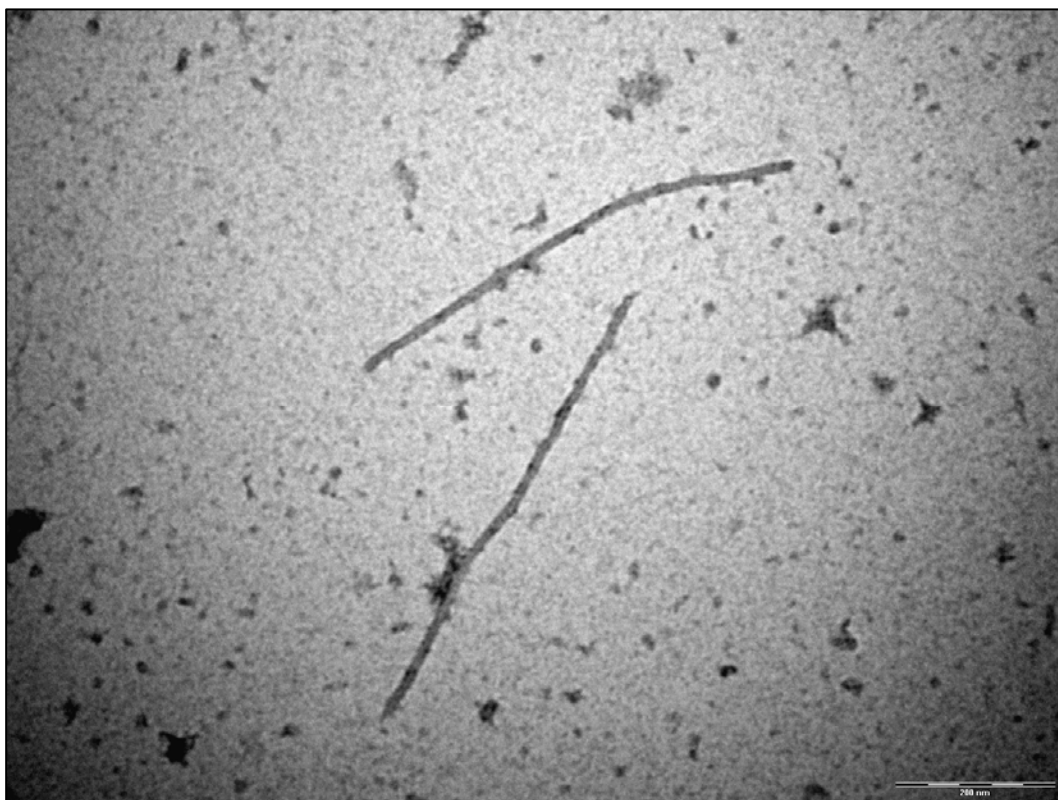




Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta
Katedra genetiky

Identifikace a sekvenování genomu nového viru infikujícího vojtěšku



Magisterská práce

Bc. Martina Bečková

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

Biologické centrum Akademie věd České republiky, v.v.i. ÚMBR
České Budějovice 2010

Bečková, M. (2010). Identifikace a sekvenování genomu nového viru infikujícího vojtěšku [Identification and sequencing genom of a new virus infecting lucerne], pp. 41.

Anotace:

Samples of lucerne plants characteristic with local necrotic lesions, leave malformation and yellow spots on leaves were investigated with transmission electron microscopy. Virus particles observed there were filamentous ones of 600 to 700 nm long. Nucleic acid was isolated, transcribed and amplified using PCR. Genus-specific primers were designed based on reverse genetics from the highly conserved genes for carlaviruses, potexviruses and potyviruses. Successful amplification with carlavirus-specific primers, sequencing and comparison with sequences in GenBank database revealed presence of a carlavirus. This was later identified by nucleotide sequence comparison as a new isolate V4 of *Alfalfa latent virus*. Specific primers for isolate V4 were designed in a coat protein position. Half of the genom of this virus was obtained with PCR and PCR modified amplifications and compared with sequences of Alfalfa latent virus and Pea streak virus from GenBank.

Tato práce byla financována z projektů MZe NAZV: QH71145 „Diagnostika virů a fytoplazem ve šlechtitelském materiálu jetele lučního“.

Prohlašuji, že jsem tuto práci 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 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.

V Českých Budějovicích 28. dubna 2010

.....
Martina Bečková

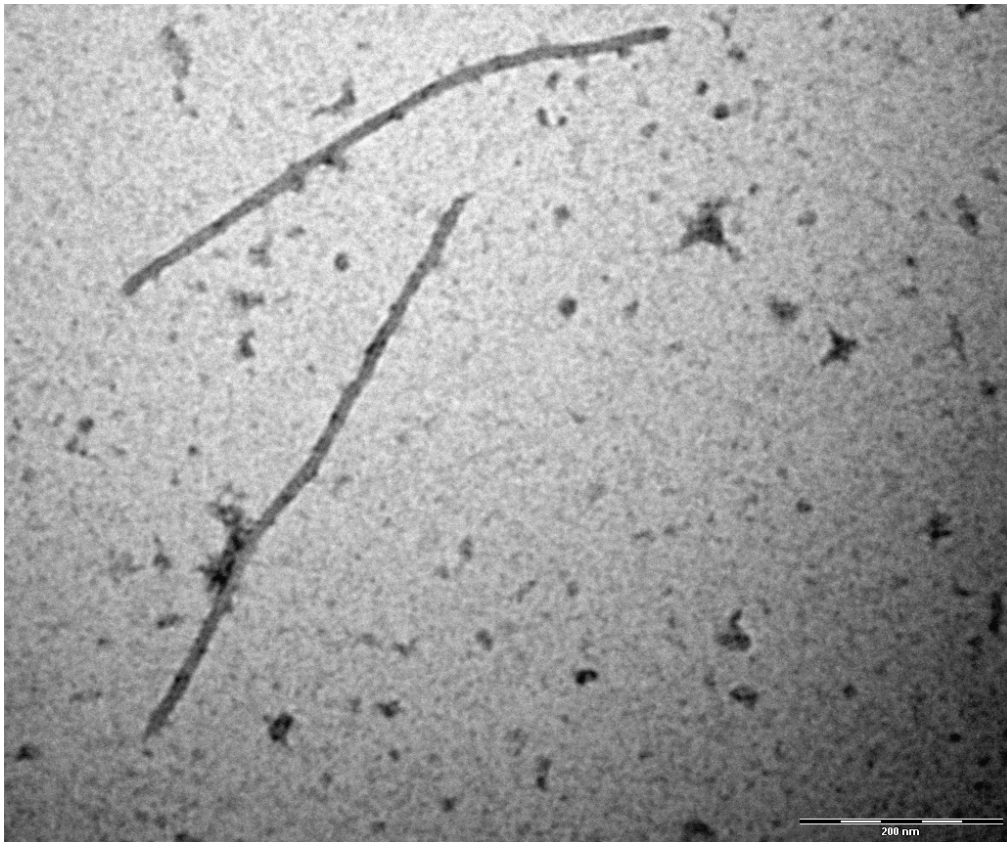
Obsah

CÍL PRÁCE	4
ÚVOD	5
Taxonomie	6
Postup používaný pro identifikaci virů	6
Charakteristika rodu Potyvirus	9
Charakteristika čeledi Flexiviridae	10
Charakteristika rodu Carlavirus	10
Charakteristika rodu Potexvirus	12
MATERIÁLY A METODY	14
Rostlinný materiál	14
Purifikace viru	14
Izolace virových nukleových kyselin	14
<i>RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Německo)</i>	14
<i>NucleoSpin[®] RNA II (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co KG, Německo)</i>	15
Molekulární metody použité pro amplifikaci NK	15
<i>Reverzní transkripce</i>	15
<i>PCR (Polymerase Chain Reaction)</i>	16
<i>SISPA - Sequence Independent Single Primer Amplification (Allander a kol., 2001)</i>	19
<i>DOP-PCR - Degenerative Oligonucleotide Primer Polymerase Chain Reaction (Nanda a kol., 2008)</i> ...	20
<i>Klonování</i>	20
Extrakce PCR produktu z PCR reakce nebo agarózového gelu	21
Sekvenování	22
Fylogenetické analýzy	22
VÝSLEDKY A DISKUZE	23
Mechanická inokulace	25
PCR amplifikace a sekvenování	27
Charakteristika carlaviru Alfalfa latent virus	30
Aminokyselinové sekvence	32

Fylogenetická analýza	35
ZÁVĚR	37
ZKRATKY	38
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	39
Webové reference	40

Cíl práce

Předběžné zkoumání transmisní elektronovou mikroskopií (TEM) vzorku vojtěšky seté (*Medicago sativa*), pocházející ze Šlechtitelské stanice Želešice (AGROGEN, spol. s.r.o.), odhalilo vláknité částice o délce 600 - 700 nm (obr. 1; Fránová a kol., 2009). Rostlina vojtěšky vykazovala symptomy infekce, jako jsou deformace listů s výskytem malých žlutavých skvrn a světlání žilek (obr. 2). Cílem této práce byla identifikace nalezeného vláknitého viru molekulárními metodami a sekvenace jeho genomu.



