

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2010

Vanda Trusínová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Charakteristika izolátů viru semenem
přenosné mozaiky hrachu (PSbMV)
s důrazem na genetickou variabilitu
atypických zástupců.**

Bakalářská práce

Vanda Trusínová

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie
Forma studia: Prezenční

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou bakalářskou práci napsala samostatně, s pomocí vedoucí bakalářské práce Mgr. Dany Šafářové Ph.D a výhradně s použitím citovaných materiálů.

V Olomouci dne

Podpis

Poděkování

Děkuji Mgr. Daně Šafářové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a připomínky, které mi pomohly při zpracování bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat všem, kteří mi pomáhali při mé práci v laboratoři, za jejich vstřícnost a ochotu poradit.

Souhrn

Pea seed-borne mosaic virus (PSbMV) je rostlinný virus, který náleží do rodu *Potyvirus* a čeledi *Potyviridae*. Poprvé byl popsán v roce 1966 dr. Musilem v bývalém Československu a dnes je pravděpodobně rozšířen celosvětově. PSbMV je ekonomicky významný patogen, protože způsobuje snížení kvality a výnosu u hospodářsky důležitých plodin čeledi *Fabaceae*. Virus se přenáší infikovanými semeny, mšicemi či mechanickou inokulací. PSbMV je +ssRNA neobalený virus o typické velikosti 770 nm. Genom viru kóduje jeden polyprotein, který je členěn na 10 oblastí: P1-Pro, HC-Pro, P3, 6K1, CI, 6K2, NIa-VPg, NIa-Pro, NIb a CP.

Izoláty viru byly na základě jejich neschopnosti infikovat konkrétní genotypy hrachu setého seskupeny do čtyř patotypů: P-1, P-2, P-3 a P-4. U rostlin byly objeveny geny rezistence *sbm-1*, *sbm-2*, *sbm-3* a *sbm-4*, které zajišťují rezistenci vůči čtyřem předchozím patotypům.

V experimentální části jsem se zabývala detekcí a charakterizací vybraných oblastí genomu viru *Pea seed-borne mosaic virus*: P1, HC-Pro, CI a NIa/NIb.

Byla potvrzena vhodnost navržených kombinací primerů PSbMVP1F / PSbMVP1R1407 pro P1 oblast, PSBMVHCProF / PSBMVHCProR pro HC-Pro oblast, PSbMVCIF3863 / PSbMVCIR6057 pro CI oblast a PSbMVVPgR(f)6619 / PSbNIbR pro NIa/NIb oblast pro detekce daných oblastí.

Ze sekvencí jednotlivých oblastí genomu českého izolátu PSB117CZ a izolátů 194, 204 a 262 byla provedena analýza podobnosti. Nejvyšší podobnost vykazovaly izoláty k izolátu DPD1 (95-99 %) patotypu P-1. Nižší podobnost (78-87 %) pak vykazovaly izoláty s izolátem L-1 patotypu P-2. Zkoumané izoláty vykazovaly 81% podobnost v P1 oblasti s izolátem S6 patotypu P-4, 71-72% podobnost v HC-Pro oblasti s izolátem NY patotypu P-4 a 81-82% podobnost v oblasti NIa/NIb s izolátem NY patotypu P-4.

Neighbor-joining analýza P1, HC-Pro a NIa/NIb oblastí tuto situaci potvrdila, nejvyšší fylogenetickou příbuznost vykazoval izolát 262 s typickým českým izolátem PSB117CZ a izolát 194 s izolátem 204. Byla prokázána homologie nukleotidových i aminokyselinových sekvencí P1, HC-Pro a NIa/NIb oblastí izolátů 194, 204, 262 a PSB117CZ s izolátem DPD1 (patotyp P-1).

Summary

Pea seed-borne mosaic virus (PSbMV) is a plant virus which belongs to the genus *Potyvirus* and family *Potyviridae*. It was first described in 1966 by Dr. Musil in the former Czechoslovakia and today is probably widespread throughout the world. PSbMV is an economically important pathogen because it causes a decrease in the quality and yield of economically important crops of the family *Fabaceae*. The virus is transmitted through infected seeds, aphids or mechanical inoculation. PSbMV is uncoated + ssRNA virus of the typical size of 770 nm. Virus genome, coding one polyprotein, is divided into 10 areas: P1-Pro, HC-Pro, P3, 6K1, CI, 6K2, VGP-NIa, NIa-Pro, NIb and CP.

Description of the existence of resistance genes among different pea lines, i.e. *sbm-1*, *sbm-2*, *sbm-3* and *sbm-4*, allowed discrimination of virus isolates into four pathotypes P-1, P-2, P-3 and P-4 based on their ability to overcome corresponding genes.

