

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2010

Radka Gromnicová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Charakteristika zástupců r. *Allexivirus*,
*Flexiviridae***

Bakalářská práce

Radka Gromnicová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2010

Vedoucí práce: Mgr. Dana Šafářová, Ph.D.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně v průběhu bakalářského studia, s použitím uvedených literárních zdrojů a pod vedením vedoucího mé práce, Mgr. Dany Šafářové, Ph.D.

V Olomouci dne 4. 5. 2010

Souhrn

Rod *Allexivirus* z čeledi *Flexiviridae* byl ustanoven v roce 1998 a je celosvětově rozšířený. Allexiviry napadají zástupce rodu *Allium*. V těchto rostlinách se často vyskytují ve směsných infekcích, které mají vliv na zemědělské výnosy. Naproti tomu samotné allexiviry působí na rostlině buď jen nepatrné symptomy anebo vůbec žádné, a proto je i vliv na produkci nulový nebo nepatrný. Allexiviry jsou (+)ssRNA viry s délkou virionu 600 – 800 nm. Jejich genom je organizován do 6 čtecích rámců. Podle genetické variability nukleotidových a aminokyselinových sekvencí byli zástupci rodu *Allexivirus* rozděleni do 8 druhů a 3 druhy jsou zde prozatímně přiřazené. Pro detekci a identifikaci allexivirů lze použít především molekulární metody založené na RT-PCR nebo i v některých případech sérologické metody (ELISA).

Pomocí RT-PCR za pomoci ‚Random‘ primerů (úspěšně vyzkoušen i M4T primer) pro tvorbu cDNA a kombinace PCR primerů Allex-CP(+)/NABP(-) byla prokázána přítomnost allexivirů v 76,67 % analyzovaných vzorcích. Mezi detekovanými allexiviry byli pomocí sekvenční analýzy identifikováni zástupci *Garlic virus B*, *Garlic virus C* a *Garlic virus D*. V polovině sekvencovaných vzorcích byly zjištěny směsné infekce jednotlivými allexiviry.

Summary

The genus *Allexivirus* (family *Flexiviridae*) has been submitted in 1998 and is widespread throughout the world. The natural host for allexiviruses is the plant genus *Allium*. These plants are usually infected by mixture of viruses which substantially influences agricultural yields. In contrast, allexiviruses within plants alone do not affect the production because they cause either no symptoms or mild ones. The genus *Allexivirus* has single-stranded RNA and is long 600 – 800 nm, the genome is organized into 6 ORFs. The members of the genus *Allexivirus* have been divided into 6 species and 3 tentative species according to nucleotide and amino acid sequences. The main detection method is PCR (a molecular method) but ELISA (a serological method) can be also limitedly used.

The presence of allexiviruses in a sample of 30 isolates has been detected by RT-PCR with positive result of 76,67 %. There were used Random primers (for RT) and *Allex-CP(+)/NABP(-)* (for PCR). Half of the sequenced samples have been identified as *Garlic virus B*, *Garlic virus C* and *Garlic virus D*, whereas the rest contained mixture of allexiviruses.

Poděkování

Děkuji Mgr. Daně Šafářové, Ph.D. za hodnotné rady a odborné vedení při vypracování této bakalářské práce a za pomoc při získávání a zpracování výsledků experimentální části.

Obsah

1. Úvod.....	8
2. Cíle práce	9
3. Současný stav řešené problematiky	10
3.1. Charakteristika čeledi Flexiviridae	10
3.2. Charakteristika rodu Allexivirus.....	12
3.2.1. Taxonomická struktura rodu.....	12
3.2.2. Geografické rozšíření.....	12
3.2.3. Biologické vlastnosti.....	13
3.2.3.1. Přirozený hostitel	13
3.2.3.2. Výskyt v hostiteli	14
3.2.3.3. Příznaky infekce	14
3.2.3.4. Způsob přenosu.....	15
3.2.3.5. Koncentrace allexivirů v rostlině.....	16
3.2.3.6. Ovlivnění výnosu po infekci.....	16
3.2.3.7. Vlastnosti virionu.....	16
3.2.3.8. Charakteristika genomu	17
3.2.4. Genetická variabilita allexivirů.....	18
3.3. Detekce a identifikace.....	20
3.3.1. Sérologická detekce	20
3.3.2. Detekce s použitím molekulárních metod založené na RT-PCR.....	21
4. Experimentální část.....	24
4.1. Materiál a metody	24
4.1.1. Rostlinný materiál.....	24
4.1.2. Izolace celkové RNA	24
4.1.3. Reverzní transkripce	24
4.1.4. Polymerasová řetězová reakce.....	25
4.1.5. Sekvencování	26
4.1.6. Fylogenetická analýza.....	26
4.2. Výsledky a diskuse	27
4.3. Závěr	33
5. Závěr	34
6. Literatura	35
7. Seznam použitých zkratek.....	38
8. Přílohy	39

1. Úvod

Česnek je ekonomicky velmi důležitou zemědělskou plodinou, která se pěstuje celosvětově. Virové infekce česneku jsou činitelem, který rostlinám a potažmo celé zemědělské produkci způsobuje velké škody. Rod *Allexivirus* patřící do čeledi *Flexiviridae* je pravděpodobně často se vyskytujícím rodem napadající rostliny r. *Allium* ve směsné infekci s dalšími rody.

Tato práce je rozdělena do dvou částí, literární a experimentální. První část, Současný stav řešené problematiky, shrnuje celkové poznatky o allexivirech. Jsou zde souhrnné informace o čeledi *Flexiviridae*, následuje charakteristika allexivirů, jejich geografické rozšíření, biologické vlastnosti a možnosti detekce a identifikace.

Následuje experimentální část, která se zabývá detekcí a identifikací allexivirů ve 30 různých kultivarech česneku za pomoci technik RT-PCR a sekvencování.

2. Cíle práce

Cílem práce bylo:

- charakterizovat zástupce rodu *Allexivirus* s ohledem na jejich taxonomii, geografické rozšíření, biologické vlastnosti, genetickou variabilitu izolátů a jejich fylogenetické vztahy;
- shrnout metody, které lze uplatnit při detekci a identifikaci allexivirů;
- zjistit přítomnost allexivirů v souboru různých kultivarů česneku, převážně českého původu, a v pozitivním případě určit jejich druhové zařazení a fylogenetické vztahy.

3. Současný stav řešené problematiky

Virózy česneku jsou dnes již tak rozšířené, že je téměř jisté, že viry infikované česneky, potkáváme denně na pultech obchodů. Česnek je napadán řadou virů a jedním z nich je i nepříliš zkoumaný rod *Allexivirus*, patřící do čeledi *Flexiviridae*. *Allexiviry* jsou relativně nedávno popsáným rodem, který sám o sobě většinou nezpůsobuje na rostlinách viditelné příznaky ani významně neovlivňuje kvalitu produkce česneku. Jeho zástupci proto nejsou považováni za ekonomicky významné a z tohoto důvodu nebyl výskyt rodu *Allexivirus* doposud v Evropě podrobně zkoumán.

3.1. Charakteristika čeledi *Flexiviridae*

Tato čeleď byla ustanovena v roce 2004 (ICTVdB, version 4, 2006) a jméno dostala podle společného vláknitého vzhledu zástupců (z anglického *flexuous*, vláknitý). *Flexiviry* jsou (+)ssRNA viry (Adams *et al.*, 2004) charakteristické podobností v morfologii virionu, ve společných znacích typu a organizace genomu a jsou zde pozorovány silné fylogenetické vztahy mezi replikačními a strukturálními proteiny (Martelli *et al.*, 2007).

Zástupci čeledi *Flexiviridae* infikují v přirozených podmínkách širokou škálu dvouděložných rostlin, dřeviny a byliny, jen zřídka jednoděložné rostliny. Jednotliví zástupci čeledi infikují obvykle omezenou škálu hostitelů (Adams *et al.*, 2004). Jejich významnými hostiteli jsou zemědělské rostliny, na nichž způsobují mírné i závažné škody, z nichž ekonomicky nejvýznamnější jsou infekce ovocných dřevin. *Flexiviry* se přenášejí především mechanicky nebo vegetativně, a právě vegetativní množení bylinných hostitelů pomocí infikovaných cibulek, hlíz a oddenků představuje významný zdroj infekce a je klíčový pro jejich přenos (Martelli *et al.*, 2007).

Virové částice *flexivirů* se vyskytují v buňkách hostitelských rostlin ve formě shluků, které se objevují především v cytoplazmě, méně v jádře. Vnější podoba těchto shluků se liší rod od rodu, mohou být vláknité (potexviry, vitiviry a capilloviry), anebo tuhé a nevláknité (carlaviry, trichoviry a foveaviry). Délka vláknitých forem virů se pohybuje většinou ve stovkách nanometrů, od 470 nm u potexvirů do přibližně 1 000 nm u carlavirů. Vlastní virová částice *flexivirů* je tvořena kapsidovou podjednotkou, jenž je

jednoduchá a obaluje jednu molekulu RNA velkou přibližně od 6 kb do 9 kb, která tvoří asi 5 % celkové hmotnosti virionu. Viriony obsahují také koncovou strukturu, která sestává z přídatného virového proteinu a pravděpodobně podmiňuje virový transport v infikovaných rostlinách (Martelli *et al.*, 2007).

Genom flexivirů je tvořen několika čtecími rámci (ORF, *open reading frame*), jejichž počet se mezidruhově liší (mohou mít až 6 čtecích rámců, viz Tab. I). U všech rodů jsou společné tři základní čtecí rámce: rámec kódující replikasu (obsahující konzervované motivy methyltransferasa, RNA-dependentní RNA polymerasa, RNA helikasa), rámec s geny, jejichž produkty umožňují mezibuněčný pohyb virionů, rámec pro plášťový protein (CP) a šestý rámec (u některých virů), který může částečně zasahovat do 3'-konce CP genu, který má schopnost vazby na nukleotidy (Adams *et al.*, 2004).

Čeleď *Flexiviridae* obsahuje celkem 9 rodů, *Potexvirus*, *Mandarivirus*, *Allexivirus*, *Carlavirus*, *Foveavirus*, *Capillovirus*, *Vitivirus*, *Trichovirus* a provizorně zařazený *Citriovirus*. (Martelli *et al.*, 2007). Vzájemné srovnání některých jejich vlastností je shrnuto v Tab. I.