Obr. 1: Snímek vláknitých částic o velikosti 600 – 700 nm z transmisní elektronové mikroskopie, negativní kontrast [1:200 nm] (foto: Fránová).

Úvod

Taxonomický rod vojtěšky (*Medicago*) zahrnuje přibližně 100 druhů. V českých podmínkách se nejčastěji vyskytují tři druhy vojtěšky, kterými jsou vojtěška setá (*Medicago sativa*), vojtěška zvrhlá (*Medicago varia* Mart.) a vojtěška srpovitá (*Medicago falcata* L.) (Klesnil a kol., 1978). V České republice je pro pěstování registrováno 17 odrůd vojtěšky, které jsou typu *sativa* s minimálním podílem *M. falcata* v genotypu (Seznam registrovaných odrůd, 2009). Tato zemědělská plodina je pěstována hlavně pro vysokou produkci kvalitní píce a pro vysoký obsah bílkovin, karotenu, vitamínu C a E. Její hluboký kořenový systém umožňuje čerpat živiny i ze spodních vrstev půdy, a proto dobře odolává suchu i mrazu. Tyto vlastnosti umožňují vojtěšce přežívat i v takových oblastech, jako jsou asijské stepi, odkud se vojtěška původně rozšířila. V České republice se pěstuje hlavně v kukuřičné a řepařské výrobní oblasti nebo lepší bramborářské oblasti.

Pro hospodářskou významnost této rostliny je velmi důležitá dobrá ochrana proti škůdcům, kteří mohou snižovat výnos a kvalitu píce. Semena i rostlina vojtěšky mohou být napadeny celou řadou hub, jako jsou rody *Pythium* (*Pythium* sp.), *leptosferulina* (*Leptosphaerulina* sp.), *Phoma* (např. *Phoma medicaginis*), rez (*Uromyces*), pakustřebka (*Pseudopeziza*), stemfylium (např. *Stemphylium vesicarium*), skvrnatička (např. *Cercospora medicaginis*), vřetenatka (např. *Peronospora trifoliorum*), *Leptotrochila* (např. *Leptotrochila medicaginis*) a další (National Lucerne Organization, 2008).

Vojtěšku napadá také celá řada hmyzích škůdců, mezi kterými najdeme fytozugi ploštice, jako je klopuška světlá (*Adelphocoris lineolatus*), klopuška chlupatá (*Lygus rugulipennis*), klopuška černá (*Adelphocoris seticornis*), dále již méně parazitující plodomorka vojtěšková (*Contarinia medicaginis*), bejlomorka vojtěšková (*Dasineura ignorata*), tmavka vojtěšková (*Bruchophagus roddi*), třásněnka vojtěšková (*Odontothrips confusus*) a další (Petřík a kol., 1987). Boj proti hmyzím škůdcům je možný vhodnými insekticidy. Hmyz s sebou však přináší nebezpečí přenosu virových chorob, zvláště u fytozugi druhů, které se živí sáním rostlinných šťáv. Virový patogen hmyzího jedince využívá jako vektora a v rostlině se potom replikuje s využitím hostitelského translačního aparátu, jako Alfalfa mosaic virus, který je v rostlině vojtěšky poměrně častý. Virové infekce se mohou v rostlině projevit celou řadou



Obr. 2: Listy vojtěšky seté (*Medicago sativa*) s příznaky infekce (foto: Fránová).

symptomů, jejichž následkem může dojít až k úhynu rostliny. Pouhé symptomy projevující se na rostlině však, s množstvím výše zmíněných patogenů, k identifikaci virové infekce stačit nemohou. Proto je nezbytná detekce a studium rostlinných virů na molekulární úrovni.

Taxonomie

Klasifikace virů je založena na typu nukleové kyseliny (RNA, DNA) a zda se jedná o jedno- nebo dvouvláknovou nukleovou kyselinu. Dále rozhoduje počet částic genomu, uspořádání otevřených čtecích rámců, jejich způsob exprese a podobnost aminokyselinových sekvencí. Rozhodujícím faktorem je i přítomnost nebo absence bílkovinného obalu a častějšího proteinového kapsidu, který přímo interaguje s nukleovou kyselinou a dává tak tvar virové částici. V důsledku neustálých nálezů nových virů a izolátů je taxonomie stále upřesňována a měněna. Databáze virů a jejich taxonomie jsou dostupné na internetu (ICTVdB, 2002).

Postup používaný pro identifikaci virů

Identifikaci viru provádíme na základě biologické charakteristiky viru a molekulárních metod. Biologickou charakteristikou jsou symptomy, kterými se virová infekce projevuje na hostitelské rostlině, velikost a tvar virové partikule, které jsou zjistitelné transmisní elektronovou mikroskopií, ale také druh a škála hostitelských rostlin, které jsou na virovou infekci citlivé. Identifikace na základě molekulárních metod se provádí polymerázovou řetězovou reakcí s použitím rodově specifických primerů. Ty jsou navrhovány pro vysoce konzervované oblasti sekvencí genů v rámci celého rodu (reverzní genetika).

Podle symptomů virové infekce projevující se na rostlině můžeme identifikovat virus jen v případě, že se jedná o velmi charakteristické příznaky, které jsou nezaměnitelné s jiným virovým nebo nevirovým činitelem. Některé virové příznaky mohou být simulovány například různými chemickými látkami, nedostatky nebo naopak nadbytky důležitých makro a mikro prvků v půdě, jinými parazitujícími organismy apod. Pro potvrzení virové infekce na rostlině je tedy obvykle prvním krokem použití transmisní elektronové mikroskopie.

Transmisní elektronová mikroskopie (TEM) slouží k detekci přítomnosti viru v rostlině, jeho struktury, velikosti a morfologie virové částice, která upřesňuje následnou molekulární a sérologickou diagnostiku. Znalost tvaru virové partikule pak může zúžit škálu zkoumaných virů. V našem případě vláknitý typ částice je typický pro některé jednovláknové RNA viry s pozitivní polaritou* (+ssRNA) čeledí *Closteroviridae*, *Flexiviridae* a *Potyviridae* (tab. 1). Rozměry částic vláknitého tvaru potom mohou pomoci identifikovat patogena díky naší znalosti rozsahu velikostí částic celé řady rodů. Dlouhé vláknité částice nejsou svým tvarem na rozdíl od izometrického a baciliformního tvaru při přípravě preparátů pro transmisní elektronovou mikroskopii tolik stabilní. Částice se mohou lámat, a proto musíme počítat s odchylkou délky pozorovaných částic od skutečné velikosti. Pro identifikaci viru se tedy nelze zaměřit pouze na skupiny (čeledě, rody) zahrnující velikosti pozorovaných částic (obr. 10).

* Pozitivní polarita znamená přímé využití virové RNA jako mRNA pro translaci v rostlinné buňce.

Identifikace a sekvenování genomu nového viru infikujícího vojtěšku.

Tab. 1: Taxonomie vláknitých jednovláknových rostlinných RNA virů s pozitivní polaritou (ICTVdB, 2002).

NK	Čeleď	Rod	Druh
ssRNA (+)	<i>Closteroviridae</i>	<i>Closterovirus</i>	Beet yellows virus
		<i>Crinivirus</i>	Lettuce infectious yellows virus
		<i>Ampelovirus</i>	Grapevine leafroll-associated virus
	<i>Flexiviridae</i>	<i>Potexvirus</i>	Potato virus X
		<i>Mandarivirus</i>	Indian citrus ringspot virus
		<i>Allexivirus</i>	Shallot virus X
		<i>Carlavirus</i>	Carnation latent virus
		<i>Foveavirus</i>	Apple stem pitting virus
		<i>Capillovirus</i>	Apple stem grooving virus
		<i>Vitivirus</i>	Grapevine virus A
		<i>Trichovirus</i>	Apple chlorotic leaf spot virus
		<i>Potyviriidae</i>	<i>Potyvirus</i>
	<i>Rymovirus</i>		Reygrass mosaic virus
	<i>Bymovirus</i>		Barley yellow mosaic virus
	<i>Macluravirus</i>		Maclura mosaic virus
	<i>Ipomovirus</i>		Sweet potato mild mottle virus
	<i>Tritimovirus</i>		Wheat streak mosaic virus

Tab. 2: Výčet virových patogenů infikujících vojtěšku (*Medicago sp.*) (Brunt a kol., 1996b).