In experimental part of thesis, I was concerned on detection and characterization of selected genome regions of the selected *Pea seed-borne mosaic virus* isolates: the P1, HC-Pro, CI and NIa/NIb.

The detectional usability of the combination of newly designed primers PSbMVP1F / PSbMVP1R1407 for the P1 region, PSBMVHCProF / PSBMVHCProR for the HC-Pro region, PSbMVCIF3863 / PSbMVCIR6057 for the CI region and PSbMVVPgR(f)6619 / PSbNIbR for the NIa/NIb region was confirmed.

Sequences from different regions of the genome of Czech isolate PSB117CZ and isolates 194, 204 and 262 were analyzed for identity. Isolates showed the highest identity with isolate DPD1 (95-99%), pathotype P-1; lower identity (78-87 %) with isolate L-1, pathotype P-2. Examined isolates showed 81% identity in the P1 region with the isolate S-6, pathotype P-4, 71-72% identity in the HC-Pro with the isolate NY, pathotype P-4 and 81-82% identity in the NIa / NIb with the isolate NY, pathotype P-4.

Neighbor-Joining analysis of the regions P1, HC-Pro and NIa/NIb confirmed this situation, the closest phylogenetic relationships were detected among the isolate 262 and the typical Czech isolate PSB117CZ, as well as isolate 194 and the isolate 204 was showed. Significant homology of isolates 194, 204, 262 and PSB117CZ with DPD1 isolate based on analyse of nucleotide and amino acid sequences of regions P1, HC-Pro and NIa/NIb (pathotype P-1) was showed too.

Obsah

1. Úvod	9
2. Cíle práce	10
3. <i>Pea seed-borne mosaic virus</i> (PSbMV)	11
3.1 Taxonomické zařazení PSbMV	11
3.2 Geografické rozšíření PSbMV	11
3.3 Biologické vlastnosti PSbMV	12
3.3.1 Příznaky choroby na rostlinách	12
3.3.2 Hostitelé PSbMV	15
3.3.3 Přenos PSbMV	16
3.3.4 Průběh infekce	17
3.4 Molekulární vlastnosti	18
3.4.1 Charakteristika virionů PSbMV	18
3.4.1.1 Morfologie virionů PSbMV	18
3.4.1.2 Fyzikálně-chemické vlastnosti	19
3.4.1.3 Nukleová kyselina	19
3.4.1.4 Proteiny	19
3.4.1.5 Lipidy	19
3.5 Genom PSbMV	19
3.5.1 Jednotlivé oblasti genomu PSbMV	20
3.5.1.1 CP oblast	21
3.5.1.2 HC-Pro oblast	21
3.5.1.3 P3-6k1 oblast	21
3.5.1.4 VPg oblast	21
3.6 Patotypy PSbMV	22
3.6.1 Patotyp P-1	23
3.6.2 Patotyp P-2	23
3.6.3 Patotyp P-3	24
3.6.4 Patotyp P-4	24
3.6.6 Patotypy U-1 a U-2	24

3.7	Geny rezistence u hrachu setého vůči PSbMV	25
3.7.1	Gen rezistence <i>sbm-1</i>	25
3.7.2	Gen rezistence <i>sbm-2</i>	25
3.7.3	Gen rezistence <i>sbm-3</i>	26
3.7.4	Gen rezistence <i>sbm-4</i>	26
3.8	Ekonomický význam PSbMV	26
3.9	Detekce a identifikace PSbMV	27
4	<i>Experimentální část</i>	28
4.1	Materiál a metody	28
4.1.1	Biologický materiál	28
4.1.2	Izolace celkové RNA	28
4.1.3	Reverzní transkripce (RT)	28
4.1.4	Polymerázová řetězová reakce (PCR)	29
4.1.4.1	Reakční směs pro PCR amplifikace	29
4.1.4.2	Podmínky PCR reakce	30
4.1.4.3	Vyhodnocení PCR produktů	30
4.1.5	Klonování a sekvencování	30
4.1.6	Fylogenetická analýza	31
4.2	Výsledky	32
4.2.1	P1 oblast	33
4.2.2	HC-Pro oblast	35
4.2.3	CI oblast	37
4.2.4	NIa/NIb oblast	38
5	<i>Diskuze</i>	41
6	<i>Závěr</i>	43
7	<i>Seznam použité literatury</i>	45
7.1	Použité internetové zdroje	49
8	<i>Seznam použitých zkratk a symbolů</i>	50
9	<i>Přílohy</i>	52
9.1	Složení roztoků	52
9.2	Příprava 2% agarózy	52

1 Úvod

Hospodářsky významné rostliny jsou neustále vystavovány tlakům vnějšího prostředí a napadány množstvím různých mikroorganismů, z nichž důležitou skupinou jsou viry.

