). Po skončení PCR reakce je postupně zvyšována teplota a zároveň měřena fluorescence. S rostoucí teplotou PCR produkty postupně denaturují, čímž fluorescence klesá. Změna fluorescence je vynesena do grafu jako funkce změny teploty. Jednotlivé vrcholy křivky představují PCR produkty charakteristické svou teplotou tání (T_m). Tato analýza nám umožňuje odhalit nespecifické amplifikace i bez gelové elektroforézy (Dorak, 2006).

Existují dva základní typy chemických přístupů využívaných v real-time PCR: přidání nespecifických interkalačních fluorescenčních látek (SYBR Green I, YO-PRO-1, etidium bromid; Mackay *et al.*, 2002) do reakční směsi nebo použití značených sekvenčně specifických primerů a prób (TaqMan, molecular beacons, scorpions primer).

Nenavázaný SYBR Green I v roztoku vykazuje nízkou fluorescenci. Má schopnost vázat se nespecificky na dsDNA, což vede ke značnému zvýšení fluorescence. V PCR reakci se váže na nově vznikající dvouvláknové úseky při extenzi primerů a tím dochází ke zvýšení fluorescenčního signálu, který je po každé extenzi měřen. Vzhledem k nespecifické vazbě na dsDNA dochází k začlenění i do nespecifických PCR produktů nebo dimerů primerů. Tímto dochází k nepřesnostem a zkreslení výsledků. Nespecifické produkty lze detekovat analýzou křivky tání (Bustin a Nolan, 2004).

Výhodou nespecifických fluorescenčních barev je nízká cena a jednoduchost provedení. Při vhodném designu pokusu a optimalizaci PCR reakce lze dosáhnout výsledků srovnatelných s přístupem TaqMan, který obecně zajišťuje větší specifitu reakce (Ponchel *et al.*, 2003). Jednou z nevýhod tohoto přístupu je nemožnost využití pro multiplex reakce (reakce s několika páry primerů v jedné zkumavce) - není možné odlišit fluorescenční signál jednotlivých amplikonů ve zkumavce.

Použití značených oligonukleotidů a prób využívá fluorescenčně rezonančního přenosu energie (FRET) mezi fluoroforem a zhášedčem nebo jiný princip zhášení fluorescence. FRET je spektroskopický proces přenosu energie mezi dvěma molekulami vzdálenými až 100 Å (Mackay *et al.*, 2002). Tento princip se používá, aby zabránil fluorescenci próby nebo značeného oligonukleotidu před jejím specifickým navázáním při amplifikaci produktu.

Nejpoužívanější technologií, která využívá značenou próbu je TaqMan. TaqMan kromě sekvenčně specifických primerů vyžaduje přítomnost sekvenčně specifické TaqMan próby, která na svém 5' konci nese fluorescenční reportérovou molekulu a na 3' konci zhášedč

fluorescence. Intaktní próba nevykazuje žádnou fluorescenci díky blízkosti reportéru a zhášedce. Při annealingu hybridizuje próba na cílovou sekvenci ve směru extenze nového řetězce. 5'-3' exonukleázová aktivita DNA polymerázy odštěpí při extenzi primeru reportérovou molekulu (ta se uvolní z blízkosti zhášedce) a dojde k uvolnění fluorescence, která je detekována (Bustin, 2000).

Výhodou použití značených prób je specifita reakce. Mezi nevýhody patří složitější design prób a finanční náročnost.

Jak již bylo uvedeno, hlavní předností real-time PCR je možnost stanovení výchozího množství templátu. Je možné použít absolutní nebo relativní kvantifikaci templátové DNA. Absolutní kvantifikace udává přesné množství templátu na počátku reakce v daných jednotkách (μg , copy number), často přepočítané na množství tkáně nebo počet buněk. Relativní kvantifikace zaznamenává změny v expresi genů (v množství templátu) mezi vzorky a vyjadřuje je v poměru k množství jiné DNA, která slouží jako standard neboli referenční gen. Kvantifikace je tedy relativní – udává množství templátu vzhledem k množství templátu jiného vzorku (Bustin, 2000, Pfaffl 2001). Pro relativní i absolutní kvantifikaci je vyvinuto několik matematických postupů zpracování dat.