Druhy virů zaznamenané na rostlině vojtěšky (<i>Medicago sp.</i>)	
Alfalfa 1 alphacryptovirus	Lucerne enation ^(?) nucleorhabdovirus
Alfalfa 2 ^(?) betacryptovirus	Lucerne transient streak sobemovirus
Alfalfa latent carlavirus	Milk vetch dwarf nanavirus
Alfalfa mosaic alfamovirus	Muskmelon vein necrosis carlavirus
Bean leaf roll luteovirus	Narcissus mosaic potexvirus
Bean yellow mosaic potyvirus	Pea enation mosaic enamovirus
Beet curly top hybrigeminivirus	Pea mild mosaic comovirus
Beet western yellows hybrigeminivirus	Pea seed-borne mosaic potyvirus
Broad bean mottle bromovirus	Pea streak carlavirus
Carnation mottle carmovirus	Peanut stunt cucumovirus
Carrot mosaic potyvirus	Red clover mottle comovirus
Cassia mild mosaic ^(?) carlavirus	Red clover necrotic mosaic dianthovirus
Chickpea distortion mosaic potyvirus	Red clover vein mosaic carlavirus
Clover yellow mosaic potexvirus	Soybean dwarf luteovirus
Clover yellow vein potyvirus	Subterranean clover red leaf luteovirus
Cucumber mosaic cucumovirus	Subterranean clover stunt nanavirus
Faba bean necrotic yellows nanavirus	Tobacco ringspot nepovirus
Hop trefoil 1 alphacryptovirus	Tobacco streak ilarvirus
Hop trefoil 2 betacryptovirus	Tobacco yellow dwarf monogeminivirus
Hop trefoil 3 alphacryptovirus	Watermelon mosaic 2 potyvirus
Lucerne Australian latent nepovirus	White clover mosaic potexvirus
Lucerne Australian symptomless nepovirus	

^(?) Virus není přesně zařazen.

Identifikace a sekvenování genomu nového viru infikujícího vojtěšku.

Dalším pomocným identifikačním faktorem je již zmíněná hostitelská rostlina. Je známa řada rostlinných virů, které infikují širokou škálu rostlinných druhů, ale také řada těch, o kterých zatím víme, že infikují jen určitý druh rostliny. Na internetu byly vytvořeny databáze, ve kterých je pro jednotlivé rostliny zaznamenán výčet virových patogenů na které jsou citlivé a jejichž přítomnost byla v rostlině potvrzena. V případě vojtěšky (*Medicago* sp.) je popsáno 43 virových patogenů (tab. 2; Brunt a kol., 1996). K charakteristice viru tedy patří i výčet rostlin které jsou na virus citlivé a které ne.

Pokud se dále zaměříme pouze na zástupce vláknitého tvaru infikující vojtěšku, můžeme výrazně urychlit identifikaci patogena, jedná-li se o známý, na vojtěšce již dříve nalezený virus (tab. 3). Vlákňité viry byly nalezeny pouze na třech druzích vojtěšky, kterými jsou *Medicago alba* (syn. komonice bílá, *Melilotus albus*), *Medicago hispida* (syn. tollice mnohotvará, *Medicago polymorpha* L.) a *Medicago sativa* (vojtěška setá). Výčet těchto vláknitých virů zahrnuje pouze viry rodů *Potexvirus*, *Carlavirus* a *Potyvirus*. Vzhledem k délce námi pozorovaných částic, pak virové částice nejvíce odpovídají jen rodům *Carlavirus* a *Potyvirus*. Jak ale bylo zmíněno výše, rod *Potexvirus* nemůžeme úplně vyloučit za předpokladu, že se částice při přípravě preparátů lámou, a nebo že se jedná o dosud nepopsaný virus.

Tab. 3: Vlákňité viry nalezené na třech druzích vojtěšky. (ICTVdB*; Plant Viruses Online** (Brunt a kol., 1996b).

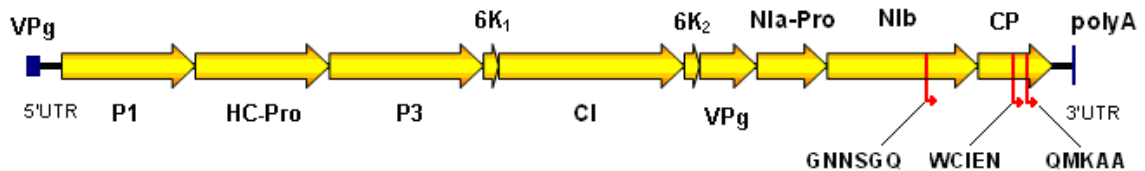
Hostitel	Virus	Délka částice [nm]
<i>Medicago alba</i>	Clover yellow mosaic potexvirus	540
	Muskmelon vein necrosis carlavirus	674*
<i>Medicago hispida</i>	Muskmelon vein necrosis carlavirus	674*
	Watermelon mosaic 2 potyvirus	750 - 780
<i>Medicago sativa</i>	Alfalfa latent carlavirus	635 (653)
	Bean yellow mosaic potyvirus	750
	Carrot mosaic (?) potyvirus	740**
	Cassia mild mosaic (?) carlavirus	640*
	Chickpea distortion mosaic potyvirus	750*
	Clover yellow mosaic potexvirus	540
	Clover yellow vein potyvirus	767 (590 - 700)
	Narcissus mosaic potexvirus	550
	Pea seed-borne mosaic potyvirus	770
	Pea streak carlavirus	619 (630)
	Red clover vein mosaic carlavirus	600 - 700
	Watermelon mosaic 2 potyvirus	750 - 780
	White clover mosaic potexvirus	480

Tímto postupem založeném na biologických vlastnostech viru můžeme předpokládat, že námi nalezený vláknitý virus by mohl, ale nemusí, být jeden z uvedených vláknitých virů již nalezených na vojtěšce a nebo se může jednat o dosud nepopsaný virus, což je prokazatelné pouze vhodnými sérologickými (např. ELISA) nebo molekulárními metodami.

Charakteristika rodu *Potyvirus*

Rod *Potyvirus* patří do čeledi *Potyviridae*. Genom zástupců této čeledi je jednovláknová ribonukleová kyselina s pozitivní polaritou (+ssRNA), která má pouze jeden otevřený čtecí rámeček, jenž je po přeložení do polyproteinu posttranslačně štěpen virovými proteázami.

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



Obr. 3: Uspořádání genomu rodu *Potyvirus* (čeleď *Potyviridae*) s aminokyselinovými motivy WCIEI a QMKAA.

Potyviróvá +ssRNA je obalena proteinovým kapsidem, který je formován v helikální symetrii. Vytváří částice vláknitého tvaru o délce 680 až 900 nanometrů a šířce 11 až 13 nanometrů (ICTVdb, 00.057.0.01. Potyvirus).

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

Zástupci tohoto rodu mohou způsobovat celou řadu symptomů infekce na listech, květech, plodech i semenech. Příkladem jsou nekrózy žilnatiny (PVY^N), změna barvy květů (TuMV), skvrnitost a deformace plodů (WMV2) a řada dalších (Shukla, 1994b).

Rodově specifické primery pro rod *Potyvirus* byly navrženy porovnáním potyviróvých aminokyselinových sekvencí kódujících RNA polymerázu (NIb) a kapsidový protein (CP). V oblasti RNAP (NIb) byl nalezen motiv GNNSGQPSTVVDN (Gibbs a kol., 2003) a v oblasti kapsidového proteinu (CP) byly nalezeny konzervované aminokyselinové motivy

VWCIENGTSPT a QMKAA. V těchto konzervovaných oblastech pak byly podle nukleotidových sekvencí navrženy degenerované primery motivu GNNSGQ 5'-GGBAAYAAYAGYGGDCARCC-3' (Gibbs a kol., 1977), který byl použit v upravené formě 5'-GGNAAYAAYAGYGGNCARCC-3' (464J0), a WCIEN 5'-TGAGGATCCTTGTGYATHGARAAYGG-3' (321E6). V PCR reakci byl s těmito primery použit v opačném směru poly(dT) primer (347H3).

Charakteristika čeledi Flexiviridae

Rody *Carlavirus* a *Potexvirus* patří do čeledi *Flexiviridae*. Tato čeleď byla odvozena z fylogenetické analýzy nukleotidových a aminokyselinových sekvencí RNA polymerázy (RNAP) a kapsidového proteinu (CP), a proto jsou rodově specifické primery navrhovány v těchto oblastech. Genom zástupců této čeledi (tab. 4) je tvořen +ssRNA obsahující 5 nebo 6 otevřených čtecích rámců. Na 3' konci je většinou poly A konec, ale některé genomy mají na konci šestý otevřený čtecí rámec (ORF6), který pravděpodobně slouží jako vazebné místo (nucleotide-binding site) a v jehož přítomnosti může polyA konec chybět. První otevřený čtecí rámec (ORF1) kóduje kromě RNA dependentní RNA polymerázy (RdRp) také helikázu, někdy methyl transferázu a proteázu. Další ORF kódují jeden nebo více proteinů, které zprostředkovávají pohyb mezi buňkami (MP-movement protein) a jeden nebo dva strukturální proteiny (CP, tab. 4). Některé čtecí rámce jsou translatovány ze subgenomové mRNA (Adams a kol., 2004).