Tab. I: Vybrané charakteristiky jednotlivých rodů čeledi *Flexiviridae* (podle Martelli *et al.*, 2007)

rod	délka virionu (nm)	Velikost genomu (kb)	Velikost plášťového proteinu (kDa)	počet ORF	Velikost replikativního proteinu (kDa)
<i>Potexvirus</i>	470 – 580	5,9 – 7,0	22 – 27	5	146 – 191
<i>Mandarivirus</i>	650	7,5	36	6	187
<i>Allexivirus</i>	asi 800	8,1 – 8,8	26 – 28	6	175 – 194
<i>Carlavirus</i>	610 – 700	7,4 – 8,5	31 – 40	6	226 – 238
<i>Foveavirus</i>	723 – 800+	8,7 – 9,3	28 – 45	5 nebo 6	144 – 147
<i>Capillovirus</i>	640 – 700	6,5 – 7,4	25 – 27	2 nebo 3	214 – 241
<i>Vitivirus</i>	725 – 785	7,4 – 7,6	21 – 23	5	195 – 196
<i>Trichovirus</i>	640 – 760	7,5 – 8,1	21 – 22	3 nebo 4	216 – 217
<i>Citriovirus</i>	960	8,7	41	3	227

3.2. Charakteristika rodu *Allexivirus*

Rod *Allexivirus* byl ustanoven relativně nedávno, v roce 1998 (ICTVdB, version 4, 2006). Jméno je odvozeno od rodu *Allium*, což je hostitelský rod, který allexiviry infikují. Základní charakteristika rodu *Allexivirus* vychází z taxonomické struktury rodu, jeho rozšíření a z biologických vlastností.

3.2.1. Taxonomická struktura rodu

Do rodu *Allexivirus* náleží 8 druhů a 3 druhy jsou zde prozatímně přiřazené. Podle rozhodnutí ICTV v její sedmé zprávě (2000) byla definována molekulární kritéria, která však nejsou jednotná. Pro odlišení druhů v rodu *Allexivirus* byla stanovena dvě základní kritéria: (1) identita aminokyselinové sekvence plášťového proteinu, která je nižší než 90% a (2) identita nukleotidové sekvence 3'-koncové nekodující oblasti, jež je nižší než 90%. Podle těchto hledisek se zástupci rodu *Allexivirus* rozdělují do těchto druhů: *Garlic mite-borne filamentous virus (GarMbFV)*, *Garlic virus A (GarV-A)*, *Garlic virus B (GarV-B)*, *Garlic virus C (GarV-C)*, *Garlic virus D (GarV-D)*, *Garlic virus E (GarV-E)*, *Garlic virus X (GarV-X)*, *Shallot virus X (ShVX)*; jako prozatímní druhy jsou zařazeny *Garlic mite-borne latent virus (GarMbLV)*, *Onion mite-borne latent virus (OMbLV)*, *Shallot mite-borne latent virus (ShMbLV)* (Helguera *et al.*, 1997; Sumi *et al.*, 1993, 1999; Chen *et al.*, 2001, Song *et al.*, 1998, Kanyuka *et al.*, 1992). Typovým zástupcem rodu *Allexivirus* je *Shallot virus X* (ICTVdB, version 4, 2006).

3.2.2. Geografické rozšíření

Rod *Allexivirus* je celosvětově rozšířený (Lee *et al.*, 2007). Jeho zástupci byli detekováni v Asii (Čína, Indie, Írán, Japonsko, Korea), v Jižní Americe (Argentina, Brazílie), v Austrálii a Oceánii (Nový Zéland) a v Evropě (Řecko) (viz Tab. II) (Cafrune *et al.*, 2006; Dovas *et al.*, 2001; Conci *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2001, 2004; Majumder *et al.*, 2008; Melo Filho *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2005; Pearson *et al.*, 2006; Perez-Egusquiza *et al.*, 2008; Shahræen *et al.*, 2008; Sumi *et al.*, 1993, 1999; Ward *et al.*, 2009).

Za rozšíření allexvirů je odpovědná především dlouhodobá zemědělská propagace vegetativně množeného česneku (pěstování ze stroužků) a mezinárodní obchod s tímto rostlinným materiálem. K rozšíření přispěl i hmyzí přenašeč *Aceria tulipae* (viz dále)

(Lee *et al.*, 2007).

Tab. II: Zjištěný výskyt jednotlivých druhů rodu *Allexivirus*

země	identifikovaný druh
Čína	GarV-D, GarV-E, -X (Chen <i>et al.</i> , 2001, 2004)
Indie	ShVX (Majumder <i>et al.</i> , 2007)
Írán	GarV-B, -C, -D (Shahraeen <i>et al.</i> , 2008)
Japonsko	GarV-A, -B, -C, -D (Sumi <i>et al.</i> , 1993, 1999)
Korea	GarV-A, -B, -C, -D, -E, -X; GarMbFV (Park <i>et al.</i> , 2005)
Argentina	GarV-A, GarMbFV (Cafrune <i>et al.</i> , 2006, Conci <i>et al.</i> , 2003)
Brazílie	GarV-A, -B, -C, -D, GarMbFV (Melo Filho <i>et al.</i> , 2004)
Nový Zéland	GarV-A, -B, -C, -D, ShVX (Perez-Egusquiza <i>et al.</i> , 2008, Ward <i>et al.</i> , 2009, Pearson <i>et al.</i> , 2006)
Řecko	GarV-B, -C, -D (Dovas <i>et al.</i> , 2001)

3.2.3. Biologické vlastnosti

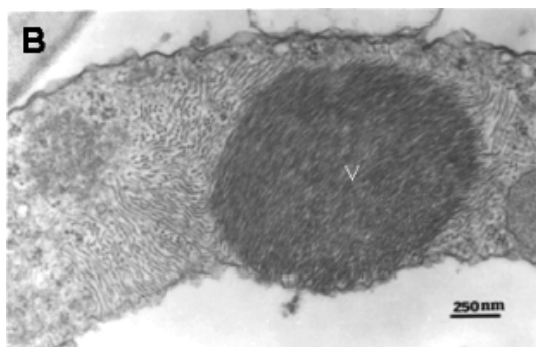
3.2.3.1. Přirozený hostitel

Přirozeným hostitelem allexivirů jsou zástupci rodu *Allium*. Ve všech doposud zaznamenaných případech byly hostiteli kulturní rostliny, doposud nejsou známy žádné planě rostoucí hostitelské druhy (Chen *et al.*, 2001). Tyto viry byly nalezeny v *Allium sativum* (česnek) (GarV-A, GarV-B, GarV-C, GarV-D, GarV-E, GarV-X), *A. ascalonicum* (šalotka) (ShVX, ShMbLV, GarV-A, GarV-D, GarV-B), *A. chinese* (GarV-A, GarV-B), *A. cepa* (cibule) (GarV-C, GarV-D), *A. porrum* (pórek) (GarV-C) a v *A. senescens* (GarV-A) (Park *et al.*, 2005, Pearson *et al.*, 2006, Shahraeen *et al.*, 2008, Ward *et al.*, 2009).

3.2.3.2. Výskyt v hostiteli

Allexiviry napadají parenchymatické buňky, díky čemuž jsou relativně snadno mechanicky přenosné (Martelli *et al.*, 2007). Viriony se hromadí v cytoplazmě (Lee *et al.*, 2007), kde mají podobu velkých inkluzních tělísek (Kang *et al.*, 2007) (viz Obr. 1).

Zaznamenané směsné infekce hostitelských rostlin potvrzují dříve zjištěnou skutečnost, že u česneku nebyla prokázána křížová ochrana, tzn. že infekce jedním virem nechrání rostliny proti infekci blízkce příbuzného viru (Fraser *et al.*, 1998). Chen *et al.* (2001) navíc prokázali, že jedna rostlina může být infikována různými izoláty stejného viru (např. izolát *Garlic virus X*) nebo blízkce příbuzných zástupců stejného rodu (např. GarV-X a GarV-E). Komerčně pěstované česneky jsou napadeny směsicí virů s převahou potyvirů (*Onion yellow dwarf virus*, OYDV a *Leek yellow stripe virus*, LYSV), carlavirů (*Garlic common latent virus*, GarCLV a *Garlic latent virus*, GarLV = *Shallot latent virus*, SLV) a některých zástupců rodu *Allexivirus* (Chen *et al.*, 2001, 2004, Kanyuka *et al.* 1992, Ryabov *et al.*, 1996, Sumi *et al.*, 1999, Takaichi *et al.*, 2001, Tsuneyoshi *et al.*, 1998, Van Dijk 1994, Vishnichenko *et al.*, 1993, Yamashita *et al.*, 1996).



Obr.1: Virové částice agregované v epidermálních buňkách (převzato z Kang *et al.*, 2007)