Spektrum technologií real-time PCR umožňuje použití této metody v nejrůznějších aplikacích a oborech. Velice rozšířené je použití real-time PCR v molekulární diagnostice, například k detekci a kvantifikaci lidských (herpes simplex viru, lidského cytomegaloviru; Mackay *et al.*, 2002) a rostlinných virů (Mason *et al.*, 2008, Webster *et al.*, 2004) nebo plísň a bakteriálních patogenů (Brouwer *et al.*, 2003). Real-time PCR slouží také k detekci a stanovení obsahu GMO (geneticky modifikovaných organismů) ve vzorcích potravin (Hernández *et al.*, 2001, Mäde *et al.*, 2006). Díky možnosti kvantifikovat výchozí množství templátu je real-time PCR často využívána při studiu exprese genů.

Vzhledem k širokému využití metody se dá očekávat velký rozvoj technologií real-time PCR v budoucnosti. V současné době se objevují první systémy umožňující real-time PCR na mikročipu o velikosti mikroskopového krycího sklíčka (Mumford *et al.*, 2006). Vyvíjena je real-time PCR na mikročipu, kde je množství amplifikované DNA po každém cyklu detekováno měřením elektrochemického signálu (Yeung *et al.*, 2008).

3. CÍLE PRÁCE

Cílem mé práce bylo stanovit relativní množství virové RNA virů RaMV a TuRSV v rostlinách v průběhu virové infekce pomocí real-time PCR a na základě získaných údajů porovnat úspěšnost replikace a šíření těchto dvou comovirů.

4. MATERIÁL A METODY

4.1 Biologický materiál

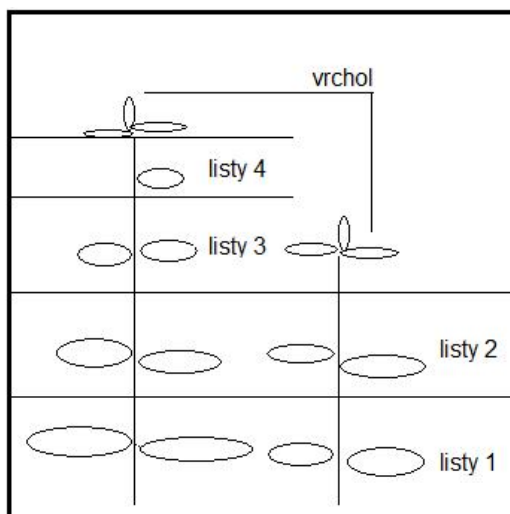
Pracovala jsem s viry RaMV a TuRSV. Izoláty virů pocházejí ze sbírky oddělení Rostlinné virologie, Ústav molekulární biologie rostlin, AVČR. Pro očkování rostlin jsem použila izolát RaMV1, který byl nalezen v *Brassica napus* L. var. *silvestris* nedaleko Českého Krumlova (Špak, 1992). Izolát viru TuRSV M3 pochází z Ruska. Byl nalezen v rostlině *Brassica pekinensis* z botanické zahrady moskevské státní univerzity (Koloniuk *et al.*, 2008).

4.2 Očkování rostlin

Pro očkování pokusných rostlin byly použity příznakové listy z rostlin naočkovaných příslušnými izoláty (RaMV1 a M3). Před očkovaním byly rostliny testovány pomocí real-time PCR pro zjištění relativního množství viru. V rostlině s virem RAMV1, kterou byly očkovány pokusné rostliny bylo 1,6 x více virové RNA než 18S ribozomální RNA (standardu). V rostlině infikované izolátem M3 byla hladina virové RNA 1.3 x vyšší než hladina standardu (výpočet viz 4.7 Výpočty relativního množství virové RNA). Množství obou virů v rostlinách, které byly použity k inokulaci, bylo řádově stejné. Listy byly homogenizovány v třecí misce spolu s 0,1 M fosfátovým pufrem o pH 7. Vzniklá suspenze byla nanášena na všechny listy očkovaných rostlin. Inokulum bylo po dvou hodinách opláchnuto vodou z konve. Oba viry byly očkovány na rostliny hořčice bílé (*Sinapis alba*). Na očkování byly vybrány rostliny přibližně stejně velké a se stejným počtem listů. Rostliny byly kultivovány ve skleníku při teplotě 15-20°C.