Významnou skupinou rostlinných virů je čeleď *Potyviridae*, rod *Potyvirus*. Mezi viry je rod *Potyvirus* největší a představuje přibližně 30 % známých patogenů rostlinných virů. Významným zástupcem rodu *Potyvirus* je *Pea seed-borne mosaic virus* (PSbMV).

Pea seed-borne mosaic virus byl poprvé popsán v Československu v roce 1966. PSbMV způsobuje choroby u hospodářsky významných rostlin z čeledi *Fabaceae*, kdy zejména u hrachu, čočky, bobu a cizrny způsobuje snižování kvality a výnosu luštěnin.

2 *Cíle práce*

- Cílem mé bakalářské práce je vypracovat literární rešerši na téma Charakteristika izolátů viru semenem přenosné mozaiky hrachu (PSbMV), s důrazem na jejich genetickou variabilitu a biologické vlastnosti.
- Detekovat a charakterizovat vybrané části genomu studovaných atypických izolátů PSbMV.

3 *Pea seed-borne mosaic virus (PSbMV)*

3.1 Taxonomické zařazení PSbMV

Pea seed-borne mosaic virus (virus semenem přenosné mozaiky hrachu, PSbMV) je řazen do čeledi *Potyviriidae* a rodu *Potyvirus* (Jones a kol., 1998; Johansen a kol., 1991; Johansen a kol., 2001; Fauquet a kol., 2005). Rod *Potyvirus* je mezi viry největší (Timmerman a kol., 1990), zahrnuje přibližně 30 % všech dosud známých rostlinných virů (Borgstrom a Johansen, 2001).

Pro označení viru semenem přenosné mozaiky hrachu se používají také další názvy jako např. *Pea fizzle top virus* (Hampton, 1969), *Pea leaf rolling virus* (Musil, 1966), *Pea leaf roll mosaic virus* (Bos, 1970), *Pea leaf rolling mosaic virus*, *Seed-borne virus of pea* (Mink a kol., 1969) a *New seed-borne virus of pea* (Stevenson a Hagedorn, 1969) (Khetarpal a Maury, 1987). Tato starší, dnes již neplatná synonyma, vznikla na základě příznaků pozorovaných u infikovaných rostlin, způsobu přenosu viru a délce virových částic (Khetarpal a Maury, 1987; Plant Viruses Online, 1996).

3.2 Geografické rozšíření PSbMV

Pea seed-borne mosaic virus byl poprvé popsán dr. Musilem v bývalém Československu v roce 1966 na rostlinách hrachu setého (*Pisum sativum*). Pojmenoval jej *Pea leaf rolling virus* (Musil, 1966).

Pea seed-borne mosaic virus byl popsán v Japonsku v roce 1967 (Inouye, 1967), v západním Německu (Thottappilly a Schmutter, 1968), ve Spojených státech amerických – v Oregonu (Hampton, 1969), ve Washingtonu (Mink a kol., 1969) a ve Wisconsinu (Stevenson a Hagedorn, 1969). Dále byl virus popsán v Nizozemsku (Bos, 1970), v Kanadě (Zimmer a Ali-Khan, 1976), Švédsku (Lindsten a kol., 1976), bývalé Jugoslávii (Milicic a Grbelja, 1977), Polsku (Kowalska, 1979), Švýcarsku (Pelet, 1980), Novém Zélandu (Fry a Young, 1980), UK (Matthews a kol., 1981) a Indii (Thakur a kol., 1984). V letech 1987-1992 byl prokázán výskyt PSbMV na Novém Zélandu (Fletcher, 1993). V roce 1995 byla potvrzena přítomnost viru v Pákistánu (Ali a Randles, 1997) a v Jordánsku (Mabrouk a Mansour, 1998). Abraham a kol. (2000) prokázali výskyt viru PSbMV na rostlinách bobu obecného (*Vicia faba* L.) v Etiopii.

Dnes je *Pea seed-borne mosaic virus* pravděpodobně rozšířen po celém světě, což je spojováno především se způsobem jeho přenosu, výměnou genetického materiálu a importem nebo exportem infikovaných semen prostřednictvím mezinárodního obchodu (Ali a Randles, 1997; Grünwald a kol., 2004).

To, že se virus dostává z jedné země do druhé prostřednictvím mezinárodního obchodu s infikovanými semeny, potvrdili např. Aftab a Freeman (2006), kteří zjistili, že byl do Švédska importován právě v materiálech pocházejících z Austrálie. V tomtéž roce byl PSbMV v Austrálii poprvé popsán ve sbírce genových zdrojů (Torok a Randles, 2007).