Tab. 4: Charakteristika rodů čeledi *Flexiviridae* (Adams a kol., 2004).

Rod	Délka virionu [nm]	Počet ORF	MP	CP (kDa)
<i>Potexvirus</i>	470-580	5	TGB	22-27
<i>Mandarivirus</i>	650	6	TGB	34
<i>Allexivirus</i>	cca 800	6	TGB	26-29
<i>Carlavirus</i>	610-700	6	TGB	32-34
<i>Foveavirus</i>	800	5	TGB	28-44
<i>Capillovirus</i>	640-700	2 nebo 3	30K	25-27
<i>Vitivirus</i>	725-785	5	30K	18-22
<i>Trichovirus</i>	640-760	3 nebo 4	30K	21-24

Charakteristika rodu *Carlavirus*

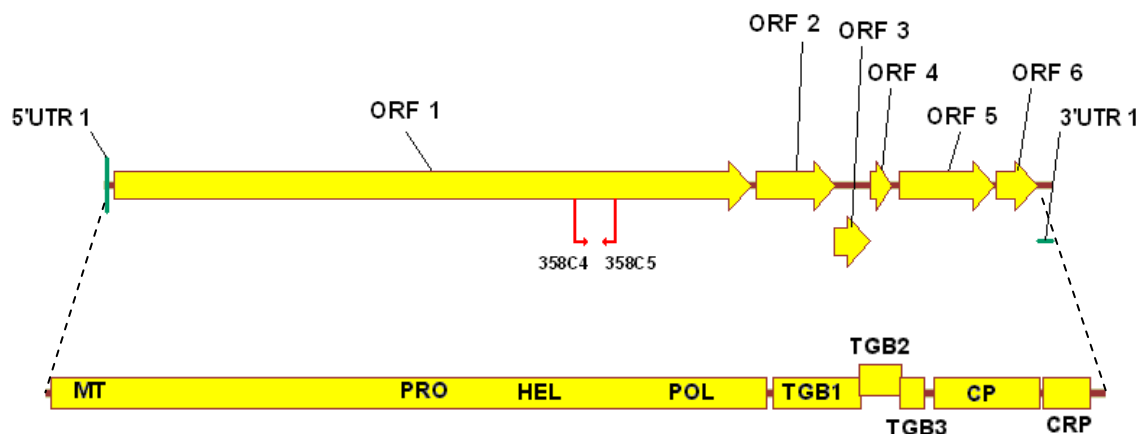
Virion carlavirů je tvořen +ssRNA a proteinovým kapsidem. Nukleokapsid má helikální symetrii a vzniklá vláknitá částice dosahuje délky (500-) 610 až 700 (-720) nanometrů a šířky 12 až 15 nanometrů. Některé viriony mohou obsahovat subgenomovou RNA, která je pravděpodobně zabalena do kratších partikulí.

+ssRNA genom carlavirů (obr. 4), který je 6000 – 8500 nukleotidů dlouhý, má někdy na 5' konci methylovanou čepičku a na 3' konci většinou polyA sekvenci. První čtecí rámec kóduje methyl transferázu (MT), proteázu (PRO), helikázu (HEL) a RNA dependentní RNA polymerázu (na obrázku POL). Následující tři čtecí rámce kódují tzv. „triple gen block“ (TGB) proteiny, které zprostředkovávají pohyb mezi buňkami. Pátý otevřený čtecí rámec kóduje jeden nebo dva

strukturní proteiny (CP, kapsidový protein), na něž někdy navazuje šestý čtecí rámec někdy označovaný jako „cysteine-rich protein“ (CRP) nebo jako vazebné místo „nucleotide-binding site“ (Lukhovitskaya a kol., 2005).

Symptomů, kterými se carlaviry projevují na listech nebo květenstvích, je celá řada. Projevem infekce může být zakrslost celé rostliny, deformace listů, chlorózy, nekrózy šlahounů, mozaiky nebo chlorózy žilek na listech apod. Symptomy mohou přetrvávat nebo měnit během několika týdnů, v průběhu roku, sezónně, nebo zmizí krátce po infekci. Infekce však může být také bezpříznaková.

Carlaviry jsou přenosné roubováním, vektory, mechanickou inokulací, semeny i pylem. Nejsou však přenosné kontaktem mezi rostlinami. Přenos vektory (členovci *Arthropoda*; hmyz řádu *Hemiptera*, čeledi *Aleyrodidae*, *Aphididae*) je semi- nebo neperzistentní. Viriony se vyskytují v cytoplazmě, chloroplastu, mitochondrii a vytvářejí cytoplazmatické inkluze. Infikují celou řadu jednoděložných i dvouděložných rostlinných druhů a jsou celosvětově rozšířeny (ICTVdB, 00.056.0.04. Carlavirus).



Obr. 4: Obecný popis genomu carlaviru s šesti otevřenými čtecími rámci. Červenými šipkami vyznačena pozice rodově specifických primerů (358C4, 358C5) amplifikující část úseku, který kóduje RdRp.

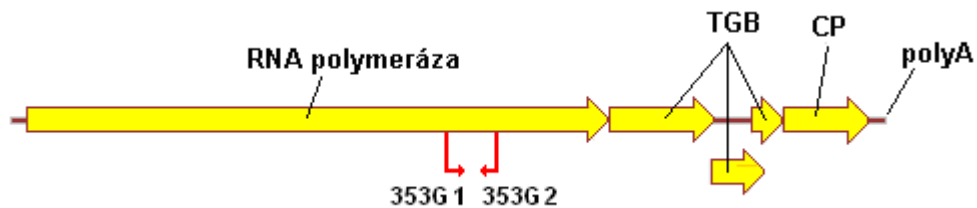
Následující pasáž částí stran 11 – 12 obsahuje utajované skutečnosti a je obsažena pouze v archivovaném originále diplomové práce uloženém na Přírodovědecké fakultě JU.

Charakteristika rodu *Potexvirus*

+ssRNA genom potexviru obsahuje 5 otevřených čtecích rámců. Na 5' konci je methylovaná čepička a 3' konec je polyadenylován. Otevřené čtecí rámce kódují RNA dependentní RNA polymerázu, TGB („triple gen block”) kódující proteiny zprostředkovávající pohyb mezi buňkami a kapsidový protein (CP, obr. 6). Virové částice dosahují délky 470 až 570 nm a mohou být nalezeny v cytoplazmě, jádru nebo buněčné vakuole. V infikovaných buňkách se mohou vytvářet jaderné nebo cytoplazmatické inkluze.

Infekce rostliny způsobená virem tohoto rodu může, ale také nemusí, být na rostlině viditelná. Symptomy způsobené infekcí mohou přetrvávat nebo se lišit podle sezóny.

Potexviry mohou být přenosné roubováním, vektory, mechanickou inokulací, semeny (ne pylem) a kontaktem mezi rostlinami. Přenos vektory, kterými mohou být členovci, hmyz, pavouci i roztoči je neperzistentní. Některé druhy však k přenosu vektorem potřebují tzv. „helper virus“, pomocný virus (ICTVdB, 00.056.0.01. Potexvirus).



Obr. 6: Obecný popis genomu potexviru s rodově specifickými primery 353G1 a 353G2.

Identifikace a sekvenování genomu nového viru infikujícího vojtěšku.

Následující pasáž strany 13 obsahuje utajované skutečnosti a je obsažena pouze v archivovaném originále diplomové práce uloženém na Přírodovědecké fakultě JU.

Materiály a metody

Rostlinný materiál

Vzorek vojtěšky seté (*Medicago sativa*, obr. 1) pocházející ze šlechtitelské stanice Želešice (AGROGEN, spol. s.r.o.), infikovaný neznámým vláknitým virem, a dále označovaný jako vzorek V4, byl použit jako inokulum pro mechanickou inokulaci na laboratorní rostlinu tabáku (*Nicotiana occidentalis* 37B, obr. 8), fazol obecný (*Phaseolus vulgaris*) a hrách setý (*Pisum sativum*).



Obr. 8: List tabáku *Nicotiana occidentalis* 37B 18 dní po mechanické inokulaci (foto: Fránová).