4.3 Odebírání vzorků

Každým virem bylo naočkováno třicet rostlin. Aby bylo možné stanovit množství viru v průběhu virové infekce, vzorky byly odebírány ve dnech 1, 2, 5, 10, 20 a 30 ode dne inokulace. Den inokulace byl počítán jako den 0. Každý den odběru vzorků bylo zpracováno pět rostlin od každého viru následujícím způsobem: rostlina byla rozdělena na jednotlivé segmenty podle počtu listů a stejné segmenty z pěti rostlin byly zamrazeny jako jeden vzorek. Jeden segment znamená jedno patro listů a půl stonku mezi dalším patrem. Posledním segmentem u každé rostliny byl vrchol. Pro každý den odběru bylo tolik vzorků, kolik měla rostlina pater listů (viz obrázek 2). Tento způsob odběru vzorků byl zvolen tak, aby umožnil stanovit množství viru v jednotlivých částech rostlin v průběhu virové infekce.



Obr. 2: Schéma rozdělení rostlin při odebrání vzorků.

Pro stanovení množství virové RNA RaMV a TuRSV v rostlinách byly použity zdravé rostliny *S. alba* jako standard: 35 zdravých rostlin bylo kultivováno za stejných podmínek jako rostliny inokulované virem. Z těchto rostlin byly odebrány vzorky ve stejných dnech jako z infikovaných rostlin a navíc i v den 0. Každý den odběru vzorku bylo zpracováno pět rostlin. Rostliny nebyly děleny na segmenty, ale všechny byly sklizeny a smíchány jako jeden vzorek. Vzorky ze všech dní byly smíchány, a vznikl tak jeden standardní vzorek. Tento vzorek byl použit jako standard ke stanovení množství virů RaMV i TuRSV. Všechny vzorky byly skladovány v mrazáku při teplotě - 20°C.

4.4 Izolace RNA

RNA byla izolována kitem RNeasy[®] Plant Mini Kit od firmy QIAGEN. Izolace byla provedena podle návodu. RNA byla eluována do 35 µl H₂O. Kolonka byla tímto objemem promyta dvakrát. Při homogenizaci tkáně v tekutém dusíku byl vždy homogenizován celý vzorek (tedy směs stejných segmentů z pěti rostlin) a na izolaci RNA bylo z homogenizovaného vzorku odebráno 100 mg. Postup homogenizace celého vzorku a následné odebrání přibližně 100 mg materiálu byl zvolen proto, aby ve vzorku RNA byla skutečně obsažena RNA ze všech pěti rostlin, které tvořily vzorek.

4.5 Reverzní transkripce

Reverzní transkripce byla provedena s použitím enzymu RevertAid[™] H Minus M-MuLV Reverse transcriptase od firmy Fermentas. Tato reverzní transkriptáza je geneticky modifikovaná reverzní transkriptáza Moloney Murine Leukemia viru, která se od původní

reverzní transkriptázy liší mimo jiné ztrátou ribonukleázové H aktivity. Reakční směs byla míchána do objemu 10 μl . Složení reakční směsi viz tabulka 1 (Tab. 1).

| Složky reakční směsi | Objem složky |
|--|-------------------|
| Sterilní voda | 5 μl |
| M-MuLV reverzní transkriptáza 200 u/ μl | 0,5 μl |
| 5x reakční pufr | 2 μl |
| dNTP mix Roche (10 mM každý dNTP) | 1 μl |
| Random Hexamer primer (Fermentas) 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ | 0,5 μl |
| RNA | 1 μl |

Tab. 1: Složení reakční směsi při reverzní transkripci.

Reakce byla prováděna v cycleru MiniCycler (Biotech) za následujících podmínek.

- 10 min 25°C
- 30 min 42°C
- 10 min 70°C

4.6 Real-time PCR

Real-time PCR byla provedena s využitím interkalačního barviva SYBR Green I. Pro přípravu reakční směsi byl použit kit qPCR 2x SYBR Master Mix od firmy Top-Bio s.r.o. Reakční směs byla míchána do objemu 12,5 μl . Složení reakční směsi viz tabulka 2 (Tab. 2). Postup při míchání reakční směsi: byly připraveny reakční směsi vždy pro 10 vzorků. Tato reakční směs byla rozpipetována do 200 μl zkumavek pro PCR. Potom byl přidán templát do jednotlivých vzorků. Vzorky byly dány do cycleru a místo víček byla použita speciální krycí folie (BioRad) pro real-time analýzu umožňující odečet fluorescence a zabraňující vypaření vzorků.

| Složení reakční směsi | Objem složky |
|-------------------------|--------------|
| qPCR 2x SYBR Master Mix | 6,25 µl |
| Primer 1 (1µM) | 0,5 µl |
| Primer 2 (1µM) | 0,5 µl |
| Sterilní voda | 4,75 µl |
| DNA | 0,5 µl |

Tab. 2: Složení reakční směsi při real-time PCR.