Za účelem potvrzení údajů o virových infekcích hrachu v České republice v sedmdesátých a osmdesátých letech minulého století byl proveden v letech 2003-2005 průzkum na porostech hrachu v pěti pěstitelsky významných lokalitách České republiky. Piáková a kolektiv (2006) zjišťovali výskyt a frekvenci nejvýznamnějších virových patogenů hrachu setého (*Pisum sativum* L.). Potvrdili dřívější nálezy, v analyzovaném materiálu byl detekován *Pea seed-borne mosaic virus* (virus semenem přenosné mozaiky hrachu, PSbMV), *Pea enation mosaic virus* (virus výrůstkové mozaiky hrachu, PEMV) a v malé míře *Bean yellow mosaic virus* (virus žluté mozaiky fazolu, BYMV). Na rostlinách se často vyskytovaly směsné infekce, zejména kombinace PEMV s PSbMV. Z celkového počtu 422 odebraných vzorků bylo sérologicky identifikováno 99 vzorků PEMV (42,86 % z celkového počtu pozitivních rostlin), 125 vzorků PSbMV (54,11 % z celkového počtu pozitivních rostlin) a 7 vzorků BYMV (3,03 % z celkového počtu pozitivních rostlin).

3.3 Biologické vlastnosti

3.3.1 Příznaky choroby na rostlinách

U různých druhů a kultivarů rostlin se infekce virem *Pea seed-borne mosaic virus* projevuje různě. Někdy se příznaky choroby nemusí projevit, popřípadě se mohou projevovat jen velmi mírně v podobě mozaiky (Plant Viruses Online, 2006).

Některé znaky napadení virem jsou společné pro všechny hostitelské rostliny a některé jsou pro určité druhy rostlin specifické.

- Charakteristickým projevem napadení hrachu setého (*Pisum sativum* L.) virem semenem přenosné mozaiky hrachu je nápadné svinování okrajů (viz. Obr.1), tvorba listové mozaiky (viz. Obr.2), prosvětlování listových žilek, tvorba zkrácených internodií a různý stupeň zakrslosti rostliny (viz. Obr.3). U napadených rostlin dochází k pozdějšímu kvetení, květy jsou často deformované, mohou ale vykvést za vzniku deformovaných lusků. Vývoj semen v luscích může být nerovnoměrný, mohou dozrát pouze jedno nebo dvě semena (Plant Viruses Online, 2006). Často také dochází k nekróze osemení za vzniku patrných proužků (viz. Obr.4), redukuje se i velikost a váha semen, což má za následek snížení výnosu a kvality semen (Frew a kol., 2002; Plant Viruses Online, 2006; Torok a Randles, 2007).
- Na listech fazolu obecného (*Phaseolus vulgaris* L.) se objevují tmavě a světle hnědé skvrny. Čepel listu je redukována. Na semenech infikovaných rostlin se vyskytují hnědé kroužky (viz. Obr.5) a jejich velikost je vzhledem k semenům zdravých rostlin redukována (Aftab a Freeman, 2006).
- U cizrny beraní (*Cicer arietinum* L.) se infekce virem projevuje žloutnutím nových výhonků a nově vyrůstající rostlinka je zakrslého vzrůstu. Typická je tvorba listové mozaiky a svinování listů (Aftab a Freeman, 2006).
- U čočky kuchyňské (*Lens culinaris* L.) jsou infikované rostliny zakrslé a nové výhonky jsou postižené slabou chlorózou, listy bývají malformované. Na špičkách listů bývá viditelná postupující nekróza (Aftab a Freeman, 2006; Hampton, 1982).

V závislosti na vlastní hostitelské rostlině, jejím kultivaru, a na typu virového izolátu může být rozsah a intenzita příznaků dosti variabilní.



Obr. 1: Svinutka na listech hrachu setého (*Pisum sativum* L.)



Obr. 2: Mozaika na listech hrachu setého (*Pisum sativum* L.)



Obr. 3: Zakrslost u rostliny hrachu setého (*Pisum sativum* L.) způsobená virem PSbMV (vlevo na obrázku: zdravá rostlina; vpravo na obrázku: infikovaná rostlina)



Obr. 4: PSbMV na semenech hrachu (převzato z Aftab a Freeman, 2006)



Obr. 5: PSbMV na semenech fazolu (převzato z Aftab a Freeman, 2006)

3.3.2 Hostitelé PSbMV

Pea seed-borne mosaic virus napadá širokou škálu rostlin. Aapola a jeho kolektiv v roce 1974 publikovali, že virus PSbMV infikuje 47 druhů rostlin z 12 čeledí (Aapola a kol., 1974).

Pea seed-borne mosaic virus přirozeně napadá zástupce čeledi *Fabaceae*, nejvýznamnějšími hostiteli jsou hospodářsky důležité plodiny, jako např.:

Lens culinaris L. (čočka kuchyňská)

Pisum sativum L. (hrách setý)

Cicer arietinum L. (cizrna beraní)

Vicia faba L. (bob obecný);

ale i další rostliny jako např. *Lathyrus odoratus* (hrachor vonný) (ICTVdB Management, 2006).