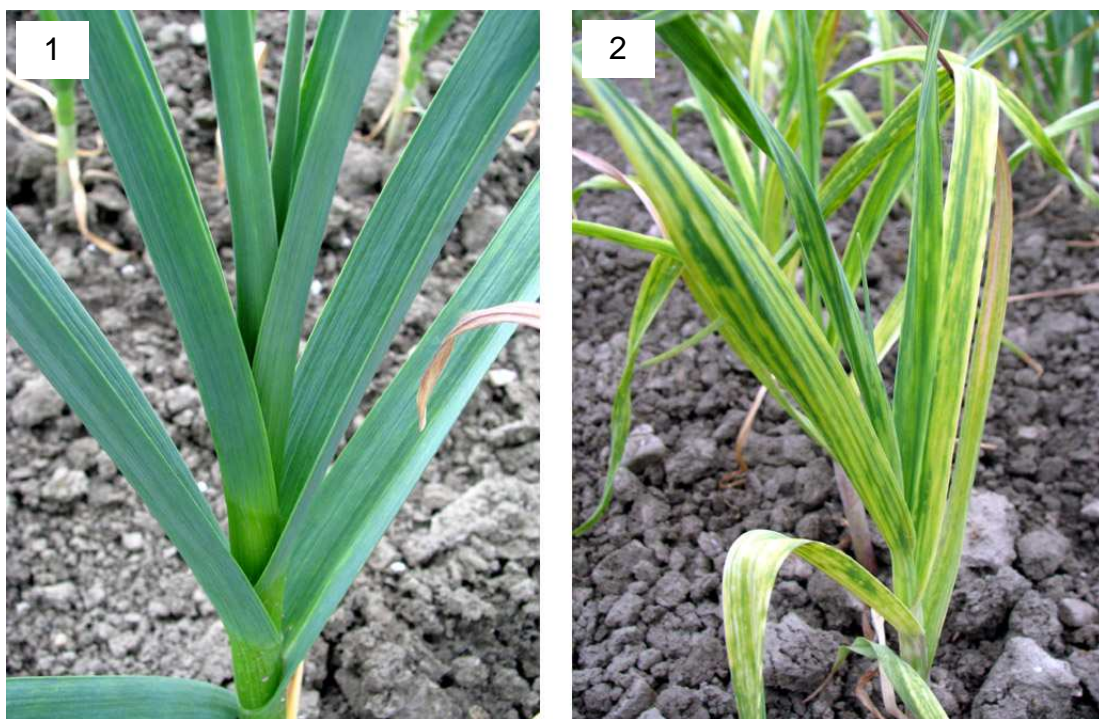
3.2.3.3. Příznaky infekce

Samotné allexiviry indukují na rostlinách česneku buď vznik příznaků infekce, tj. slabé nezřetelné proužky a mírnou mozaiku, anebo nejsou zjištěné vůbec žádné symptomy (Yamashita *et al.* 1996, Van Dijk 1994). V případě infekce viry komplexu česneku, které běžně napadají zástupce rodu *Allium*, mohou allexiviry vyvolávat

viditelné příznaky (Ward *et al.*, 2009) (viz Obr. 2). Hlavním symptomem takovéto směsné infekce je retardovaný růst, na listech se objevuje žlutě proužkovaná mosaika a list může být pokroucen a deformován (Lee *et al.*, 2007).

3.2.3.4. Způsob přenosu

Allexiviry se přenášejí vegetativně, mechanicky či pomocí přenašečů. Vegetativní způsob je považován za velmi významný, viry se šíří díky vegetativnímu způsobu množení hostitelských rostlin (stroužky). Mechanický přenos je možný manuální inokulací zdravých rostlin pomocí rostlinných šťáv napadeného hostitele (Fauquet *et al.*, 2005). Hlavním hmyzím vektorem allexivirů jsou acérie (*Aceria tulipae*) (Kang *et al.*, 2007).



Obr. 2: Česneky bezvirozní (1) a napadené viry (2)

3.2.3.5. Koncentrace allexivirů v rostlině

Cafrune *et al.* (2006) porovnávali průměrnou koncentraci virů v rostlině s teplotou okolního prostředí s cílem zjistit korelaci teploty a výskytu allexivirů v jednotlivých rostlinách. Při pěstování rostlin v zemědělských podmínkách a při teplotách různě kolísajících v průběhu roku však tuto skutečnost neprokázali. Zjistili, že koncentrace virů v česneku kolísala, ale nepodařilo se jim prokázat žádnou statistickou korelaci.

3.2.3.6. Ovlivnění výnosu po infekci

Jak již bylo zmíněno, samotné allexiviry působí na rostlině pouze nepatrné symptomy, pokud nejsou ve směsné infekci s dalšími druhy, kdy působí snížení hmotnosti paliček a celkově tak i snížení zemědělské produkce. Vzhledem k tomu byl vliv samotných allexivirů na výnosy zkoumán jen výjimečně. Výjimkou je práce skupiny Cafrune *et al.* (2006), kteří zaznamenali snížení hmotnosti stroužků česneků i v důsledku infekce samotnými druhy *Garlic virus A* a *Garlic virus C*.

Vliv směsné infekce v česneku zkoumali Takaichi *et al.* (2001), kteří ve Francii zjistili 17 – 54% úbytek váhy palic česneků ve směsné infekci s LYSV, kdežto pokud byl přítomen OYDV, byl vliv na rostlinu ještě vyšší, redukce se pohybovala mezi 39 % až 60 %. Conci *et al.* (2003) navázali na tuto práci studiem možnosti introdukce bezvirozní sadby do zemědělské produkce. Stanovili, že bezvirozní rostliny mají výrazně vyšší výnos než infikované (obsahující komplex virů různých druhů a rodů). Kultivovali česneky v průběhu pěti následujících let v zemědělských podmínkách a již po první sklizni bylo zjištěno vysoké procento infikovaných rostlin. V následujících sklizních byl zaznamenán pokles výnosu. Stále je ale větší výnosnost původně neinfikovaných rostlin i po pěti letech jejich pěstování ve srovnání s chronicky infikovanými rostlinami z běžné produkce (Conci *et al.*, 2003). Je zřejmé, že introdukce bezvirozních rostlin do zemědělské produkce má význam, ačkoli v krátké době pěstování v zemědělských podmínkách dochází k jejich infikování širokou škálou rostlinných virů.

3.2.3.7. Vlastnosti virionu

Protažený nukleokapsid allexivirů je neobalený, má helikální symetrii, je vláknitý, (ICTVdB, version 4, 2006) (viz Obr. 3) s délkou 600 – 800 nm (Lee *et al.*, 2007).

Uvnitř kapsidu se nachází lineární, pozitivní, jednořetězcová RNA. Viriony mohou také obsahovat dvoušroubovici DNA neznámého původu a funkce (ICTVdB, version 4, 2006).



Obr. 3: Viriony allexivirů, fotografie z elektronového mikroskopu (převzato z <http://www.dpvweb.net/notes/showem.php?genus=Allexivirus>); měřítko 200 nm

3.2.3.8. Charakteristika genomu

Kompletní genom je dlouhý 8,1 – 8,8 kb (Martelli *et al.*, 2007), 3'-konec molekuly má poly(A) konec. Obsah guaninu a cytosinu se pohybuje v rozmezí 46,7 – 49,2 % (ICTVdB, version 4, 2006).

Na typickém genomu rodu *Allxivirus* bylo identifikováno celkem 6 čtecích rámců (ORF) – replikasa (ORF1), ORF2, ORF3, ORF4 s dosud nepříliš jasnou funkcí kódovaného proteinu, ORF5 pro plášťový protein a ORF6 (viz Obr. 4) (Chen *et al.*, 2001).

Replikasa zaujímá největší část genomu a kóduje celkový polypeptid o velikosti 170 – 195 kDa. Předpokládá se, že tento protein obsahuje tři motivy, jejichž funkce jsou: (1) methyltransferasa, (2) helikasa a (3) RNA dependentní RNA polymerasa (RdRp) (Chen *et al.*, 2001, 2004).

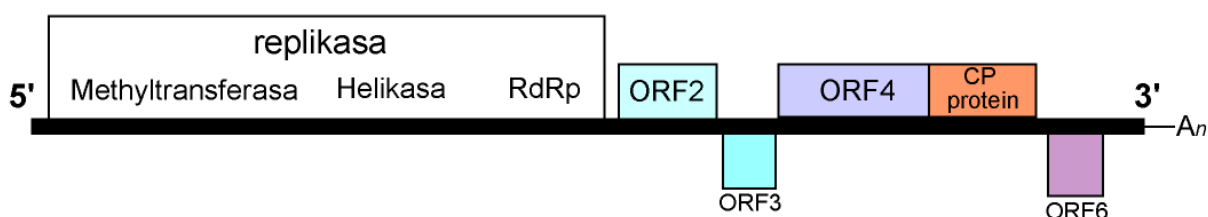
Následující čtecí rámce, ORF2 a ORF3, kódují nejspíš funkčně důležité bílkoviny. ORF2 kóduje 25 – 28 kDa protein, který je podobný TGB1 (*triple gene block 1*) u carlavirů a potexvirů, označuje se proto někdy jako TGBp1. Je to na leucin bohatý protein, na kterém byl identifikován motiv, který může mít funkci NTP-dependentní helikasy. Struktura proteinu je tvořena amfipatickými alfa-helixy, které mají schopnost vázat RNA nebo DNA. ORF3 kóduje 11 – 12 kDa protein (TGBp2) o struktuře 'helix-coil-helix', které tvoří 2 transmembránové regiony, přičemž N-konec a základní C-konec tohoto proteinu jsou uvnitř cytoplasmy. Předpokládá se, že oba zmíněné proteiny (TGBp1 a TGBp2) jsou klíčové v procesu přenosu virionů mezi buňkami (Chen *et al.*,

2001). TGB proteiny totiž interagují s plazmodesmaty rostlinných buněk a pomáhají v pohybu virové částice z buňky do buňky (Kang *et al.*, 2007, Dinant *et al.*, 1993).

ORF4 je některými svými vlastnostmi unikátní v celém genomu. Neobsahuje klasický iniciační kodon a kóduje na serin a threonin bohatý protein o velikosti 40 kDa. Tato bílkovina obsahuje asi 30 fosforylačních míst, které mohou být rozpoznány kinasami a fosfatasami. Po fosforylaci nese protein velké množství záporně nabitých nábojů. Je to nejvariabilnější protein rodu s dosud neznámou funkcí (Chen *et al.*, 2001, 2004).

Plášťový protein (CP) je kódován ORF 5. Jeho velikost je 26 – 29 kDa (Chen *et al.*, 2001), byl však zjištěn i 30 kDa protein (Kang *et al.*, 2007). Tento protein je dále charakteristický vysokou konzervativností sekvence, s výjimkou variabilního N-konce (Chen *et al.*, 2001).

Posledním čtecím rámcem je ORF6. Kóduje protein bohatý na leucin, který má velikost 14 – 15 kDa. Tento protein se váže na nukleovou kyselinu a je možné, že je zapojen v regulaci replikace virové RNA (Chen *et al.*, 2001).



Obr. 4: Schéma organizace genomu rodu *Alexivirus* (podle Chen *et al.* (2004))

3.2.4. Genetická variabilita alexivirů

Jednotlivé ‚*GarV*‘ druhy (minimálně *GarV*-A a *GarV*-C) a ShVX se pravděpodobně vyvíjely nezávisle z hypotetického společného předka. K evolučním procesům, které postupně tento vývoj diferencovaly, lze zahrnout výměnu, přeskládání a duplikaci genů (Sumi *et al.*, 1999).