Při real-time PCR byly použity tři sady primerů. Jedna sada k detekci viru RaMV, druhá k detekci viru TuRSV a třetí sada byly primery pro interní standard. Při relativní kvantifikaci virové RNA je třeba její množství vztáhnout k množství nějaké jiné nukleové kyseliny. Jako tento standard byla zvolena rostlinná ribozomální 18S RNA. Přehled použitých primerů je v tabulce 3 (Tab. 3).

| | |
|---|---------------------------------------|
| Primery RaMV (produkt 417 bp) | Sekvence primeru |
| 209E4 | 5'-TGA TGT TGC ATG GCA ATA TG-3' |
| 248I5 | 5'-TTG GTA TGC TGG AAA CCG AG-3' |
| Primery TuRSV (produkt 355 bp) | |
| 361R5 | 5'-GCC AGT TGA TCG CTC TAA CTC C-3' |
| 361R6 | 5'-TGG GAT GTT AAT GAG TGT TCT GCT-3' |
| Primery 18S RNA (produkt 301 bp) | |
| 359A1 | 5'-CGT TGA GGA CTT TGG GTC AT-3' |
| 359A2 | 5'-GCG AAA TGC GAT ACT TGG TG-3' |

Tab. 3: Seznam primerů a jejich sekvence.

Real-time PCR byla prováděna v iCycleru od firmy BioRad, který byl napojen na počítač a ovládán příslušným softwarem (iCycler™ iQ Optical System Software). Spolu se vzorky virů byly do cycleru pro každou sadu vzorků přidány vzorky standardu (zdravá *S. alba* - s příslušným párem primerů 359A1, 359A2) naředěné tak, aby software podle nich vytvořil kalibrační křivku. Vzorky pro vytvoření kalibrační křivky byly ředěny vždy čtyřikrát (1x, 4x, 16x, 64x, 256x). Vzorky standardu i vzorky virů byly do cycleru vždy dávány v triplikátech – každý vzorek ve třech zkumavkách. PCR probíhala podle programu viz tabulka 4 (Tab. 4).

Spolu se vzorky a standardní křivkou byla přidána i negativní kontrola (reakční směs bez přidání templátu).

| Cyklus (opakování) | Teplota | Délka trvání | Děje v průběhu PCR reakce |
|--------------------|----------------|--------------|-------------------------------------|
| Cyklus 1 (1x) | 94°C | 30 sec | Denaturace |
| Cyklus 2 (35x) | 94°C | 30 sec | Denaturace |
| | 50°C | 30 sec | Nasedání primerů |
| | 72°C | 30 sec | Syntéza DNA, odečítání fluorescence |
| Cyklus 3 (1x) | 72°C | 1 min | Dokončení syntézy |
| Cyklus 4 (1x) | 95°C | 1 min | Denaturace |
| Cyklus 5 (120x) | 40°C + 0,5°C * | 10 sec | Křivka tání |

Tab. 4: Podmínky real-time PCR reakce v iCycleru. *Cyklus 5 začíná na teplotě 40°C a s každým opakováním cyklu se teplota zvedá o 0,5°C. Trvání jednoho cyklu je 10 sec. Po skončení těchto cyklů přístroj chladí vzorky na 4°C.

Po skončení PCR reakce nebyly vzorky kontrolovány pomocí gelové elektroforézy. Místo gelové elektroforézy byla k ověření vzorků použita analýza křivky tání PCR produktů.

4.7 Výpočty relativního množství virové RNA

Po proběhnutí PCR reakce software sám provede analýzu vzorků a určí C_t hodnotu pro jednotlivé vzorky. Pomocí softwaru lze nastavit jakým způsobem má software data vyhodnotit a lze také nastavit hodnotu treshold a baseline. V tomto pokusu byly hodnoty treshold a baseline počítány automaticky softwarem. Pro stanovení C_t jednotlivých vzorků byl použit mód PCR Base Line Subtracted Curve Fit.