U dalších čeledí, které zahrnují vnímavé druhy rostlin, se PSbMV vyskytuje pouze experimentálně, přirozeně se u nich nevyskytuje. Jsou to čeledi:

Amaranthaceae – laskavcovité

Apocynaceae – toješťovité (*Catharanthus roseus* - barvínek růžový)

Chenopodiaceae – merlíkovité (*Beta vulgaris* L. – řepa obecná, *Chenopodium album* – merlík bílý)

Asteraceae – hvězdnicovité

Brassicaceae – brukvovité (*Brassica campestris* ssp. *Pekinensis* - Pekingské zelí, *Brassica oleracea* var. *Capitata* - zelí hlávkové, *Brassica oleracea* var. *Gemmifera* - kapusta růžičková)

Cucurbitaceae – tykvovité (*Cucurbita maxima* - tykev obrovská)

Solanaceae – lilkovité

Tetragoniaceae – čtyřbočovité (*Tetragonia tetragonioides* – Čtyřboč rozložitá) (ICTVdB Management, 2006; <http://www.biolib.cz>).

3.3.3 Přenos PSbMV

U viru semenem přenosné mozaiky hrachu známe tři různé způsoby přenosu z infikované rostliny na rostlinu zdravou.

- Prvním způsobem přenosu PSbMV je neperzistentní vektorový přenos prostřednictvím mšic, jako vektorů byli identifikováni *Acyrtosiphon pelargoni*, *Acyrtosiphon pisum* (viz. Obr.6,7), *Acyrtosiphon sesbaniae*, *Aphis craccivora*, *Aphis fabae*, *Aphis gossypii*, *Aphis nasturtii*, *Aulacorthum circumflexum*, *Aulacorthum solani*, *Brevicoryne brassicae*, *Cryptomyzus ribis*, *Dactynotus escalantii*, *Macrosiphum avenae*, *Macrosiphum euphorbiae*, *Macrosiphum pisi*, *Macrosiphum rosae*, *Metopolophium dirhodum*, *Myzus persicae*, *Ovatus crataegarius*, *Phorodon cannabis*, *Rhopalosiphum padi* a *Semiaphis dauci* (ICTVdB Management, 2006; Plant Viruses Online, 1996).
- Další způsob přenosu PSbMV je přenos prostřednictvím infikovaných semen. Tento přenos je závislý na symplastickém transportu virionů z infikovaných mateřských buněk do embrya (Roberts a kol., 2003). Přenos PSbMV infikovanými semeny byl prokázán u hrachu setého, čočky kuchyňské a fazolu obecného, naopak u cizrný beraní semeny přenosný není (Hampton a Mink, 1975).



Obr. 6: Mšice kyjatka hrachová (*Acyrtosiphon pisum*)

(převzato z
<http://canadianbiodiversity.mcgill.ca/english/species/insects/insectpages/aphididae.htm>)



Obr. 7: Kyjatka hrachová (*Acyrtosiphon pisum*) na listech hrachu setého

(převzato z
<http://www.inra.fr/hyppz/RAVAGEUR/6acypis.htm>)

Frekvence přenosu závisí jak na genotypu hostitele, tak na genotypu virového izolátu, a může se pohybovat v rozmezí od 0 % do téměř 100 % (Johansen a kol., 1996). Přenos semenem má kvantitativní charakter, jeho frekvence nekoreluje s hromaděním virů ve vegetativních tkáních. Je prokázáno, že 5' konec genomu viru PSbMV o délce 2,5 kb má hlavní vliv na míru přenosu semenem (Johansen a kol., 1996).

- Třetí způsob přenosu PSbMV se děje prostřednictvím mechanické inokulace (ICTVdB Management, 2006), která se běžně provádí v laboratorních podmínkách za účelem udržování a manipulace s virovými izoláty, kdy se mechanicky naruší povrch listu rostliny a poté se na takto rozrušenou tkáň inokuluje vir.

3.3.4 Průběh infekce

Pro vznik infekce potřebuje *Pea seed-borne mosaic virus*, stejně jako i ostatní potyviry, realizaci tří kompletních klíčových kroků, ke kterým dochází uvnitř rostliny. Prvním krokem je amplifikace genomu viru uvnitř napadené rostlinné buňky, druhým krokem je pohyb z buňky do buňky a třetím krokem je transport virionů viru na dlouhou vzdálenost. Všechny tři kroky mohou být ovlivněny mechanismy recesivní rezistence (Borgstrom a Johansen, 2001).

3.4 Molekulární vlastnosti

3.4.1 Charakteristika virionů PSbMV

Pea seed-borne mosaic virus se identifikuje z rostlinné šťávy získané z listu, která obsahuje viriony PSbMV. Viriony byly dále nalezeny v kořenovém parenchymu a mezofylu a také v cytoplazmě (Plant Viruses Online, 1996).