Chen *et al.* (2004) navrhli rozdělení zástupců rodu *Alexivirus* do 2 hlavních skupin podle identity nukleotidových sekvencí. První skupina podle nich zahrnovala *GarV*-E, *GarV*-D a *GarV*-A a do druhé skupiny autoři zařadili *GarV*-B, *GarV*-C a *GarV*-X.

Všimli si rovněž, že totéž rozdělení odpovídá rozdílům v organizaci sekvencí. Druhy GarV-B, GarV-C a GarV-X obsahují krátký (9 – 17 nt) netranslatovaný region mezi čtecím rámcem na konci ORF5 a čtecím rámcem na začátku ORF6. U zbývajících druhů (GarV-E, GarV-D, GarV-A) je tato oblast exprimována, oblasti ORF5 a ORF6 na sebe přímo navazují tím způsobem, že poslední nukleotid stop kodonu genu pro plášťový protein (CP) (TAA nebo TGA) je zároveň prvním nukleotidem iniciačního kodonu (ATG) v ORF6.

Sumi *et al.* (1999) porovnávali aminokyselinovou sekvenci podobnost replikasy mezi GarV-A, GarV-C a GarV-X. Zjistili, že tyto druhy mají 58,4 – 79% vzájemnou podobnost v RdRp proteinu. Jenomže identita sekvencí oblastí mezi doménami methyltransferasy a helikasy je nižší než 33 %. Autoři navrhuje, že takto významná sekvenci divergence v hypervariabilním úseku je výsledkem četných insercí či delecí. Jejich dalším zjištěním bylo, že hypervariabilní oblast RdRp u ShVX je významně podobná s oblastí u druhu *Clover yellow mosaic virus* (rod *Potexvirus*). U ‚GarV‘ druhů nebyla podobná similarita s potexviry nalezena.

Korelace mezi sekvencemi a geografickým původem, tzn. výskyt určitých druhů v určité lokalitě, je neustále řešený problém. Chen *et al.* (2004) zjistili, že druh GarV-D se v Číně vyskytuje vždy v asociaci s každým z dalších druhů rodu *Allexivirus*, zatímco GarV-X byl vždy nalezen sám. Tato korelace je pravděpodobně dána vegetativním způsobem rozmnožování rostlinného materiálu a také přenosem acériemi (Chen *et al.*, 2004). Určité selekční tlaky (podmínky prostředí, alternativní hostitelé, účinnost vektorového přenosu) mají podíl na genetické variabilitě izolátů stejných druhů. Rozdílné ekologické niky tak nejspíš zapříčinily adaptaci těchto virů (Melo Filho *et al.*, 2004).

U argentinského izolátu druhu *Garlic mite-borne filamentous virus* (GarMbFV) nebyla geografická podobnost izolátů dosud prokázána. V Brazílii byla zjištěna významně vyšší similarita izolátu tohoto druhu s geograficky blízkým argentinským izolátem. Nižší identita byla zjištěna u podobných izolátů v Japonsku a Koreji (Melo Filho *et al.*, 2004). Ale GarMbFV zjištěný v Koreji vykazoval vyšší aminokyselinovou identitu (75%) s argentinským izolátem než s geograficky bližším, japonským (58%) (Park *et al.*, 2005).

Tab. III: Příklady typových sekvencí izolátů jednotlivých druhů allexivirů (podle ICTVdB, version 4, 2006; databáze GenBank, NCBI)

název druhu	známá sekvence	Délka sekvence (nt)	Accession number	Referenční sekvence
<i>Garlic mite-borne filamentous virus</i>	neúplná, pro CP	762	X98991	-
<i>Garlic virus A</i>	kompletní	8 660	AB010300	NC_003375
<i>Garlic virus B</i>	neúplná	5 077	AB010301	-
<i>Garlic virus C</i>	kompletní	8405	AB010302	NC_003376
<i>Garlic virus D</i>	neúplná	4 497	AB010303	-
<i>Garlic virus E</i>	kompletní	8 451	AJ292230	NC_004012
<i>Garlic virus X</i>	kompletní	8 319	AJ292229	-
		8 106	U89243	NC_001800
<i>Shallot virus X</i>	kompletní	8 832	M97264	NC_003795

3.3. Detekce a identifikace

Detekce slouží ke zjištění přítomnosti virů. Při identifikaci se zkoumá identita jednotlivých nalezených sekvencí. Pro detekci allexivirů se lze použít metody sérologické nebo molekulární. Znalost identity virů česneku je důležitá pro studium virové epidemiologie, získané informace mohou být využity pro úpravu programů pro šlechtění rostlin tak, aby byly nové kultivary plodin odolné proti virové infekci (Melo Filho *et al.*, 2004).

Cafrune *et al.* (2006) stanovili doporučené období pro testování přítomnosti allexivirů v Argentině (potažmo v podobných klimatických podmínkách). Zjistili, že optimální doba pro detekci allexivirů je asi 64 – 81 dní po začátku pěstování nebo ke konci vegetačního cyklu (testováno na GarV-A). Jejich dalším zjištěním bylo, že stroužky česneku, které byly předem devernalizované, jsou nejvhodnějším rostlinným orgánem pro určení přítomnosti allexivirů.

3.3.1. Sérologická detekce

ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) je jednou ze základních diagnostických metod, přičemž její podstatou je interakce protilátky s antigenem. U allexivirů je antigenem plášťový protein viru, konkrétně N-koncová oblast, která obsahuje virově

specifické epitopy. Produkce vysoce specifických protilátek proti allexivirům je obtížná (Dovas *et al.*, 2001) a tyto protilátky proto nejsou běžně komerčně dostupné.

Někteří autoři využili ELISA metodu pro detekci allexivirů, ale při podrobnějším zkoumání této metody dospěli Melo Filho *et al.* (2004) k závěru, že u rodu *Allexivirus* lze tuto metodu využít pro detekci, ale není již příliš vhodná pro rozlišování konkrétních druhů (tj. k jejich identifikaci). Křížové reakce totiž často vedou k chybným interpretacím výsledků.

3.3.2. Detekce s použitím molekulárních metod založené na RT-PCR

Molekulární metody jsou dalším způsobem detekce virů. Dovas *et al.* (2001) zjistili, že metoda PCR (polymerasové řetězové reakce, *polymerase chain reaction*) má ve srovnání s ELISA metodou vyšší citlivost ($10^{-1} - 10^4$ krát citlivější). U PCR je doba potřebná pro detekci kratší než je tomu u ELISY a další výhodou PCR je širší schopnost detekce jednotlivých druhů (Dovas *et al.*, 2001).

Molekulární metody jsou klíčové pro identifikaci allexivirů. Jelikož jsou allexiviry ssRNA viry, jejich detekce jsou založeny na metodě tzv. RT-PCR. Při dvoukrokové RT-PCR je nejprve získána cDNA procesem reverzní transkripce (RT, *reverse transcription*), při které dochází k hybridizaci primeru a syntéze cDNA reverzní transkriptasou. Následuje krok amplifikace konkrétního úseku cDNA pomocí PCR. Tato reakce probíhá s pomocí odpovídající kombinace primerů (oligonukleotidů), které umožní specifické namnožení konkrétního úseku DNA. PCR reakce je založena na cyklech denaturace DNA, nasedání primerů při specifické teplotě a následné syntézy komplementárního vlákna.

Pro univerzální syntézu cDNA autoři nejčastěji navrhují použití primeru oligo d(T) (Dovas *et al.*, 2001; Kang *et al.*, 2007) nebo M4T (Chen *et al.*, 2001, 2004). Pro druhově specifickou syntézu allexivirů naopak Melo Filho *et al.* (2004) navrhli použití primerů GarV-A2, GarV-B2 a GarV-C2 (viz Tab. V).

Pro PCR detekci allexivirů je možno použít univerzální kombinace primerů - Allex-CP(+)/NABP(-), M4/pGV-3t, ALLEX 1/ALLEX 2 nebo různé druhově specifické kombinace, jako např. ShVX-CPF/ShVX-CPR, GarV-A1/GarV-A2, GarV-B1/GarV-B2, GarV-C1/GarV-C2, GarV-D1/GarV-D2 (charakteristika a použití shrnuty v Tab. IV a v Tab.V).

Tab. IV: Sekvence primerů použité pro detekci allexivirů

označení	sekvence	poznámka
M4T	5' –GTT TTC CCA GTC ACG AC (T)15 -3'	Univerzální, 750 bp (Chen <i>et al.</i> , 2004)
Allex-CP(+)	5' –TGG RCX TGC TAC CAC AAY GG-3'	
NABP(-)	5' –CCY TTC AGC ATA TAG CTT AGC -3'	
M4	5' –GTT TTC CCA GTC ACG AC -3'	Univerzální (Chen <i>et al.</i> , 2001)
pGV-3t	5' –TGG XCX TGC TAC CAC AAX GG -3'	
(+)	GAT CGG AAC CAA GGA ATA A	pro GarV-X, 661 bp (Park <i>et al.</i> , 2005)
(-)	GAG TGG AAA CCA TAT TCG AG	
(+)	ATG TCA GGT TCC ACA AGT	pro GarMbFV, 723 bp (Park <i>et al.</i> , 2005)
(-)	TCA GAA CGT AAT CAT GGG A	
ShVX-CPF	5' –ATT TAG GGG TGA AGG TCT GT -3'	pro ShVX, 912 bp (Perez-Egusquiza <i>et al.</i> , 2008)
ShVX-CPR	5' –GAG TTT TGA GGT CGT TGG -3'	
ALLEX 1	5' – CYGC TAA GCT ATA TGC TGA ARG G -3'	Univerzální, 183 – 192 bp (Dovas <i>et al.</i> , 2001)
ALLEX 2	5' –TGTT RCA ARG TAA GTT TAG YAA TAT CAA CA -3'	
GarV-A1	5' –CCC AAG CTT ACT GGA AGG GTG AAT TAG AT-3'	Pro GarV-A, GarV-B, GarV-C, GarV-D, cca 800 bp (Melo Filho <i>et al.</i> , 2004)
GarV-A2	5' –CCC AAG CTT AGG ATA TTA AAG TCT TGA GG-3'	
GarV-B1	5' –CCA AGC TTT TAA TTT ACA CTG GCT TAGA-3'	
GarV-B2	5' –CCA AGC TTT ATG CAT TTC TGG GTC AAGA-3'	
GarV-C1	5' –CCC AAG CTT CAT CTA CAA CAA CAA AGG CG-3'	
GarV-C2	5' –CCC AAG CTT ATA AGG GTG CAT GAT TGT GG-3'	
GarV-D1	5' –CCA AGC TTA AGC AAG TGA AGA GTG TAAG-3'	
GarV-D2	5' –CCA AGC TTT TTG GAA GAG GAG GTT GAGA-3'	
(+)	5' –RGX CTT GTT AAC CTC ATG GRX-3'	
(-)	5' –XYG TTT GAG TGC TCA GTT GYX-3'	