Purifikace viru

Pro purifikaci bylo použito 100 g listového pletiva inokulovaného tabáku, které bylo homogenizováno v 0.1 M fosfátovém pufru. Homogenát byl přefiltrován a s přidáním butanolu a chloroformu byly vysráženy proteiny. Po centrifugaci byly z odebraného supernatantu vysráženy nukleové kyseliny pomocí PEG 6000 a NaCl. Purifikát byl získán rozpuštěním sedimentu v H₂O.

Izolace virových nukleových kyselin

Izolace RNA byla provedena použitím kitů „RNeasy Plant Mini Kit“ (QIAGEN, Německo) a „Nucleospin® RNA II“ (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co KG, Německo) podle návodu. Pro izolaci z purifikátu bylo použito 50 µl purifikátu a vynechán 2. krok pro použití kolony s membránou na odstranění buněčného materiálu.

RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Německo)

- 100 mg listového pletiva bylo homogenizováno ve 450 µl pufru RLT obsahujícího guanidin isothiokyanatan.
- Homogenát byl centrifugován při 15 000 x g po 2 minuty přes kolonu pro odstranění buněčného materiálu. Při větší hustotě materiálu byl homogenát na krátkou dobu centrifugován ve zkumavce a teprve poté centrifugován přes kolonu.
- K 450 µl supernatantu byla přidána polovina objemu 96% etanolu, a dále promíchán a centrifugováno při 8 000 x g po 15 sekund přes kolonu zachycující RNA.
- Kontaminující látky byly z membrány odstraněny promývacími pufrými (RW1, RPE obsahujícími etanol) a centrifugovány vždy při 8 000 x g.

Identifikace a sekvenování genomu nového viru infikujícího vojtěšku.

- Následně byla RNA extrahována z membrány 30 μl H_2O centrifugací při 15 000 x g po 1 minutu.
- Všechny centrifugace byly prováděny při 20 – 25°C.

NucleoSpin[®] RNA II (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co KG, Německo)

- 30 mg listového pletiva bylo homogenizováno s přidáním 350 μl pufru RA1 pro lýzi buněk.
- Homogenát byl centrifugován přes kolonu s filtrem (NucleoSpin[®] Filter) při 11 000 x g po 1 minutu pro odstranění buněčného materiálu.
- Supernatant byl odebrán do nové sterilní zkumavky s přidáním 350 μl 70% etanolu, protřepáno a takto připravený lyzát byl centrifugován při 11 000 x g po 30 sekund přes kolonu zachycující RNA.
- Na membránu bylo přidáno 350 μl MDB (Membrane Desalting Buffer) a centrifugováno při 11 000 x g po 1 minutu pro zefektivnění následného štěpení rDNasou, která byla připravena podle návodu a na membráně inkubována 15 minut při pokojové teplotě.
- Kontaminující látky byly odstraněny promýváním ve třech krocích pomocí pufrů RA2 a RA3.
- RNA byla extrahována z membrány 50 μl H_2O s následnou centrifugací při 11 000 x g po 1 minutu.

Molekulární metody použité pro amplifikaci NK

Získaná RNA byla reverzní transkripcí přepsána do cDNA, která byla použita pro amplifikaci NK metodou PCR nebo modifikovanými PCR metodami pro amplifikace neznámých sekvencí pomocí jednoho primeru: SISPA (Sequence Independent Single Primer Amplification; Allander a kol., 2001) a DOP-PCR (Degenerative Oligonucleotide Primer Polymerase Chain Reaction; Nanda a kol., 2008) se speciálně degenerovaným primerem.

Reverzní transkripce

RevertAid[™] H Minus M-MuLV RT (Fermentas, Litva)

pufr 5x	2 μl
M-MuLV H ⁻ RT [200 U/ μl]	0.5 μl
dNTP [10 mM]	1 μl
primer [20 pmol/ μl]	0.5 μl
RNA	4 μl
<u>H_2O</u>	<u>2 μl</u>
Celkem	10 μl

Program reakce: při použití náhodných hexanukleotidů: 25°C/10' + 45°C/60' + 70°C/10'.

při použití specifického primeru: reakce bez M-MuLV H⁻ → zahřátí na Ta primeru → 45°C/60' + 70°C/10'.

iScript™ cDNA Synthesis Kit (BIO-RAD)

iScript reakční mix 5x	2 µl (oligo(dT) primery)
iScript reverzní transkriptáza	0.5 µl
RNA templát	3 µl
H ₂ O	4.5 µl
<hr/>	
Celkem	10 µl

Program reakce: 25°C/5' + 42°C/30' + 85°C/5'.

PCR (Polymerase Chain Reaction)

Pro amplifikace krátkých produktů do 1500 pb byl použit „PPP Mater mix“ (Top-Bio s.r.o., Česká republika) nebo „PCR Master Mix“ (Fermentas, Litva). Amplifikace delších a některých problematických fragmentů byla provedena polymerázou „DreamTaq™ DNA Polymerase“ (Fermentas, Litva) a „LA DNA Polymerases Mix“ (Top-Bio s.r.o., Česká republika).

PPP Mater Mix (Taq-Purple DNA Polymerase PCR Master Mix, Top-Bio s.r.o., Česká rep.)

Složení:

150 mM Tris-HCl, pH 8.8, 40 mM (NH₄)₂SO₄, 0.02% Tween 20, 5 mM MgCl₂, 400 µM dATP, 400 µM dCTP, 400 µM dGTP, 400 µM dTTP, 100 U/ml Taq-Purple DNA polymerázy, stabilizátory a aditiva.

Reakce:

PPP Master Mix 2x	10 µl
primery [20 pmol/µl]	0.5 + 0.5 µl (tab. 5)
cDNA	2 µl
H ₂ O	7 µl
<hr/>	
Celkem	20 µl

Program reakce: 94°C/2' + 25-30 x (94°C/30'' + Ta/x'' + 72°C/x') + 72°C/10'.

PCR Master Mix (Fermentas, Litva)

Složení:

0.05 U/µl Taq DNA polymerázy, reakční pufr, 4 mM MgCl₂, 0.4 mM dATP, 0.4 mM dCTP, 0.4 mM dGTP, 0.4 mM dTTP.

Reakce:

PCR Master Mix 2x	10 µl
Primery [20 pmol/µl]	0.5 + 0.5 µl
cDNA	2 µl
H ₂ O	7 µl
<hr/>	
Celkem	20 µl

Program reakce: 94°C/2' + 25-30 x (94°C/30'' + Ta/x'' + 68°C/x') + 68°C/10'.

DNA polymerázy

DreamTag™ DNA Polymerase (Fermentas, Litva)

Reakce:

Pufr 10x	2 µl
DreamTag [5U/1µl]	0.5 µl
Primery [20 pmol/µl]	0.5 + 0.5 µl
dNTP [10 mM]	1 µl
cDNA	2 µl
H ₂ O	13.5 µl
<hr/>	
Celkem	20 µl

Reakce: 94°C/2' + 25-30 x (94°C/30'' + Ta/x'' + 72°C/x') + 72°C/10'.

LA DNA Polymerases Mix (Top-Bio s.r.o., Česká republika)

Složení:

10 x LA PCR pufr: 500 mM Tris-HCl, pH 9.3 (25°C), 150 mM (NH₄)₂SO₄, 2.25 mM MgCl₂, 1% Tween 20.

Reakce:

LA PCR pufr 10x	2 µl
LA DNA polymeráza [5U/1µl]	0.5 µl
primery [20 pmol/µl]	0.5 + 0.5 µl
cDNA [10 mM]	2 µl
dNTP	1 µl
H ₂ O	3.5 µl
<hr/>	
Celkem	20 µl

Reakce: 94°C/2' + 25-30 x (94°C/30'' + Ta/x'' + 72°C/x') + 72°C/10'.

Primery

PCR amplifikační primery:

[(f) - „forward“; (re) - „reverse“; (x - x pb) - poloha v sekvenci izolátu V4]

DOP 5'-CCG ACT CGA GIN NNN NNT GTG G-3' (Nanda a kol., 2008)

Následující pasáž částí stran 17 – 18 obsahuje utajované skutečnosti a je obsažena pouze v archivovaném originále diplomové práce uloženém na Přírodovědecké fakultě JU.

Detekční primery:

464J0(f) 5'-GGN AAY AAY AGY GGN CAR CC-3' (Gibbs a kol., 1997)

Následující pasáž části strany 18 obsahuje utajované skutečnosti a je obsažena pouze v archivovaném originále diplomové práce uloženém na Přírodovědecké fakultě JU.

Sekvenační primery:

M13f 5'-GTA AAA CGA CGG CCA G-3' (Invitrogen)

M13re 5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3' (Invitrogen)

pJET1.2f 5'-CGA CTCACT ATA GGG AGA GCG GCC-3' (Fermentas, Litva)

pJET1.2re 5'-AAG AAC ATC GAT TTT CCA TGG CAG-3' (Fermentas, Litva)

Adaptor pro SISPA metodu:

NBam24 5'-AGG CAA CTG TGC TAT CCG AGG GAG-3'

NCsp11 5'-TAC TCC CTC GG-3'

Tab. 5: Kombinace primerů v reakci 94°C/2' + 25-30 x (94°C/30" + Ta/x" + 68°C/x') + 72°C/10'.