Z určených standardů a ze zadání ředícího faktoru software spočítá regresní rovnici, regresní koeficient a účinnost reakce. Tyto hodnoty dávají informaci o preciznosti provedení a správném průběhu reakce. Všechny vzorky byly připravovány v triplikátech, pro výpočet byl z těchto triplikátů udělán průměr jejich C_t hodnot. Lišila-li se hodnota C_t u jednoho z triplikátů více než o 1,0 od ostatních dvou hodnot, byla tato hodnota vyřazena z počítání průměru.

Pro každý vzorek byla spočtena ΔC_t jako rozdíl C_t standardu a C_t vzorku (při stejném ředění templátu). Každá sada vzorků měla v cycleru svou vlastní kalibrační křivku

z nařaděných standardních vzorků. Výpočty byly provedeny vždy podle hodnot standardu, který náležel dané sadě vzorků.

Při klasickém postupu by pro každý vzorek viru měla být namíchána další reakce se stejným templátem, ale s primery interního standardu. Z důvodu šetření počtu reakcí byla zvolena aproximace – jeden standardní vzorek (směsný vzorek *S. alba* viz 4.3 Odebírání vzorků), který slouží ke konstrukci standardní křivky a k výpočtu ΔC_t . Jako interní standard byla zvolena 18S rostlinná ribozomální RNA, u níž předpokládáme přibližně stejnou úroveň exprese v rostlinách. Směsný standardní vzorek byl vytvořen (viz 4.3 Odebírání vzorků) tak, aby byl průměrnou hodnotou obsahu 18S RNA v rostlinách v průběhu růstu. K této průměrné hodnotě bylo při výpočtu vztaženo relativní množství virové RNA.

Relativní rozdíl (R) v množství virové RNA a ribozomální RNA byl spočten podle vzorečku $R=2^{C_t(\text{standard})-C_t(\text{vzorek})}$. Provedená kvantifikace je relativní: byl spočítán poměr mezi množstvím ribozomální a virové RNA.

5. VÝSLEDKY

Následující pasáž o rozsahu 10 stran obsahuje utajované skutečnosti a je obsažena pouze v archivovaném originále diplomové práce uloženém na Přírodovědecké fakultě JU.

6. DISKUZE

Pro stanovení a kvantifikaci virové RNA v rostlinách je základním předpokladem snaha naočkovat rostliny přibližně stejným množstvím inokula o stejné koncentraci. Naočkování všech rostlin stejným množstvím inokula není možné, ale byla vyvinuta maximální snaha snížit variabilitu v množství inokula mezi jednotlivými rostlinami. Rostliny, které byly použity jako inokulum pro očkování pokusných rostlin, byly testovány pomocí real-time PCR. Byla spočtena relativní koncentrace viru v těchto rostlinách. Vzhledem k řádově stejné koncentraci virů nebyla inokulační směs ředěna.

Koncentrace viru v rostlinách použitých pro očkování pokusných rostlin byla stanovena ve vzorku jednoho příznakového listu. Koncentrace v jiných listech téže rostliny mohla být odlišná. Vzhledem k tomu, že na přípravu inokula byly použity příznakové listy, nepředpokládám, že by se koncentrace v těchto listech výrazně lišila od listů testovaných.

Ani při stejné koncentraci inokula nelze zajistit rovnoměrné naočkování rostlin. Proto byl pokus navržen tak, že vždy pět rostlin bylo smícháno jako jeden vzorek. Tím se snížila variabilita při očkování, ale i variabilita reakce rostliny na infekci. K dalšímu snížení variability by jistě přispěla kultivace rostlin v klimaboxu za standardních tepelných i světelných podmínek.

Pro spolehlivou kvantifikaci RNA musí být RNA izolována standardním robustním způsobem, a ze stejného množství tkáně. Aby byl výnos RNA co nejvyšší, tkáň byla homogenizována v tekutém dusíku. K izolaci byl použit kit od firmy Qiagen, který lze s úspěchem použít na většinu rostlinných tkání (López *et al.*, 2003).

Reverzní transkripce byla provedena s použitím random hexamerů. Tento způsob je běžně využíván pro přípravu cDNA pro real-time PCR (Bustin *et al.*, 2005).