(X = A, T, C, G; Y = T, C; R = A, G)

(+) 'sense' primer, (-) 'antisense' primer

Tab. V: RT-PCR primerové kombinace používané pro detekci allexivirů

Reverzní transkripce	PCR	Autoři
M4T	M4, pGV-3t	Chen <i>et al.</i> , 2001
M4T	AllexCP(+), NABP(-)	Chen <i>et al.</i> , 2004
oligo d(T)primer	(+), (-)	Kang <i>et al.</i> , 2007
oligo d(T)primer	ALLEX 1, ALLEX 2	Dovas <i>et al.</i> , 2001
GarV-A2 GarV-B2 GarV-C2 GarV-D2	GarV-A1, GarV-A2 GarV-B1, GarV-B2 GarV-C1, GarV-C2 GarV-D1, GarV-D2	Melo Filho <i>et al.</i> , 2004

4. Experimentální část

Detekce allexivirů ve vzorku česneků rostoucích v polních podmínkách

4.1. *Materiál a metody*

4.1.1. Rostlinný materiál

Přítomnost allexivirů byla testována ve 30 vzorcích česneku, různých kultivarů českého původu (viz Tab. VI), pocházející z genové sbírky VÚRV Ruzyně, pobočka Olomouc. Jednotlivé rostliny vykazovaly různě intenzivní příznaky infekce viry komplexu česneku (Obr. 5).

4.1.2. Izolace celkové RNA

Celková RNA byla izolována z cca 0,2 g (1,85-2,05 g) listů jednotlivých rostlin česneku odebíraných v polovině května roku 2009. Pro izolaci celkové RNA byl použit TriReagent (Sigma), v souladu s pokyny výrobce. RNA byla v průběhu izolace rozdělena do dvou alikvót, a následně dlouhodobě uchovávána při -80°C .

Pro následné analýzy byl vždy jeden vzorek izolované RNA na testovanou rostlinu rozpuštěn v 50 μl dEPC dH_2O , a následně byla spektrofotometricky zjištěna její čistota a koncentrace v 2 μl vzorku pomocí spektrofotometru NanoDrop1000 (Thermo Fisher Scientific Inc).

4.1.3. Reverzní transkripce

Virová cDNA byla získána ve dvoukrokové reverzní transkripci za pomoci Random primerů (Promega) anebo M4T primeru. 5 μl izolované RNA (660 – 2 790 ng RNA) bylo smícháno s částí reakční směsi („premix I“): 1 μl (0,5 μM) primeru a 9 μl dEPC destilované vody, celkový objem 15 μl , a inkubováno 5 min při teplotě 70°C a následně okamžitě přeneseno na led. K této směsi byl přidán zbytek reakční směsi („premix II“): 8 μl AMV-RT pufru (5x), 4 μl dNTP (10 mM; Promega), 0,5 μl inhibitoru ribonukleasy (40 U/ μl ; Promega) a 1 μl AMV Reverzní transkriptázy (10 U/ μl ,

Promega) a 11,5 µl dEPC destilované vody, celkový objem 25 µl. Reverzní transkripce v celkovém objemu 40 µl proběhla v závislosti na použitém primeru, pro ‚Random‘ primery při 37 °C anebo při použití primeru M4T při 42°C po dobu 60 min v cycleru Thermal Cycler Gene E (Techne).

4.1.4. Polymerasová řetězová reakce

cDNA byla amplifikována v následné PCR reakci za pomoci kombinace univerzálních primerů AllexCP(+) (f primer), NABP(-) (r primer) podle Chen *et al.* (2004) určených pro detekci allexivirů (viz Tab. IV).

Reakce proběhla celkovém v objemu 25 µl. Reakční směs obsahovala: 5 µl Go-Taq pufru (5x) (Promega), 1,5 µl MgCl₂ (25 mM, Promega), 8,43 µl destilované vody, 6,25 µl dNTP (1 mM, Promega), 0,31 µl r primeru (20 pmol/l) a 0,31 µl f primeru (20 pmol/l), 0,20 µl Go Taq polymerasy (5 U/µl, Promega).

Podmínky reakce byly s použitím ‚Random‘ primerů následující:

1 . Počátečná predenaturace 94 °C, 3 min

2.1. Denaturace 94 °C, 1 min

2.2. Hybridizace primerů (annealing) 51 °C, 1 min;

2.3. Prodlužování primerů (extension) 72 °C, 2 min

3. Závěrečná elongace 72 °C, 7 minut

} 35 cyklů

Podmínky reakce s použitím M4T primeru byly následující:

1 .Počátečná predenaturace 94 °C, 3 min

2.1. Denaturace 94 °C, 1 min

2.2. Hybridizace primerů (annealing) 48 °C, 1 min

2.3. Prodlužování primerů (extension) 72 °C, 2 min

3. Závěrečná elongace 72 °C, 10 minut

} 34 cyklů

Výsledek PCR reakce byl vyhodnocen pomocí elektroforézy v 1,5% agarózovém gelu (Amresco) s přidávkem 5 µl GelRed (10 000x v DMSO; Biotium, Ltd.) v TAE pufru (složení viz Příloha, str. 39). Migrace vzorků probíhala za podmínek stejnosměrného napětí při 70 V po dobu 45 minut. Produkty byly vizualizovány a

dokumentovány pomocí UV transluminátoru a dokumentačního zařízení SynGene (Synoptics Ltd, UK).

4.1.5. Sekvencování

Pro následnou genetickou analýzu bylo vybráno 10 vzorků izolovaných z kultivarů česneku českého původu. PCR produkty očekávané velikosti byly izolovány pomocí QIAGEN Gel extraction kitu (QIAGEN), podle pokynů výrobce. Izolovaná DNA byla oboustranně sekvencována specifickými primery, nejdříve byla označena pomocí BigDye Terminator sequencing kitu, v.3.1 (Applied Biosystems), podle pokynů výrobce, a následně sekvencována pomocí genetického analyzátoru ABIPRISM3730.

4.1.6. Fylogenetická analýza

Sekvence analyzovaných DNA fragmentů byly složeny za pomoci specializovaného programu Seqman (DNASTAR, Lasergene). Jejich identita byl zjištěna porovnáním se známými sekvencemi pomocí programu BLAST (<http://www.ncbi.nih.gov/BLAST>).

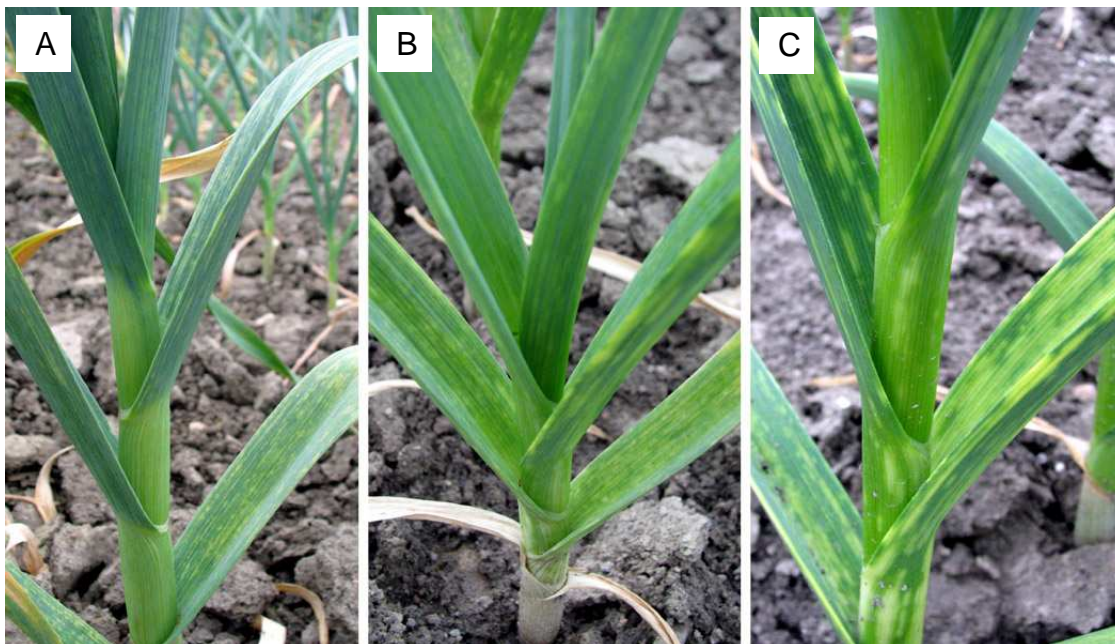
Získané sekvence byly porovnány s vybranými homologními sekvencemi izolátů allexivirů dostupnými v databázi GenBank.

Fylogenetické vztahy mezi jednotlivými izoláty allexivirů byly analyzovány pomocí neighbor-joining analýzy Clustal (Mega 4.0). Výsledné fylogenetické stromy byly vizualizovaný pomocí programu Mega 4.0 (TreeExplorer).

4.2. Výsledky a diskuse

Na sbíraných listech rostlin byly patrné silnější či slabší příznaky napadení viry komplexu česneku (viz str. 14). Rostliny vykazovaly především různý stupeň proužkovitosti, mírnou zakrslost a stáčení listů (Obr. 5).

Vlastní izolace celkové RNA byla úspěšná, u všech 30 vzorků se podařilo získat dostatečné množství RNA. Čistota RNA se různila, od 1,84 do 2,07, její kvalita byla dostačující pro úspěšné provedení reverzní transkripce. Koncentrace získané RNA byla překvapivě variabilní, nijak nekorelovala s množstvím listu použitým pro izolaci, např. u vzorku č. 2 při hmotnosti vzorku listu 0,12 g byla koncentrace vyizolované RNA vysoká (526,1 ng/μl) a naopak u vzorku č. 20 s 0,19 g vzorku listu byla nejnižší ze všech 30 vzorků, pouze 130,8 ng/μl (viz Tab. VI). Dané rozdíly pravděpodobně souvisí s kvalitou listů a stupněm projevů příznaků virové infekce, tj. s množstvím tzv. „zelené“ hmoty.