Kombinace primerů	Annealing (Ta) [°C/s]	Syntéza [°C/minuty]
347R3 + 321E6	50/30	72/1
353G1 + 353G2	50/30	72/1
358C4 + 358C5	50/30	72/1
415H1 + 416R7	45/30	72/1
422E3 + 422E4	45/30	72/1.5
424M5 + 150N1(dt)	48/30	72/1.5
428M9 + 430K0	50/30	72/1
CPf + CPre	58/30	72/1
pJET1.2f + pJET1.2re	50/30	72/1 – x
M13f + M13re	50/30	72/1 – x

Agarózový gel

Pro kontrolu amplifikovaného produktu byla použita agarózová gelová elektroforéza (1% nebo 1.5% agaróza v 0.5 x TBE pufri, pH = 8.3; barveno: Sybr® green).

SISPA - Sequence Independent Single Primer Amplification (Allander a kol., 2001)

- 100 mg rostlinného pletiva (nebo 50 μ l purifikátu) bylo homogenizováno v 0.5 ml 0.1 M fosfátovém pufru. Poté byl homogenát přefiltrován bakteriálním filtrem do 1.5 ml zkumavky.
- Do zkumavky bylo přidáno 100 U DNasy I a inkubováno 2 hodiny při 37°C.
- Následně byla provedena izolace RNA (RNeasy Plant Mini Kit, QIAGEN, nebo Nucleospin[®] RNA II, MACHEREY-NAGEL GmbH & Co KG), při které byl vynechán krok pro odstranění buněčných zbytků.
- Získaná RNA byla přepsána do cDNA reverzní transkripcí v objemu 10 μ l (RevertAid[™] H Minus M-MuLV RT; Fermentas, Litva).
- K reakci reverzní transkripce bylo přidáno 40 μ l reakce pro prepis cDNA do dvouvláknové formy:

- RNasa H [1U/ μ l] 2 μ l (Invitrogen, Carlsbad)
- E.coli DNA Pol. I pufr 10x 4 μ l (TaKaRa)
- dNTP [1mM] 1 μ l
- E.coli DNA polymeráza I [1U/ μ l] 1 μ l (TaKaRa)
- H₂O 32 μ l

Inkubace: 12°C/1h + 22°C/1h + 72°C/10'.

- Z 50 μ l reakce bylo 10 μ l použito pro štěpnou reakci restričním enzymem Csp6I. 20 μ l reakce byla inkubována ve vodní lázni 15 minut při 37°C (Fast Digest[™], Fermentas).
- Štěpná reakce byla následně přečištěna pomocí 70% izopropanolu a etanolu. Sediment byl po vysušení rozpuštěn v 7 μ l H₂O.
- K 7 μ l rozštěpené dsDNA byl přidán 1 μ l adaptoru (hybridizované primery NBam24 a NCsp11 viz str. 18), 1 μ l T4 DNA ligázy [6U/ μ l] (TaKaRa), 1 μ l pufru (10x) a inkubováno 1 hodinu při 4°C a 4 hodiny při 16°C.
- 1 μ l ligační reakce byl použit pro PCR (obr. 7):

- PPP mix 2x 10 μ l
- NBam24 [20 μ mol/l] 1 μ l
- ligační reakce 1 μ l
- H₂O 8 μ l
- Celkem 20 μ l

Program reakce: 40 x (94°C/1' + 72°C/3').

- PCR byla vyhodnocena na 1% agarózovém gelu. Výsledné proužky byly vyřezány z gelu, přečištěny a klonovány kitem „Clone JET[™] PCR Cloning Kit“ (viz str. 20).
- Po PCR amplifikaci klonovaných produktů byla provedena sekvenace a získaná sekvence analyzována.

DOP-PCR - Degenerative Oligonucleotide Primer Polymerase Chain Reaction (Nanda a kol., 2008)

Univerzální primer: 5'-xxxxxINNNNNNxxxxx-3' (primer pod označením 479M1).

DOP-PCR reakce:

- 10 mM KCl
- 1.5 mM MgCl₂
- 10 mM Tris pH 8.4
- 200 μM dNTP
- 2.4 μM primeru 479M1
- 2.5 U Tag polymeráza

Program reakce:

95°C/5' + 5 x [94°C/1' + 30°C/90'' + (rychlost zvyšování teploty 0.2°C/s) 72°C/3'] + 35 x [94°C/1' + (+ 14''/cyklus) + 55°C/1' + 72°C/2'] cca 6 hodin.

Klonování

Klonování bylo provedeno pomocí kitů „Clone JET™ PCR Cloning Kit“ (Fermentas, Litva) a „TA Cloning® Kit“ (Invitrogen, Carlsbad). „CloneJET™ PCR Cloning Kit“ liguje do tupých konců a je vhodnější pro kratší PCR produkty, zatímco „TA Cloning® Kit“ liguje do jednonukleotidových (adeninových) přesahů a je vhodnější pro delší PCR produkty.

CloneJET™ PCR Cloning (Fermentas, Litva)

- Konce PCR produktu byly zatupeny reakcí:
 - reakční pufr 5 μl
 - PCR produkt 2 μl
 - H₂O 1.5 μl
 - DNA blunting enzyme 0.5 μl
- Reakce byla inkubována 5 minut při 70°C a poté ochlazena na ledu.
- K této reakci byl přidán vektor a ligáza:
 - pJET/blunt Cloning Vector [50 ng/μl] 0.5 μl
 - T4 DNA Ligase [5 U/μl] 0.5 μl
- Ligace probíhala 30 minut při 22°C.
- 2.5 μl získané ligační reakce bylo přidáno do buněk (TOP10) a inkubováno 10 minut na ledu, poté inkubováno 30 sekund ve vodní lázni při teplotě 42°C a následně ochlazeno na ledu s přidáním 200 μl SOC média.
 - o Genotyp TOP10: F⁻ merA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 resA1 araD139 Δ(ara-leu)7697galUgalK rpsL (Str^R) endA1 nupG.
- Buňky byly třepány 1 hodinu při 37°C a poté byly přeneseny na plotny s AMP a inkubovány 16 hodin při 37°C.
- Jednotlivé klony byly použity jako DNA templát pro PCR amplifikaci s primery pJET1.2f a pJET1.2re.

TA Cloning[®] Kit (Invitrogen, Carlsbad)

- S PCR produktem byla připravena ligační reakce:
 - PCR produkt 3.5 µl
 - Salt solution 1 µl
 - H₂O 1 µl
 - TOPO vector 0.5 µl
- Reakce byla inkubována 5 minut při 22°C a poté ochlazena na ledu.
- 2 µl ligační reakce byly přidány do buněk TOP10F' a inkubovány na ledu 30 minut.
- Poté byly buňky inkubovány ve vodní lázni o teplotě 42°C po 30 sekund a následně ochlazeny na ledu s přidáním 350 µl SOC média.
 - Genotyp TOP10F': F' [*lacI^qTn10(Tet^R)*] *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ80*lacZ*Δ*M15* Δ*lacX74* *recA1**araD139* Δ(*ara-leu*)7697 *galU galK rpsL* (Str^R) *endA1 nupG*.
- Buňky byly třepány 1 hodinu při 37°C.
- Po třepání byly buňky přeneseny na plotny s AMP, na které byl předem aplikován IPTG a X-GAL, a inkubovány 16 hodin při 37°C.
- Vyroslé bílé kolonie byly použity pro PCR amplifikaci s primery M13f a M13re.

Extrakce PCR produktu z PCR reakce nebo agarózového gelu

Amplifikované PCR produkty byly přečištěny pomocí kitů „Gen Elute[™] PCR Clean - Up Kit“ nebo „Gen Elute[™] Gel Extraction Kit“ (Sigma, USA) podle návodu.

- Bylo použito kolony s membránou pro zachycení nukleových kyselin. Membrána byla poté promyta roztoky obsahujícími etanol a vysušena centrifugací.
- Nukleové kyseliny byly z membrány vymyty 30 µl elučního pufru.
- Pro extrakci z agarózového gelu byl nejdříve gel obsahující PCR produkt rozpuštěn v rozpouštěcím roztoku při teplotě 60°C a přidáním izopropanolu bylo zabráněno opětovnému ztuhnutí při snížení teploty. Následný postup je principem stejný s předchozím.
- Všechny centrifugace byly prováděny při 12 000 - 14 000 x g.

Sekvenování

Sekvenační reakce byla provedena kitem „Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction“ (Promega) a sekvence byly zpracovány v programech FinchTV verze 1.3.1 a MEGA version 3.1 (Kumar a kol., 2004).