Vlastní real-time PCR byla prováděna s využitím SYBR Green I. Využití tohoto nespecifického interkalačního barviva může vnést chybu do analýzy vzorků v případě, že dojde k nespecifické amplifikaci. Proto po každé real-time PCR byla provedena analýza křivky tání PCR produktů, aby se vyloučila přítomnost nespecifických produktů (a tudíž zvýšení fluorescence).

Spolehlivost reakce byla kontrolována pomocí kalibrační křivky, korelačního koeficientu a účinnosti reakce. Byly použity sady primerů, které umožňují amplifikaci podobně dlouhých produktů. Nemohlo tedy dojít k nepoměrně vysoké fluorescenci dlouhého produktu. Při míchání reakčních směsí bylo postupováno vždy stejně, aby byla minimalizována jakákoli variabilita mezi vzorky způsobená nepřesnou prací.

Výsledek relativní kvantifikace je ovlivněn volbou standardu (referenčního genu), k jehož expresi je vztahováno množství virové RNA. Vzhledem k tomu, že v době navrhování primerů standardu nebylo osekvenováno mnoho genů *S. alba*, byla jako standard zvolena 18S ribozomální RNA. Ribozomální RNA je v izolované totální RNA bohatě zastoupena. Bylo vyzkoušeno několik ředění standardního vzorku a testováno mnoho rostlin naočkovaných viry, aby se zjistilo, zda ribozomální RNA není v příliš velkém nadbytku k virové RNA. Těmito pokusy se zjistilo, že 18S ribozomální RNA lze použít i neředěnou k porovnání množství virové RNA v rostlinách.

Ribozomální RNA je často používaný standard (referenční gen) v různých expresních studiích. Předpokládalo se, a pokusy bylo prokázáno, že hladina ribozomální RNA je stálá a jen velmi málo se mění (Nicot *et al.*, 2005). Na bramboru byly prováděny expresní analýzy genů při biotickém a abiotickém stresu. Bylo testováno sedm neregulačních „housekeeping“ genů (β -tubulin, cyclophilin, actin, $ef1\alpha$, 18S rRNA, adenine phosphoribosyl transferase, cytoplasmic ribosomal protein L2) pro použití jako referenční geny. Z těchto zkoumaných referenčních genů měla 18S rRNA nejvyšší hladinu exprese (Nicot *et al.*, 2005). Fakt, že u pokusných rostlin množství virové RNA u několika vzorků převýšilo množství 18S ribozomální RNA, poukazuje na velmi vysokou koncentraci virové RNA v rostlinách.

Dříve byla koncentrace virů v rostlinách stanovována na základě počítání lokálních lézí. Šťáva z infikovaných rostlin byla ředěna a nanášena na listy citlivých pokusných rostlin. Po objevení příznaků byly počítány lokální léze a podle stupně ředění a kalibrační křivky byla odhadnuta koncentrace viru (Bald, 1936). Dalším způsobem, jak stanovit koncentraci viru, bylo míchání různě ředěných vzorků viru s ředěným antisérem (Coutts a Cocking, 1972). Těmito metodami byla stanovována koncentrace viru ve vzorcích, ale nikdo se nezabýval stanovením koncentrace viru v průběhu infekce. Dnes je k dispozici široké spektrum metod, přesto se nepodařilo najít literaturu zabývající se koncentrací rostlinných virů v průběhu infekce.

Použití real-time PCR se ukázalo být vhodným přístupem ke stanovení koncentrace viru v průběhu infekce. Pro získání přesnějších výsledků by bylo dobré kultivovat inokulované rostliny za standardních podmínek. Rostliny v mém pokusu byly kultivovány ve skleníku, kde kolísá teplota i světlo. Pokus s oběma viry probíhal současně, lze tedy vyloučit ovlivnění průběhu infekce jednoho nebo druhého viru různými podmínkami kultivace. Pro další pokusy by bylo vhodné použít více pokusných rostlin. Ani toto opatření však nemusí zaručit snížení variability mezi jednotlivými rostlinami. Určitě by mělo smysl sledovat změny

v koncentraci virové RNA déle než po třicet dní ode dne inokulace. V den třicet nebyl virus v rostlinách rovnoměrně zastoupen, dá se předpokládat, že koncentrace viru může dále narůstat.