Obr. 5: Rostliny česneku s různým projevem příznaků napadení viry, mírné (A), střední (B) a silnější (C) příznaky

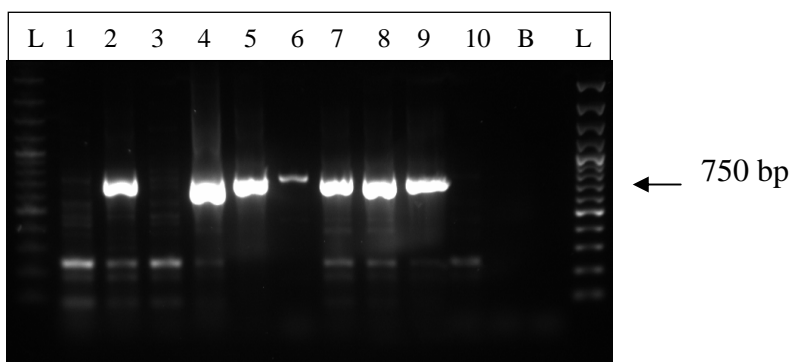
Tab. VI: Seznam analyzovaných vzorků a výsledky PCR detekce allelivirů

číslo vzorku	číslo odrůdy/pořadí rostliny	kultivar	navážka listu (g)	koncentrace RNA (ng/μl)	čistota RNA (A260/A280 nm)	PCR detekce
1	N 1065/3	Prim	0,19	363,0	1,97	-
2	S 1623/9	Horvath, kraj. odrůda	0,12	526,1	2,01	+
3	N 1066/5	Japo	0,17	229,6	1,97	-
4	P 1404/1	Pavlovice, kraj. odrůda	0,12	149,7	1,95	+
5	P 1057/7	Moravan	0,18	194,2	1,97	+
6	P 2806/5	Vekan	0,19	204,4	2,03	-
7	P 1058/8	Ropal	0,17	558,8	2,00	+
8	P 1027/1	Kuklenský	0,20	368,2	1,92	+
9	N 2842/2	Tibadur	0,18	347,4	1,95	+
10	P 2853/5	Dukát	0,19	131,7	1,99	-
11	P 1298/5	Landrace BK	0,18	325,5	2,07	+
12	S 1194/3	Landrace, Horní Moštěnice	0,17	467,7	1,98	+
13	P 2817/5	Karel	0,21	181,2	1,98	+
14	P 1229/3	Rousínov, kraj. odrůda	0,19	277,8	2,01	+
15	P 1032/10	Poděbradsky	0,20	206,8	2,07	+
16	N 1167/6	Landrace BK	0,19	266,4	1,91	-
17	N 1074/1	Záhorský	0,17	477,5	2,04	+
18	S 1164/7	Landrace BK	0,19	386,2	1,95	+
19	S 1025/8	Revničan	0,20	200,8	1,95	+
20	P 1347/1	Oravská Poruba	0,19	130,8	1,84	+
21	N 2685/6	jižní Morava, kraj. odrůda	0,18	617,5	1,96	-
22	P 2856/4	Djambul	0,18	328,3	1,94	-
23	P 1059/8	Bzenecký	0,21	245,8	1,91	+
24	S 1008/4	Mako	0,19	336,1	1,94	+
25	P 1341/2	Landrace, Vyšný Kubín	0,18	306,1	1,96	+
26	N 2828/1	Benátčan	0,17	287,6	1,90	+
27	N 2808/5	Lukan	0,19	162,7	2,08	+
28	P 1224/5	Linz, kraj. odrůda	0,18	172,1	2,09	+
29	P 1297/1	Landrace BK	0,18	225,2	1,96	+
30	P 2805/7	Jovan	0,18	132,1	2,01	+

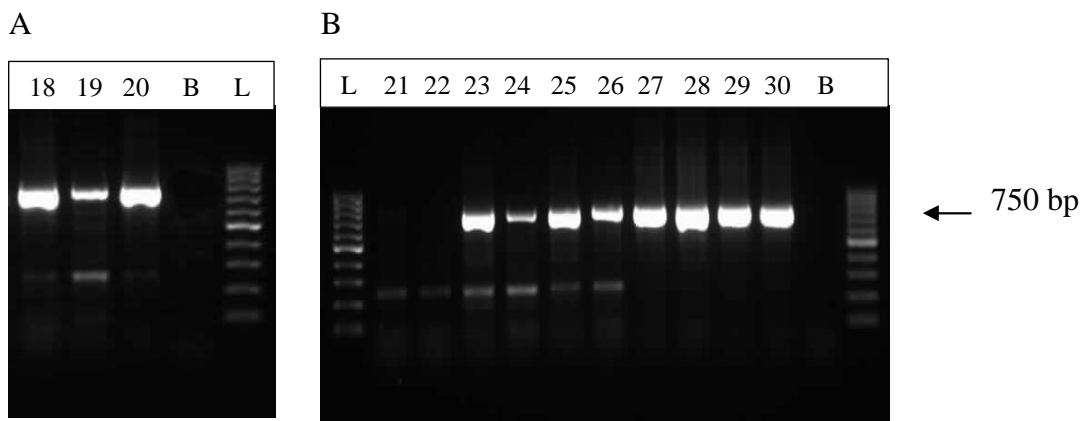
Vysvětlivky: + pozitivní reakce; - negativní reakce

Celkově byla detekce virů rodu *Allexivirus* pozitivní ve 23 vzorcích z 30, tzn. byl prokázán výskyt allexivirů v 76,67 % vzorků česneku různých kultivarů. Pro detekci byly pro RT použity ‚Random‘ primery a byl také vyzkoušen M4T primer. Podmínky PCR amplifikace byly v obou případech stejné (použití primerů AllexCP(+), NABP(-)), velikost zmnoženého fragmentu dokazující přítomnost allexivirů byl 750 bp.

Reverzní transkripce s ‚Random‘ primery byla použita u všech vzorků. Pozitivní nález fragmentu byl ve 23 případech z 30. U vzorku č. 6 byl nalezen slabý produkt v oblasti 780 bp (viz Obr. 5). Tento vzorek byl připraven z rostlinného materiálu množství 0,19 g, tedy vysoká hodnota, a koncentrace RNA byla středně vysoká (204,4 ng/ μ l). Čistota RNA byla také adekvátní (2,03). Vzorek č. 6 proto nebyl hodnocen jako pozitivní nález. Při provedení reverzní transkripce s ‚Random‘ primery byl charakteristický výskyt nespecifických produktů velikosti 250 bp (celkově zjištěny v 19 případech z 30), což je pravděpodobným důsledkem nespecifické tvorby cDNA.

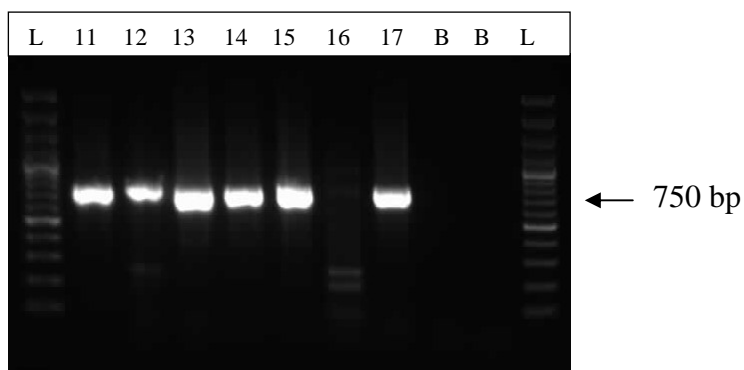


Obr. 5: Detekce allexivirů ve vzorcích 1 - 10 (RT primer: Random primer, PCR primery: AllexCP(+), NABP(-)) (L: 100 bp DNA ladder, Fermentas; 1-10: vzorky č. 1-10, B: voda (negativní kontrola)).



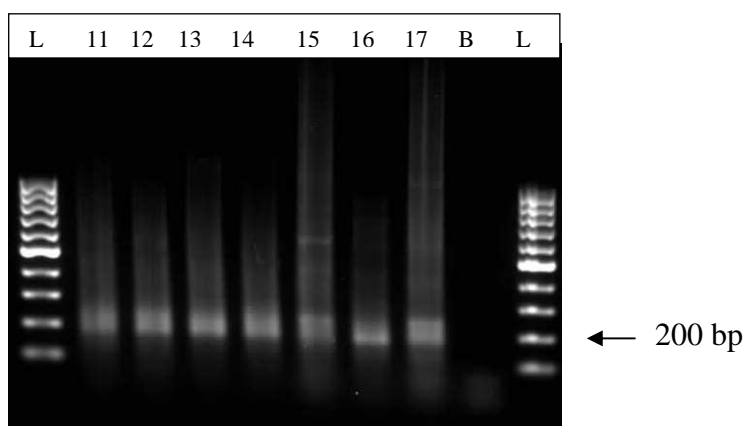
Obr. 6: Detekce alexivirů ve vzorcích (A)18 – 20 a (B) 21 – 30 (RT primer: Random primer, PCR primery: AlexCP(+), NABP(-)) (L: 100 bp DNA ladder, Fermentas; 18-20: vzorky č. 18-20, 21-30: vzorky č. 21-30, B: voda (negativní kontrola)).

Pro reverzní transkripci bylo vyzkoušeno také použití M4T primeru (podle Chen *et al.*, 2004). M4T primer byl použit u 7 vzorků, tj. vzorky 11 – 17, a i v tomto případě byl prokázán pozitivní nález alexivirů v 6 vzorcích ze 7 (viz Obr. 7). Při použití tohoto primeru nedocházelo k výraznému vzniku nespecifických produktů (1 případ ze 7) jako tomu bylo u ‚Random‘ primeru.



Obr. 7: Detekce alexivirů ve vzorcích 11 – 17 (RT primer: M4T, PCR primery: AlexCP(+), NABP(-)) (L: 100 bp DNA ladder, Fermentas; 11-17: vzorky č.11-17, B: voda (negativní kontrola)).