Sekvenační reakce:

pufr 5x	3 µl
MIX (Sequencing PR-100)	2 µl
primer [20 µmol/l]	1 µl
PCR produkt	6 µl
H ₂ O	8 µl
<hr/>	
Celkem	20 µl

Program reakce: 30 x (96°C/10" + 50°C/5"+ 60°C/4').

Fylogenetické analýzy

Získané sekvence byly porovnávány s databází GenBank programem Blast, analyzovány s dostupnými sekvenčními daty pomocí programů BioEdit, tree view, MEGA version 3.1 (Kumar a kol., 2004) se systémem ClustalW a s jejich pomocí vygenetrovány fylogenetické vztahy.

Výsledky a diskuze

Následující pasáž o rozsahu stran 23 – 30 obsahuje utajované skutečnosti a je obsažena pouze v archivovaném originále diplomové práce uloženém na Přírodovědecké fakultě JU.

Identifikace a sekvenování genomu nového viru infikujícího vojtěšku.

Identifikace a sekvenování genomu nového viru infikujícího vojtěšku.

Identifikace a sekvenování genomu nového viru infikujícího vojtěšku.

Identifikace a sekvenování genomu nového viru infikujícího vojtěšku.

Identifikace a sekvenování genomu nového viru infikujícího vojtěšku.

Identifikace a sekvenování genomu nového viru infikujícího vojtěšku.

Charakteristika carlaviru Alfalfa latent virus

Alfalfa latent virus (ALV[†]) je RNA vláknitý virus o délce částice 635 až 653 nanometrů, který byl poprvé identifikován na vojtěšce (*Medicago sativa* cv. Dawson) v USA, kde je běžně rozšířen ve státech Nebraska a Wisconsin (Veerisetty, DPV). Odtud pochází dva hlavní izoláty Alfalfa latent virus (Nebraska) a Pea streak virus (Wisconsin), jejichž sekvence pochází z roku 2001 a její autoři poukazují na molekulární podobnost Alfalfa latent viru (AY037925) a Pea streak viru (AF354652).

Škála rostlinných hostitelů tohoto viru je poměrně úzká. Alfalfa latent virus infikuje převážně bobovité rostliny (čeleď *Fabaceae*). Ve většině případů se infekce neprojevuje žádnými symptomy, avšak je několik druhů rostlin jako bob obecný (*Vicia faba*), kde se virus na inokulovaných listech projevil několika tmavými červenohnědými nekrotickými lokálními lézemi a tmavými červenohnědými nekrózami na vrcholových listech. Vadnutí a opadávání listů s občasnými tmavě červenohnědými nekrózami stonků dokonce vedly k úhynu rostliny. Další rostlinou je hrách setý (*Pisum sativum* cv. Lincoln) s bezpříznakovou systémovou infekcí při 20 až 26°C, avšak při 13°C docházelo ke světlání žilek, chlorózám mladých listů a více než dva měsíce po inokulaci docházelo k nekrózám starých listů. V rámci těchto rostlin byl prokázán přenos vektorem kyjatky hrachové (*Acyrtosiphon pisum*), který se na rostlině živil 30 minut a po akviziční době 5 až 10 minut byl virus efektivně přenesen na hrách setý (*Pisum sativum*) a bob obecný (*Vicia faba*) bez ohledu na zdroj viru. Pokud byl zdrojem viru hrách, byl virus přenášen na vojtěšku, ale s nižší efektivitou. U hrachu nebyl prokázán přenos viru semenem (Veerisetty, 1977a).

Podle morfologie je Alfalfa latent virus (ALV) řazen mezi carlaviry, ale nevykazuje sérologickou příbuznost s Pea streak virem (PeSV) ani Red clover vein mosaic virem (RCVMV) (Veerisetty, 1977b).

Přestože se ALV a PeSV řadí mezi carlaviry, liší se od nich absencí ORF6, kódujícího CRP protein o velikosti 15kDa, který obsahuje motiv podobný zinkovému prstu. Podobnost s aminokyselinovou sekvencí buněčných NK vazebných proteinů napovídá RNA a DNA vazebnou aktivitu.

Tyto CRP jsou děleny do dvou skupin na základě strukturní a funkční podobnosti. První skupinou jsou CRP čeledí *Tubiviridae* (rod *Hordeivirus*, *Tobravirus*, *Benyvirus*, *Pecluvirus*, *Furovirus*), které mají charakteristický vysoce konzervovaný centrální motiv Cys-Gly...Cys-Gly-X-X-His. Tato skupina CRP se podílí na regulaci replikace a exprese virového genomu, moduluje systémový transport viru a funguje jako determinant patogenicity. U některých druhů je schopný posttranskripčního genového silencingu.

Druhou skupinou jsou CRP rodů *Allexivirus* a *Carlavirus* (čeleď *Flexiviridae*), které mají konzervovanou oblast Arg bohaté domény a motiv podobný zinkovému prstu. U Potato viru M

[†] Alfalfa latent virus je dále v této práci označen zkratkou ALV. Tato zkratka ale oficiálně reprezentuje Avian leukosis virus a Arracacha latent carlavirus.

vykazuje RNA i DNA vazebnou aktivitu in vitro. Role CRP této skupiny v životním cyklu viru není známa.

CRP je zřejmě determinantem virové patogenicity, tedy kontroluje interakci viru s hostitelskou rostlinou (záleží na obranném systému rostliny), což bylo prokázáno pokusem, ve kterém byl proveden úspěšný přenos CRP z CVB (*Chrysanthemum virus B*) do PVX-K12 (*Potato virus X*) a byla pozorována drastická změna produkce symptomů na tabáku *Nicotiana bentamiana*. Na inokulovaných listech se objevily nekrotické léze a nekrózy apikálních listů místo asymptomatické infekce a slabé mozaiky, která je u PVX běžná (Lukhovitskaya a kol., 2005).

Aminokyselinové sekvence

Následující pasáž o rozsahu stran 32 – 34 obsahuje utajované skutečnosti a je obsažena pouze v archivovaném originále diplomové práce uloženém na Přírodovědecké fakultě JU.

Identifikace a sekvenování genomu nového viru infikujícího vojtěšku.

Identifikace a sekvenování genomu nového viru infikujícího vojtěšku.

Fylogenetická analýza

Následující pasáž o rozsahu stran 35 - 36 obsahuje utajované skutečnosti a je obsažena pouze v archivovaném originále diplomové práce uloženém na Přírodovědecké fakultě JU.

Identifikace a sekvenování genomu nového viru infikujícího vojtěšku.

Závěr

Neznámý vláknitý virus (izolát V4), který byl transmisní elektronovou mikroskopií nalezen ve vzorku vojtěšky seté (*Medicago sativa*) pocházející ze Želešic (AGROGEN, spol. s.r.o.), byl molekulární metodou PCR identifikován jako izolát carlavirů Alfalfa latent virus a Pea streak virus. Postupnou PCR amplifikací a sekvenací byla získána sekvence poloviny genomu o délce 4046 bází. Tato sekvence byla uložena do databáze GenBank pod registračním číslem HM107774.

Sekvence V4 izolátu obsahuje mutace společné s izoláty Alfalfa latent virus (ALV) i Pea streak virus (PeSV), a zároveň nese 7 V4 specifických aminokyselinových mutací v rámci ORF5. Sekvence izolátu V4 vykazuje 80% podobnost nukleotidové sekvence pátého čtecího rámce s PeSV a ALV (79.9%), avšak podle aminokyselinové sekvence 95.6% podobnost s ALV, tedy o 1% větší podobnost než s PeSV (tab. 12). Zajímavá je také V4 podobnost mutací s izoláty ALV, PeSV a částečně s virem Red clover vein mosaic virus (RCVMV) pocházejícím z USA a která pravděpodobně souvisí s původním rozšířením této plodiny.

Podle dosavadních historických zdrojů se pěstování vojtěšky rozšířilo ze Střední Asie, zejména z nynějšího území Iránu, před 2500 lety. Vojtěšku pěstovali i Peršané a během perských válek se vojtěška rozšířila do Řecka, odtud do Římské říše (2. stol. př. n. l.), dále do Afriky a Španělska. Až od 16. století se pěstování vojtěšky šířilo do zbytku Evropy. Do Ameriky vojtěšku dovezli Španělé počátkem 16. století, a její pěstování se šířilo z Mexika do Peru, Argentiny a Kalifornie. Zajímavé je, že do Kanady a severních oblastí USA byla dovezena hybridní vojtěška německým farmářem Grimmem roku 1857 (Klesnil a kol., 1978). V Severní Americe je v dnešní době největší světová produkce vojtěšky a v USA je její pěstování nejvíce soustředováno ve státech Kalifornie, Jižní Dakota a Wisconsin.