3.4.1.1 Morfologie virionů PSbMV

Viriony viru *Pea seed-borne mosaic virus* se skládají z kapsidy, uvnitř které je uzavřena RNA (viz. Obr.8). PSbMV patří mezi neobalené viry, což znamená, že kapsida tvořená plášťovým proteinem viru nemá obal.

Nukleokapsida je protáhlého tvaru se spirálovitou symetrií. Viriony PSbMV jsou vláknité a pružné (viz. Obr.9). Typická délka virionů je 770 nm a šířka 12 nm. Axiální kanálek není zřetelný. Rozteč šroubovice je 3,4 nm (ICTVdB Management, 2006).



Obr. 8: Schéma virionu PSbMV

(převzato z http://www.expasy.org/viralzone/all_by_protein/50.html)



Obr. 9: Viriony viru PSbMV

(převzato z Plant Viruses Online, 1996)

3.4.1.2 Fyzikálně-chemické vlastnosti

Viriony PSbMV mají vznášivou hustotu v gradientu CsCl $1,329 \text{ g.cm}^{-3}$ a jejich sedimentační koeficient je $154 \text{ S}_{20\text{w}}$. Purifikované viriony sedimentují jako jednočásticové (ICTVdB Management, 2006).

Teplota, při které dochází k inaktivaci virionů viru semenem přenosné mozaiky hrachu neboli TIP (thermal inactivating point) je 55°C . Životnost virionů v podmínkách *in vitro* (LIV) je 1 den v listech a 4 dny v kořenech (ICTVdB Management, 2006).

3.4.1.3 Nukleová kyselina

Pea seed-borne mosaic virus obsahuje ve své kapsidě jednovláknovou molekulu RNA, která představuje 5,3 % z celkové hmotnosti virionu PSbMV. V molekule RNA jsou zastoupeny jednotlivé báze v poměru 22,8 % guaninu (G), 44 % adeninu (A), 17,6 % cytosinu (C) a 15,6 % uracilu (U) (ICTVdB Management, 2006).

3.4.1.4 Proteiny

Proteiny, strukturního i nestrukturního charakteru, představují přibližně 94 % z celkové hmotnosti virionu PSbMV (ICTVdB Management, 2006).

3.4.1.5 Lipidy

Ve virionech PSbMV nebyly nalezeny žádné lipidy (ICTVdB Management, 2006).

3.5 Genom PSbMV

Pea seed-borne mosaic virus obsahuje ve své kapsidě molekulu RNA. Ta je lineární, jednovláknová a pozitivně orientovaná, jedná se o tzv. +ssRNA (Johansen a kol., 1991; Wang a Maule, 1994). Kompletní nukleotidová sekvence genomu PSbMV byla stanovena z klonované virové cDNA a přímým sekvenováním virové RNA (Johansen a kol., 1991).

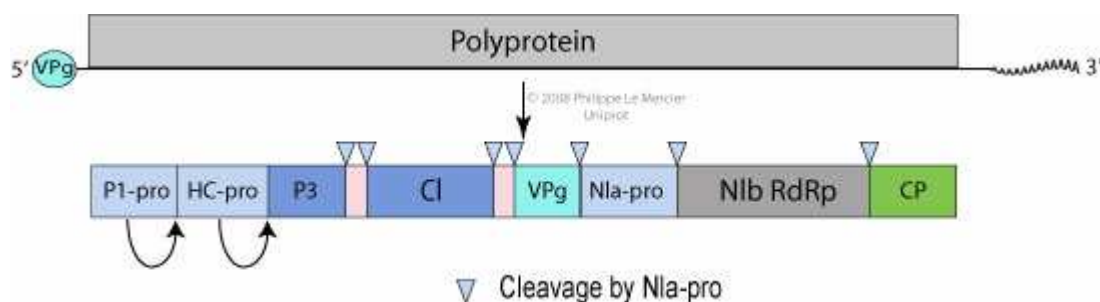
Analýza typového izolátu DPD1 ukázala, že genom, stejně jako u ostatních potyvirů, je nedělený a dlouhý přibližně 10 000 nukleotidů (Johansen a kol., 1991; Plant Viruses Online, 1996; Fauquet a kol., 2005; ICTVdB Management, 2006) a tvoří jeden jednoduchý čtecí rámec (open reading frame, ORF) kódující jeden polyprotein (Olsen a Johansen, 2001). Genom viru je na svém 5' konci zakončen vedoucí sekvencí o 143 nukleotidech a na svém 3' konci je zakončen oblastí o 163 nukleotidech (Johansen a kol., 1991).