7. ZÁVĚR

Pomocí real-time bylo stanoveno relativní množství virů RaMV a TuRSV v rostlinách *S. alba*. Relativní množství virové RNA v rostlinách bylo vztaženo k průměrné hladině rostlinné 18S ribozomální RNA. Získaná data byla dána do souvislosti s šířením a množením viru v rostlině. Byly porovnány koncentrace virů RaMV a TuRSV a jejich úspěšnost v šíření a množení se v *S. alba*.

8. REFERENCE

- Adams M. J., Antoniw J. F. (2005): DPVweb: An open access internet resource on plant viruses and virus diseases. *Outlooks on Pest Management* 16: 268-270.
- Bald J. G. (1936): The use of numbers of infections for comparing the concentration of plant virus suspensions. Australian Council for Scientific and Industrial Research: 33-54.
- Bertens P., Heijne W., Van der Wel N., Wellink J., Van Kammen A. (2003): Studies on the C-terminus of the *Cowpea mosaic virus* movement protein. *Archives of Virology* 148: 265-279.
- Bos L. (1999): Plant viruses, unique and intriguing pathogens – a textbook of plant virology (str. 1-358). Backhuys Publishers Leiden.
- Brouwer M., Lievens B., Van Hemelrijck W., Van den Ackerveken G., Cammue B. P. A., Thomma B. P. H. J. (2003): Quantification of disease progression of several microbial pathogens on *Arabidopsis thaliana* using real-time fluorescence PCR. *FEMS Microbiology Letters* 228: 241-248.
- Brunt A. A., Crabtree K., Dallwitz M. J., Gibbs A. J., Watson L. and Zurcher E. J. (1996): Plant viruses online: Descriptions and lists from the VIDE database. Version: 20th August 1996. <http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/vide/>
- Bustin S. A. (2000): Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* 25: 169-193.
- Bustin S. A., Benes V., Nolan T., Pfaffl M. W. (2005): Quantitative real-time RT-PCR – a perspective. *Journal of Molecular Endocrinology* 34: 597-601.
- Bustin S. A., Nolan T. (2004): Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *Journal of Biomolecular Techniques* 15 (3): 155-166.
- Campbell R. N., Colt W. M. (1967): Transmission of *Radish mosaic virus*. *Phytopathology* 57: 502-509.
- Campbell R. N., Tochihara H. (1969): *Radish enation mosaic virus* is a strain of *Radish mosaic virus*. *Phytopathology* 59: 1756-1757.
- Carrington J. C., Kasschau K. D., Mahajan S. K., Schaad M. C. (1996): Cell-to-cell and long-distance transport of viruses in plants. *The Plant Cell* 8: 1669-1681.