Zdá se, že tento virus má poměrně úzkou škálu rostlinných hostitelů, a protože se na rostlině často neprojevuje žádnými symptomy a zároveň s letalitou symptomů infekce u některých hostitelů, je jeho detekce a šíření špatně sledovatelné. Tento rys může být způsoben absencí šestého čtecího rámce, který se běžně u carlavirů vyskytuje a kóduje CRP („cysteine rich protein“), který pravděpodobně ovlivňuje projev příznaků infekce na rostlině. Projev symptomů infekce je u ALV závislý také na vnějších podmínkách, což dokazuje pokus s hrachem setým (*Pisum sativum*), na kterém se při 20 až 26°C neprojevovaly žádné symptomy, ale při pěstování v teplotě 13°C docházelo ke světlání žilek, chlorózám mladých listů a více než 2 měsíce po inokulaci docházelo k nekrotám starých listů (Veerisetty, 1977a).

Pravděpodobně existuje více izolátů tohoto viru, ale jejich detekce je složitá vzhledem k tomu, že je infekce, za optimálních podmínek, asymptomatická. V současnosti se intenzivně pracuje na vytvoření protilátek V4 izolátu. To ale komplikuje nedostatek rostlinného materiálu, který je způsoben neúspěšností přenosu viru na laboratorní rostliny.

Zkratky

aa	„amino acid“, aminokyselina
ALV	„Alfalfa latent virus“
AMP	ampicilin
cDNA	„copy DNA“ = RNA přepsaná reverzní transkriptázou do DNA
CP	„coat protein“, kapsidový protein
CRP	„cysteine rich protein“
CVB	„Chrysanthemum virus B“
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxyribonukleotidtrifosfát
DOP-PCR	„Degenerative Oligonucleotide Primer Polymerase Chain Reaction“
dsRNA/DNA	„double strand“, dvouvláknová RNA/DNA
ELISA	„Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay“
IPTG	„isopropylthiogalaktosid“
MMLV H ⁻	„Murine moloney leukemia virus“
mRNA	„messenger RNA“ = RNA nesoucí přepis genu z DNA k překladu do proteinu
NK	nukleová kyselina
nt	„nucleotide“ nukleotid
ORF	„open reading frame“, otevřený čtecí rámec
pb	„bp - base pair“, česky pb – pár bází
PeSV	„Pea streak virus“
PCR	„polymerase chain reaction“, polymerázová řetězová reakce
PVX	potato virus X
PVYN	Potato virus Y
RCVMC	„Red clover vein mosaic virus“
RdRp	RNA dependentní RNA polymeráza
RNA	ribonukleová kyselina
RNAP	RNA polymeráza
RT	reverzní transkriptáza
SISPA	„Sequence independent single primer amplification“
sp.	„species“ druh
ssRNA/DNA	„single strand“, jednovláknová RNA/DNA
syn.	synonymum
Ta	teplota „annealingu“
Taq	„Thermophilus aquaticus“
TEM	transmisní elektronová mikroskopie
TGB	„triple gene block“
TuMV	Turnip mosaic potyvirus
X-GAL	„bromo-chloro-indolyl galaktóza“
WMV2	Watermelon mosaic potyvirus 2

Seznam použité literatury

- Adams, M. J., Antoniw, J. F., Bar-Joseph, M., Brunt, A. A., Candresse, T., Foster, G. D., Martelli, G. P., Milne, R. G., Zavriev, S. K. & Fauquet, C. M. (2004). The new plant virus family *Flexiviridae* and assessment of molecular criteria for species demarcation. *Arch. Virol.* 149, 1045 - 1060.
- Allander, T., Emerson, S. U., Engle, R. E., Purcell, R. H., and Bukh, J. (2001). A virus discovery method incorporating DNase treatment and its application to the identification of two bovine parvovirus species. *PNAS*, Vol. 98, No. 20, pp. 11609 - 11614.
- Bos, L. (1999). Plant viruses, unique and intriguing pathogens – a textbook of plant virology. Backhuys Publishers leiden. pp. 147 - 149.
- Fránová, J., Petrzik, K., Jakešová, H., Bečková, M., and Sarkisova, T. (2009). Cultivated and wild growing forage crops – reservoirs of viruses and phytoplasmas. 15th European Grasslands Federation Symposium, Brno 7-9.9. 2009, Vol.15, pp. 106 - 108.
- Gibbs, A., and 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.
- Gibbs, A. J., Mackenzie, A. M., and Gibbs, M. J. (2003). The 'potyvirus primers' will probably provide phylogenetically informative DNA fragments from all species of Potyviridae. *Journal of Virological Methods* 112, 41 - 44.
- Klesnil, A., Regal, V., Štráfela, J., Turek, F., Velich, J. (1978). Pícninářství – I., Vysoká škola Zemědělská v Praze, fakulta Agronomická, pp. 19.
- Kumar, S., Tamura, K., and Nei, M. (2004). *MEGA3*: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5:150 - 163.
- Lukhovitskaya, N. I., Solovyev, A. G., Koshkina, T. E., Zavriev, S. K., and Morozov, S. Yu. (2005). Interaction of the Carlavirus Cysteine-Rich Protein with the Plant Defense System. *Molecular Biology*, Vol. 39, No. 5, 2005, pp. 785-791. Translated from *Molekulyatnaya Biologiya*, Vol. 39, No. 5, 2005, pp. 896 - 904.
- Nanda, S., Jayan, G., Voulgaropoulou, F., Sierra-Honigmann, A. M., Uhlenhaut, Ch., McWatters, B. J. P., Patel, A., Krause, P. R. (2008). Universal virus detection by degenerate-oligonucleotide primed polymerase chain reaction of purified viral nucleic acids. *Journal of Virological Methods* 152:18 - 24.
- Petřík, M., Baláž, J., Fischerová, J., Flam, F., Homolka, J., Chmelík, K., Kolář, I., Mikulík, J., Punčochář, Z., Rais, I., Regal, V., Sladký, V., Šroller, J., Štráfela, J., Švasta, J., Váňa, V., Velich, J., Vencel, B. (1987). Intenzivní pícninářství, VŠZ, Praha – Suchdol, pp. 74.

Shukla, D. D., Ward, C. W., Brunt, A. A. (1994). The Potyviridae, pp. 74, 78 - 79.

Shukla, D. D., Ward, C. W., Brunt, A. A. (1994b). The Potyviridae, pp. 31 - 32.

Veerisetty, V., Brakke, M. K. (1977a). Alfalfa latent virus, a naturally occurring carlaviruses in alfalfa. *Phytopathology* 67: 1202.

Veerisetty, V., Brakke, M. K. (1977b). Differentiation of legume carla-viruses based on their biochemical properties. *Virology* 83: 226.

Webové reference

AGROGEN, spol. s.r.o. - Šlechtitelská stanice Želešice.

<http://www.agrogen.cz/inpage/slechtitelska-stanice-zelesice-865/>.

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/>. Dallwitz (1980) and Dallwitz, Paine and Zurcher (1993) should also be cited.

Brunt, A. A., Crabtree, K., Dallwitz, M. J., Gibbs, A. J., Watson, L. and Zurcher, E. J. (eds.) (1996b onwards). 'Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database. Version: 20th August 1996.' URL <http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/vide/>. „Known susceptibilities of Leguminosae-Papilionoideae“ <http://www.agls.uidaho.edu/ebi/vdie/famly078.htm#Medicago>.

ICTVdB Index of Viruses. International Committee on Taxonomy of Viruses 2002. ICTVdB - The Universal Virus Database, version 4, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/>.

ICTVdB Management (2006). 00.056.0.01. Potexvirus. In: ICTVdB - The Universal Virus Database, version 4. Büchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA.

ICTVdB Management (2006). 00.056.0.04. Carlaviruses. In: ICTVdB - The Universal Virus Database, version 4. Büchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA.

ICTVdB Management (2006). 00.057.0.01. Potyvirus. In: ICTVdB - The Universal Virus Database, version 4. Büchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA.

National Center for Biotechnology Information (NCBI), U.S. National Library of Medicine, 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>.

National Lucerne Organization (2008).

http://www.lusern.org/index.php?option=com_frontpage&Itemid=1.

Identifikace a sekvenování genomu nového viru infikujícího vojtěšku.

Seznam registrovaných odrůd (2009). ÚKZÚZ – Ústřední kontrola a zkušební ústav zemědělský, <http://www.ukzuz.cz>.

Description of plant viruses (DPV), <http://www.dpvweb.net/dpv/dpvnameidx.php>. Veerisetty, V., Department of Plant Pathology, University of Missouri, Columbia, Missouri 65211, USA. Alfalfa latent virus, http://phene.cpmc.columbia.edu/ICTVdB/DPV/219_files/showadpv.htm.