Primárním produktem genomu PSbMV je polyprotein o délce 3198 aminokyselin s předpokládanou molekulární hmotností $M_r = 363\,537$. Tento polyprotein je posléze proteolyticky štěpen za vzniku 8-10 zralých virových proteinů (Timmerman a kol., 1990). Štěpení se děje pomocí tří virem kódovaných proteáz (Johansen a kol., 2001). Tyto proteázy jsou P1 proteáza, 'helper-component' proteáza (HC-Pro) a 49-kDa proteáza (49k-Pro) (Dougherty a Semler, 1993). Kodon, který iniciuje translaci je na počátku genomu, v blízkosti 5' konce RNA vlákna (Timmerman a kol., 1990).

Na 5' konci molekuly RNA je fosfodiesterovou vazbou přes tyrosinový zbytek navázán virem kódovaný protein VPg (Keller a kol., 1998) a 3' konec molekuly RNA je zakončen poly-A sekvencí (Timmerman a kol., 1990; Johansen a kol., 1991; Nicolaisen a kol., 1992; Keller a kol., 1998).

3.5.1 Jednotlivé oblasti genomu PSbMV

Pea seed-borne mosaic virus kóduje jediný polyprotein, který je štípán třemi virem kódovanými proteázami na funkční proteiny (Timmerman a kol., 1990). Takto je genom PSbMV, stejně jako u ostatních potyvirů, členěn na 10 oblastí: P1-Pro, HC-Pro, P3, 6K1, CI, 6K2, NIa-VPg, NIa-Pro, NIb a CP (Andersen a Johansen, 1998) (viz Obr. 10).



Obr. 10: Schéma genomu potyvirů
(převzato z http://www.expasy.org/viralzone/all_by_protein/50.html)

3.5.1.1 CP oblast

Tato oblast kóduje plášťový protein (coat protein), který v genomu začíná syntézou aminokyseliny alanin (Timmerman a kol., 1990).

Tento protein je nutný pro pohyb virionů z buňky do buňky a pohyb na dlouhé vzdálenosti (Dolja a kol., 1994; Andersen a Johansen, 1998).

3.5.1.2 HC-Pro oblast

HC-Pro kódující sekvence je u izolátu DPD1 dlouhá 1292 nukleotidů a v nukleotidové sekvenci je výrazně variabilnější než oblast plášťového proteinu (CP oblast) (Torok a Randles, 2007). HC-Pro protein je multifunkční, umožňuje pohyb virionu na dlouhou vzdálenost v hostiteli specifickým způsobem, je potřebný pro přenos mšicemi, ovlivňuje také replikaci virionů uvnitř buňky (Andersen a Johansen, 1998). Helper component proteináza (HC-Pro) je hlavní determinantou přenosu prostřednictvím semen (Johansen a kol., 1996) a je také supresorem RNA umlčování (Savenkov a Valkonen, 2002).

3.5.1.3 P3-6k1 oblast

P3-6k1 je oblast hrající rozhodující roli v replikaci viru nebo v pohybu z buňky do buňky (Johansen a kol., 2001). V oblasti kódující P3-6k1 proteinu viru PSbMV byly nalezeny virové determinanty virulence. P3-6k1 cistron je nezbytný pro vznik infekce (Hjulsager a kol., 2006).

3.5.1.4 VPg oblast

VPg protein byl identifikován jako specifická hostitelská patogenní determinanta recesivní rezistence hrající významnou roli ve virové amplifikaci, pohybu virionů z buňky do buňky (cell to cell movement) a pohybu virionů na dlouhé vzdálenosti (Borgstrom a Johansen, 2001; Johansen a kol., 2001). Virová amplifikace závisí na interakci mezi VPg proteinem a faktorem hostitele (Borgstrom a Johansen, 2001).

3.6 Patotypy PSbMV

Izoláty viru semenem přenosné mozaiky hrachu byly na základě jejich neschopnosti infikovat konkrétní genotypy hrachu setého seskupeny do čtyř patotypů: P-1, P-2, P-3 a P-4 (Alconero a kol., 1989; Hjulsager a kol., 2002; Hjulsager a kol., 2006). Jedná se o funkční rozřazení izolátů na základě jejich biologických vlastností, protože genetická rezistence vůči PSbMV v hrachu setém (*Pisum sativum* L.) je založena na čtyřech homozygotních recesivních genech: *sbm-1*, *sbm-2*, *sbm-3* a *sbm-4*. Kromě patotypů P-1, P-2, P-3 a P-4 byly popsány další atypické patotypy U-1, U-2, Pi a Pv, které nemohou být řazeny mezi předchozí čtyři patotypy (Torok a Randles, 2007).

Rostliny mohou nést geny rezistence *sbm-1*, *sbm-2*, *sbm-3* nebo *sbm-4*. Některé izoláty viru PSbMV nejsou schopny tyto geny rezistence překonávat, což má za následek odolnost rostliny nesoucí konkrétní geny rezistence vůči příslušným izolátům viru.