Byla vyzkoušena PCR amplifikace při použití PCR primeru AlexCP(+) a M4T v kombinaci s tvorbou cDNA při RT s použitím M4T primeru. Tato kombinace primerů nevedla k úspěšné tvorbě žádného patrného fragmentu a ukázala se jako nevhodná pro amplifikaci 3' oblasti genomu alexivirů (viz Obr. 8).



Obr. 8: Detekce allexivirů ve vzorcích 11 – 17 (RT primer: M4T, PCR primery: AlexCP, M4T) (L: 100 bp DNA ladder, Fermentas; 11-17: vzorky č. 11-17, B: voda (negativní kontrola)).

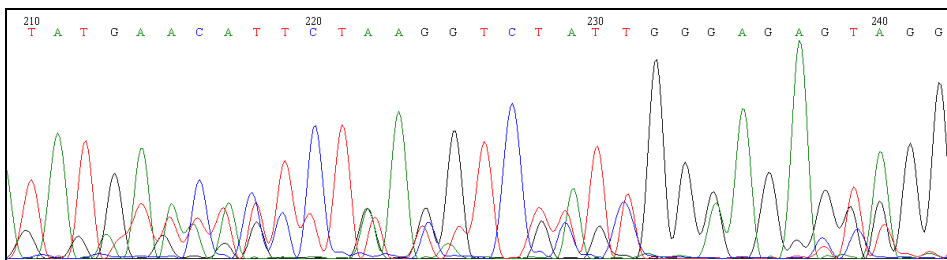
Sekvenční analýza a porovnání se známými sekvencemi potvrdila specifitu PCR detekce. Všechny analyzované vzorky vykazovaly podobnost se známými izoláty allexivirů.

Na základě porovnání sekvencí s databázemi pomocí BLAST se podařilo u pěti vzorků identifikovat druhovou specifitu detekovaných allexivirů, a to u izolátů získaných ze vzorků č. 2, 12, 19, 24 a 26. Všechny takto získané a charakterizované izoláty vykazovaly homologii s GenBank dostupnými sekvencemi allexivirů, odlišné však bylo jejich druhové zařazení.

Ze vzorku č. 2 byl získán izolát identifikován jako *Garlic virus B*, tento získaný izolát označený jako ‚Horvath S1623‘, vykazoval 90% podobnost s izolátem čínským YC (AJ551482) a s korejským (AF543829). Další izolátem (vzorek č. 26), který byl identifikován jako GarV-B, je ‚Benátčan N 2828‘, jenž vykazoval 90% identitu s čínskými izoláty ‚YC‘ (AJ551482) a ‚TS2‘ (AJ551481) a 89% identitu s korejským izolátem (AF543829). Jako druh *Garlic virus C* byl identifikován izolát ‚Landrace S1194‘ ze vzorku č. 12, který vykazoval 79% identitu s japonským izolátem (AB010302) a 78% podobnost s italským izolátem ‚Aglío2 vessalico‘ (AY170322). Izoláty ze vzorku č. 19 (‚Revničan S1025‘) a ze vzorku č. 24 (‚Mako S1008‘) byly identifikovány jako *Garlic virus D*, přičemž oba vykazovaly 96% podobnost s korejským izolátem (AF519572) a 96% s UK izolátem (L38892).

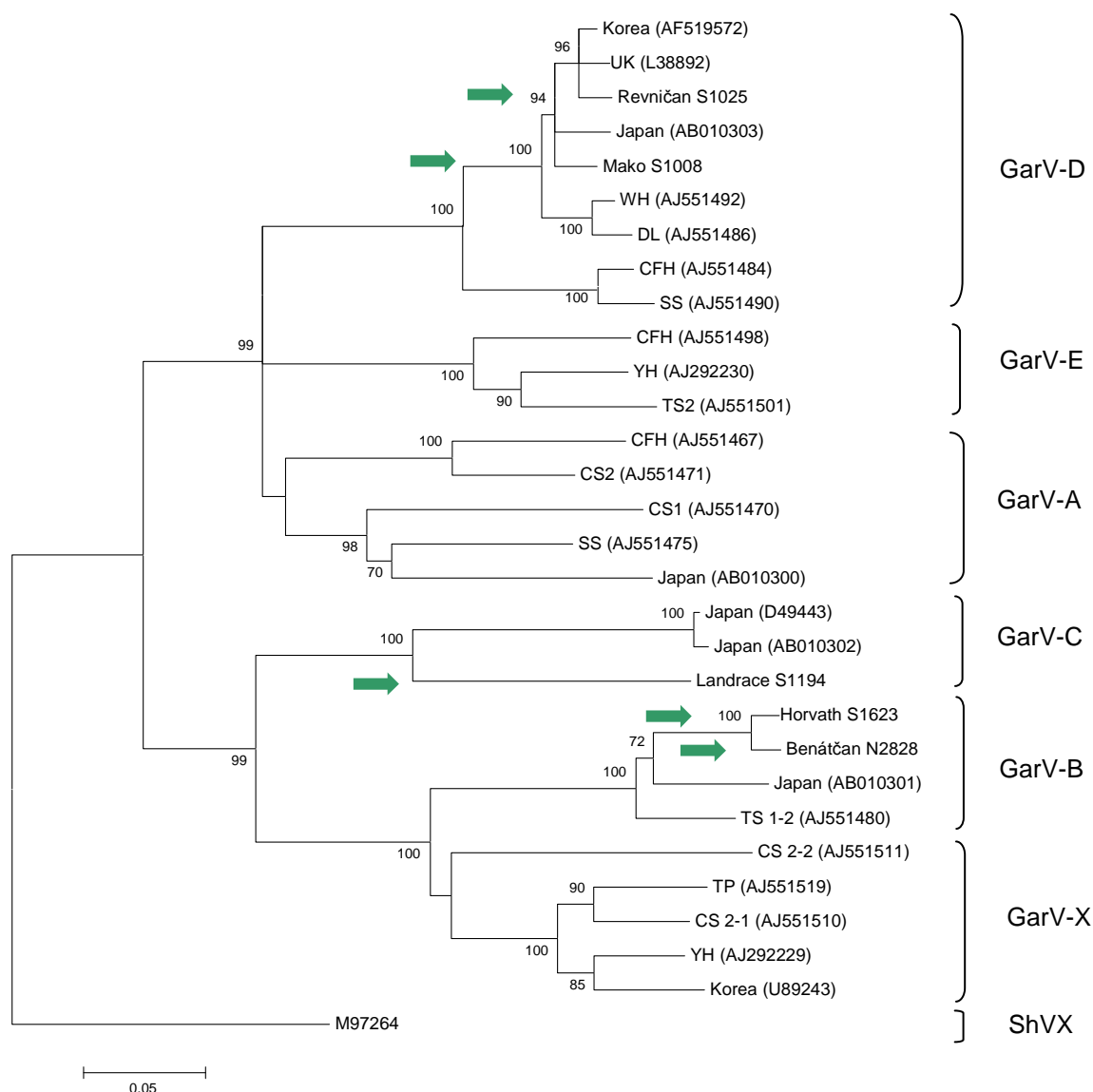
Fylogenetická analýza izolátů na základě sekvencí o délce 631-634 bp pokrývajících oblast genu plášťového proteinu potvrdila jejich druhové zařazení. Všechny allexiviry

se se statistickou průkazností vyvětvily do skupin v souladu s jejich druhovou specifitou. Dva izoláty, ‚Horvath S1623‘ a ‚Benátčan N 2828‘, vytvořily větev společně s ostatními izoláty GarV-B, s japonským (AB010301) a s čínským (AJ551480). Izolát ‚Landrace S1194‘ se vyvětvil s izoláty charakterizovanými jako *Garlic virus C*, které pocházejí z Japonska (D49443, AB010302). Izoláty ‚Revničan S1025‘ a ‚Mako S1008‘ byly odlišné od čínských izolátů, ale vykazovaly příbuznost s izoláty GarV-D pocházejících z UK (L38892), Koreji (AF519572) a Japonska (AB010303). Naše izoláty *Garlic virus D* vytvořily samostatnou větev statisticky odlišnou od izolátů tohoto druhu pocházejících z Číny (AJ551492, AJ551486).



Obr.9: Sekvenační výstup ukazující na přítomnost směsné infekce

U ostatních pěti analyzovaných vzorků přímá sekvenční analýza vlastních PCR produktů ukázala přítomnost směsných infekcí více allexivirů, které nebylo možno od sebe za daných podmínek odlišit (viz. Obr. 9). Analýza homologie takto generovaných sekvencí ukázala podobnost s více izoláty, např. u vzorku č. 4 získaného z česneku kultivaru ‚Pavlovice P 1404‘ byla zjištěna podobnost směsné sekvence s druhem *Garlic virus X* (identita 75%, U89243) a s druhem *Garlic virus B* (identita 84%, AJ551482).



Obr. 10: Fylogenetický strom izolátů allelixvirů (označeny zelenou šipkou) vytvořený podle neighbor-joining analýzy na základě sekvencí o délce 631-634 bp pokrývající oblast genu plášťového proteinu.

Izoláty jsou popsány jménem nebo zemí původu a Accession Number (v závorce). Měřítko znázorňuje 0,05 substitucí na pozici. Čísla představují hodnoty bootstrap získané při neighbor-joining analýze, přičemž jsou zobrazeny hodnoty vyšší než 70.

4.3. Závěr

Všechny testované kultivary projevovaly příznaky infekce napadení viry. V 76,67 % kultivarů byla prokázána přítomnost allelixvirů a u pěti vzorků se podařilo zjistit druhové zařazení izolátů. Byly prokázány druhy *Garlic virus B*, *Garlic virus C* a *Garlic virus D*. V našich materiálech se allelixviry vyskytovaly i ve směsných infekcích.