- Carvalho C. M., Wellink J., Ribeiro S. G., Goldbach R. W., van Lent J. W. M. (2003): The C-terminal region of the movement protein of *Cowpea mosaic virus* is involved in binding to the large but not to the small coat protein. *Journal of General Virology* 84: 2271-2277.
- Coutts R. H., Cocking E. C. (1972): Infection of tobacco mesophyll protoplasts with *Tobacco mosaic virus*. *Journal of General Virology* 17: 289-294.
- Davies J. W. (1985): *Molecular plant virology* (str. 1-229). Volume II. CRC Press, Inc.
- Dorak M. T. (Ed.; 2006): *Real-time PCR* (str. 1-154). Taylor and Francis group.
- Drygin Y. F., Sapotsky M. V., Bogdanov A. A. (1987): *Radish mosaic virus* VPg. Characteristics and linkage with virion RNAs. *FEBS Letters* 215 (2): 247-251.
- Farzadfar S., Pourrahim R., Golnaraghi A. R., Jalali S. (2004): Occurrence of *Radish mosaic virus* on cauliflower and turnip crops in Iran. *Plant Disease* 88: 909.
- Hernández M., Río A., Esteve T., Prat S., Pla M. (2001): A rapeseed – specific gene, *Acetyl-CoA carboxylase*, can be used as a reference for qualitative and real-time quantitative PCR detection of transgenes from mixed food samples. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 49: 3622-3627.
- ICTVdB Management (2006): 00.018.0.01.013. *Radish mosaic virus*. ICTVdB – The Universal Virus Database, version 4. Büchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA.
- Kassanis B., White R. F., Woods R. D. (1973): Genetic complementation between middle and bottom components of two strains of *Radish mosaic virus*. *Journal of General Virology* 20: 277-285.
- Koenig R., Fischer H. U. (1981): A Moroccan *Radish mosaic virus* isolate from turnip. *Plant Disease* 65 (9): 758-760.
- Koloniuk I., Špak J., Petrzik K. (2008): *Turnip ringspot virus* recognised on Chinese cabbage in Russia. *European Journal of Plant Pathology* DOI 10.1007/s10658-008-9283-4
- Komatsu K., Hashimoto M., Maejima K., Ozeki J., Kagiwada S., Takahashi S., Yamaji Y., 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.
- Leong D. T., Gupta A., Bai H. F., Wan G., Yoong L. F., Too H., Chew F. T., Hutmacher D. W. (2007): Absolute quantification of gene expression in biomaterials research using real-time PCR. *Biomaterials* 28: 203-210.
- López M. M., Bertolini E., Olmos A., Caruso P., Gorris M. T., Llop P., Penyalver R., Cambra M. (2003): Innovative tools for detection of plant pathogenic viruses and bacteria. *International Microbiology* 6: 233-243.
- Mackay I. M., Arden K. E., Nitsche A. (2002): Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Research* 30 (6): 1292-1305.
- Mäde D., Degner Ch., Grohmann L. (2006): Detection of genetically modified rice: a construct-specific real-time PCR method based on DNA sequences from transgenic Bt rice. *European Food Research and Technology* 224: 271-278.
- Mason G., Caciagli P., Accotto G. P., Noris E. (2008): Real-time PCR for the quantitation of *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* in tomato plants and in *Bemisia tabaci*. *Journal of Virological Methods* 147: 283-289.
- Mumford R., Boonham N., Tomlinson J., Barker I. (2006): Advances in molecular phytodiagnostics – new solutions for old problems. *European Journal of Plant Pathology* 116: 1-19.
- Nicot N., Hausman J., Hoffmann L., Evers D. (2005): Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *Journal of Experimental Botany* 56 (421): 2907-2914.
- Petrzik K., Holá M., 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.
- Pfaffl M. W. (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29 (9): 2002-2007.
- Ponchel F., Toomes C., Bransfield K., Leong F. T., Douglas S. H., Field S. L., Bell S. M., Combaret V., Puisieux A., Mighell A. J., Robinson P. A., Inglehearn Ch. F., Isaacs J. D., Markham A. F. (2003): Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: An

- alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC Biotechnology* 3 (18).
- Pouwels J., Carette J. E., van Lent J., Wellink J. (2002): *Cowpea mosaic virus*: effects on host cell processes. *Molecular Plant Pathology* 3 (6): 411-418.
- Rajakaruna P., Khandekar S., Meulia T., Leisner S. M. (2007): Identification and host relations of *Turnip ringspot virus*, a novel comovirus from Ohio. *Plant Disease* 91 (10): 1212-1220.
- Rosypal S., Doškař J., Petržík K., Růžičková V. (2002): Úvod do molekulární biologie, díl 4. (str. 925-929). Brno.
- Spall V. E., Shanks M., Lomonossoff G. P. (1997): Polyprotein processing as a strategy for gene expression in RNA viruses. *Seminars in Virology* 8: 15-23.
- Špak J. (1992): Characterization, purification and serology of the czechoslovak isolate of *Radish mosaic virus*. *Acta virologica* 36: 191-197.
- Špak J., Kubelková D. (2000): Serological variability among European isolates of *Radish mosaic virus*. *Plant Pathology* 49: 295-301.
- Štefanac Z., Mamula D. (1972): A strain of *Radish mosaic virus* occurring in turnip in Yugoslavia. *Annals of Applied Biology* 69: 229-234.
- Tochihara H. (1968): *Radish enation mosaic virus*. *Annals of the Phytopathological Society (Japan)* 34: 129-136.
- van der Want J. P. H., Dijkstra J. (2006): A history of plant virology. *Archives of Virology* 151: 1467-1498.
- Webster C. G., Wylie S. J., Jones M. G. K. (2004): Diagnosis of plant viral pathogens. *Current Science* 86 (12): 1604-1607.
- Yeung S. S. W., Lee T. M. H., Hsing I. (2008): Electrochemistry-based real-time PCR on a microchip. *Analytical Chemistry* 80 (2): 363-368.
- Žemla J., Čiampor F., Labuda M. (1998): Špeciálna virológia (str. 166-168). SAV Bratislava.