5. Závěr

Allexiviry, se svými 8 řádnými a 3 prozatímně zařazenými druhy, patří do čeledi *Flexiviridae* a jsou celosvětově rozšířené. Jejich přirozeným hostitelem je rod *Allium*, přičemž na česneku mohou indukovat slabé symptomy infekce nebo vůbec žádné. Většinou se vyskytují ve směsné infekci s dalšími viry česneku a celý tento komplex ovlivňuje výrazně zemědělské výnosy. Allexiviry jsou (+)ssRNA viry s genomem organizovaným do 6 čtecích rámců. Podobnost sekvencí nukleotidů či aminokyselin byla použita různými autory pro popis genetické variability allexivirů. Je známa kompletní sekvence genomu u téměř všech druhů rodu *Allexivirus*. Pro jejich detekci lze použít ELISA metodu nebo molekulární metody založené na RT-PCR.

U analyzovaného souboru česneků byla prokázána přítomnost allexivirů (v 76,67 % kultivarů) a s pomocí sekvenční a fylogenetické analýzy zde byli identifikováni zástupci druhů *Garlic virus B*, *Garlic virus C* a *Garlic virus D*.

6. Literatura

- 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(8): 1045-1060, 1672.
- Cafrune, E. E., Balzarini, M., and Conci, V. C.** (2006): Changes in the concentration of an *Allexivirus* during the crop cycle of two garlic cultivars. *Plant Dis.* 90:1293-1296.
- Chen, J., Zheng, H.-Y., Antoniw, J.F., Adams, M.J., Chen, J.-P., Lin, L.** (2004): Detection and classification of allexiviruses from garlic in China. *Arch. Virol.* 149: 435-445.
- Chen, J., Chen, J., Adams, M. J.** (2001): Molecular characterisation of a complex mixture of viruses in garlic with mosaic symptoms in China. *Arch. Virol.* 146: 1841-1853.
- Chen, J., Chen, J. P., Adams, M. J.** (2002): Characterisation of some carla- and potyviruses from bulb crops in China. *Arch. Virol.* 147: 419-428.
- Conci, V. C., Canavelli, A., Lunello, P., Di Rienzo, J., Nome, S. F., Zumelzu, G., and Italia, R.** (2003): Yield losses associated with virus-infected garlic plants during five successive years. *Plant Dis.* 87: 1411-1415.
- Dinant, S., Janda, M., Kroner, P. A. , Ahlquist, P.** (1993): Bromovirus RNA replication and transcription require compatibility between the polymerase- and helicase-like viral RNA synthesis proteins. *J. Virol.* 67: 7181-7189.
- Dovas, C. I., Hatziloukas, E., Salomon, R., Barg, E., Shibolet, Y., Katis, N. I.** (2001): Comparison of Methods for Virus Detection in *Allium* spp. *J. Phytopathol.* 149: 731-737.
- Fauquet , C. M., Mayo, M. A., Maniloff, J., Desselberger, U. , Ball, L. A.** (2005): Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, San Diego, CA.
- Fraser, R. S. S.** (1998): Introduction to classical cross protection. In: Foster G. D., Taylor S. C. (eds) *Plant virology protocols*, Humana Press, Totowa, pp 13-24.
- Helguera, M., Bravo-Almonacid, F., Kobayashi, K., Rabinowicz, P. D., Conci, V., Mentaberry, A.** (1997): Immunological detection of a GarV-type virus in Argentine garlic cultivars. *Plant Dis.* 81:1005-1010.
- ICTVdB Management** (2006): 00.056.0.03. *Allexivirus*. In: ICTVdB - The Universal Virus Database, version 4. Büchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/>).
- Kang, S. G., Koo, B. J., Lee, E. T., Chang, M. U** (2007): Allexivirus Transmitted by Eriophyid Mites in Garlic Plants. *J. Microbiol. Biotechnol.* 17(11): 1833-1840.
- Kanyuka, K. V., Vischnichenko, V. K., Levay, K. E., Kandrikov, D. Y, Ryabov, E. V., Zavriev, S. K.** (1992): Nucleotide sequence of shallot virus X RNA reveals a 5'-proximal cistron closely related to those of potexviruses and a unique arrangement of the 3'-proximal cistrons. *J. Gen. Virol.* 73: 2553-2560.

- Lee, E. T., Koo, B. J., Jung, J. H., Chang, M. U., Kang, S. G.** (2007): Detection of Allexiviruses in the Garlic Plants in Korea. *Plant Pathol. J.* 23(4): 266-271.
- Majumder, S., Arya, M., Pant, R.P.** (2008): Shallot virus X in Indian shallot, a new virus report for India. *Plant Pathol.* 57(2):396.
- Martelli, G. P., Adams, M. J., Kreuze, J. F., Dolja, V. V.** (2007): Family *Flexiviridae*: A Case Study in Virion and Genome Plasticity. *Annu. Rev. Phytopathol.* 45: 73-100.
- Melo Filho, P. de A., Nagata, T., Dusi, A. N., Buso, J. A., Torres, A. C., Eiras, M., Resende, R. de O.** (2004): Detection of three *Allexivirus* species infecting garlic in Brazil. *Pesq. agropec. bras., Brasília* 39(8): 735-740.
- Park, K. S., Bae, Y. J., Jung, E. J., Kang, S. J.** (2005): RT-PCR-based detection of six garlic viruses and their phylogenetic relationships. *J. Microbiol. Biotechnol.* 15: 1110-1114.
- Pearson, M. N., Clover, G. R. G., Guy, P. L., Fletcher, J. D., van der Vlugt, R. A. A.** (2006): A review of the plant virus, viroid and mollicute records for New Zealand. *Australian Plant Pathol.* 35: 217-252.
- Perez-Egusquiza, Z., Ward, L. I., Clover, G. R. G., Fletcher, J. D., van der Vlugt, R. A. A.** (2008): First report of *Shallot virus X* in shallot in New Zealand (<http://www.bspp.org.uk/ndr/jan2009/2008-72.asp> [Verified 20 June 2009]).
- Ryabov, E. V., Generozov, E. V., Vetten, H. J., Zavriev, S. K.** (1996): Analysis of the 3'-region of the mite born filamentous virus genome testifies its relation to the shallot virus X group. *Mol. Biol. (Moskva)* 30: 103-110.
- Shahraeen, N., Lesemann, D. E., Ghotbi, T.** (2008): Survey for viruses infecting onion, garlic and leek crops in Iran. *Bulletin OEPP/EPPO* 38: 131-135.
- Song, S. I., Song, J. T., Kim, Ch. H., Lee, J. S., Choi, Y. D.** (1998): Molecular characterization of the garlic virus X genome. *J. Gen. Virol.* 79: 155-159.
- Sumi, S., Matsumi, T., Tsuneyoshi, T.** (1999): Complete nucleotide sequences of garlic viruses A and C, members of the newly ratified genus *Allexivirus*. *Arch Virol* 144: 1819-1826.
- Sumi, S., Tsuneyoshi, T., Furutani, H.** (1993): Novel rod-shaped viruses isolated from garlic, *Allium sativum*, possessing a unique genome organization. *J. Gen. Virol.* 74: 1879-1885.
- Takaichi, M., Nagakubo, T., and Oeda, K.** (2001): Mixed virus infections of garlic determined by a multivalent polyclonal antiserum and virus effects on disease symptoms. *Plant Dis.* 85:71-75.
- Tsuneyoshi, T., Mitsumi, T., Natsuaki, K. T., Sumi, S.** (1998): Nucleotide sequence analysis of virus isolates indicates the presence of three potyvirus species in *Allium* plants. *Arch Virol.* 143(1):97-113.
- Van Dijk, P.** (1994): Virus diseases of *Allium* species and prospects for their control. *Acta Horticulture* 358: 299-305.
- Van Regenmortel, M. H. V., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Carstens, E. B., Estes, M. K., Lemon, S. M., Maniloff, J., Mayo, M. A., McGeoch, D. J., Oringale, C. R., Wickner, R. B.** (eds) (2000): Virus taxonomy: Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, London, San Diego, USA.

- Vishnichenko, V. K., Konareva, T. N., Zavriev, S. K.** (1993): A new filamentous virus in shallot. *Plant Pathol.* 42: 121-126.
- Ward, L. I., Perez-Egusquiza, Z., Fletcher, D., Clover, G. R. G.** (2009): A survey of viral diseases of *Allium* crops in New Zealand. *Australasian Plant Pathology* 38: 533-539.
- Yamashita, K., Sakai, J., Hanada, K.** (1996): Characterization of a new virus from garlic (*Allium sativum* L.), garlic mite-borne virus. *Ann Phytopathol Soc Jpn* 62: 483-489.

7. Seznam použitých zkratk

DNA	deoxyribonukleová kyselina, <i>deoxyribonucleic acid</i>
(+)ssRNA	pozitivní jednořetězcová RNA, <i>single-stranded RNA</i>
bp	páry bází, <i>base pairs</i>
cDNA	komplementární DNA
CP	plášťový protein
dEPC	diethylpyrokarbonát
dNTP	dinukleotidtrifosfát
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
f primer	přímý primer, <i>forward primer</i>
GarMbFV	<i>Garlic mite-borne filamentous virus</i>
GarV-A	<i>Garlic virus A</i>
GarV-B	<i>Garlic virus B</i>
GarV-C	<i>Garlic virus C</i>
GarV-D	<i>Garlic virus D</i>
GarV-E	<i>Garlic virus E</i>
GarV-X	<i>Garlic virus X</i>
ICTV	the International Committee on Taxonomy of Viruses
ICTVdB	the International Committee on Taxonomy of Viruses database
kb	kilobáze
kDa	kilodaltony
LYSV	<i>Leek yellow stripe virus</i>
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nm	nanometry
nt	nukleotid(y)
ORF	(otevřený) čtecí rámec, <i>open reading frame</i>
OYDV	Onion yellow dwarf virus
PCR	polymerázová řetězová reakce, <i>polymerase chain reaction</i>
r primer	zpětný primer, <i>reverse primer</i>
RdRp	RNA dependentní RNA polymerasa
RNA	ribonukleová kyselina, <i>ribonucleic acid</i>
RT	reverzní transkripce, <i>reverse transcription</i>
ShV-X	<i>Shallot virus X</i>
TGB	triple gene block
UV	ultrafialové, ultra-violet
VÚRV	Výzkumný ústav rostlinné výroby

8. Přílohy

Složení roztoků

5x TAE pufr

- Tris.....24,2 g
 - ledová kyselina octová.....5,71 ml
 - 0,5 M EDTA.....10 ml
- pH 8,0 (upravit kyselinou octovou)
doplnit vodou do 1000 ml