U hrachu setého byly selektovány čtyři kategorie hrachových genotypů, tzv. diferenciacní linie, umožňující biologickou patotypizaci izolátů (Provvidenti a Alconero, 1988; Johansen a kol., 2001; Hjulsager a kol., 2002) :

- kategorie A – rostliny hrachu nemají žádný z rezistentních genů, a proto jsou náchylné ke všem čtyřem virovým patotypům (všechny rostliny jsou vnímavé). Do této kategorie patří např. kultivary Fjord (Johansen a kol., 2001) a Brutus (Hjulsager a kol., 2006).
- kategorie B – rostliny hrachu jsou tzv. multirezistentní, což znamená, že rostliny nesou všechny čtyři geny rezistence a proto jsou odolné vůči všem čtyřem virovým patotypům. Do této kategorie patří např. kultivary/položky No. 8720 (PI 193586) a PLP 91A (PI 347492) (Johansen a kol., 2001).
- kategorie C – rostliny hrachu nesou geny rezistence *sbm-2* a *sbm-3*, a proto jsou odolné vůči virovým patotypům P-2 a P-3. Do kategorie C patří např. kultivary Bonneville (Johansen a kol., 2001; Hjulsager a kol., 2002) a Dark Skinned Perfection (Borgstrom a Johansen, 2001; Johansen a kol., 2001).

- kategorie D – rostliny hrachu nesou geny rezistence *sbm-1* a *sbm-2*, a proto jsou odolné vůči virovým patotypům P-1 a P-2. Do kategorie D jsou řazeny např. kultivary Aa134 (PI 269818) (Johansen a kol., 2001) a Sankia (PI 269774) (Johansen a kol., 2001; Hjulsager a kol., 2002).

3.6.1 Patotyp P-1

Tento patotyp není schopen překonat rezistenci rostlin hrachu zprostředkovanou genem rezistence *sbm-1*. Do tohoto patotypu jsou řazeny typové izoláty viru DPD1 (PSbMV-DPD1) (Borgstrom a Johansen, 2001; Olsen a Johansen, 2001) a US (PSbMV-US) (Ali a Randles, 1997). Izoláty tohoto patotypu jsou schopny infikovat např. linie hrachu PI 343305 a PLP 426 (PI 347422) (Provvidenti a Alconero, 1986).

Izolát PSbMV-DPD1 způsobuje typické dočasné prosvětlování žilek v listech, svinování listů a zkracování internodií (Johansen a kol., 1996).

3.6.2 Patotyp P-2

Patotyp P-2 není schopen překonat rezistenci způsobenou přítomností genů rezistence *sbm-2* a *sbm-3* u hrachu setého. U čočky kuchyňské je rezistence k tomuto patotypu způsobena genem rezistence *sbv* (Alconero a kol., 1986). K tomuto patotypu patří izolát L-1 (PSbMV-L) (Gao a kol., 2004).

L-1 vyvolává vážnější příznaky u čočky kuchyňské, zatímco mnoho kultivarů hrachu setého je odolných. U náchylných kultivarů hrachu, např. u kultivaru hrachu PI 343305 (Provvidenti a Alconero, 1986), způsobuje vážné příznaky choroby (Olsen a Johansen, 2001). Kultivary hrachu, které jsou rezistentní vůči *Bean yellow mosaic virus*, jsou také rezistentní vůči izolátu L-1. U hrachu setého, čočky kuchyňské a cizrný beraní způsobuje izolát L-1 vážnější symptomy než u izolátů patotypů P-1 a P-4 (Alconero a kol., 1986).

3.6.3 Patotyp P-3

Patotyp P-3 je schopen překonat rezistenci způsobenou přítomností genu rezistence *sbm-1*, ale nedokáže překonat rezistenci danou geny rezistence *sbm-2* a *sbm-3*. Tento infekční profil odlišuje patotyp P-3 od patotypů P-1, P-2 a P-4. Do patotypu P-3 patří izolát NEP-1, který byl izolován z bobu obecného *Vicia faba*) pocházejícího z Nepálu. Stejně jako patotyp P-2 neinfikuje izolát NEP-1 kultivary hrachu Bonneville a Dark Skinned Perfection, reprezentující kategorii C. Izolát NEP-1 infikuje linie hrachu setého Aa134 (PI 269818) a Sankia (PI 269774) (Hjulsager a kol., 2002).

3.6.4 Patotyp P-4

Patotyp P-4 není schopen překonat rezistenci rostliny způsobenou přítomností genu rezistence *sbm-4* u hrachu setého. K tomuto patotypu jsou řazeny izoláty NY (Johansen a kol., 1996; Olsen a Johansen, 2001) a S6 (Ali a Randles, 1997; Torok a Randles, 2007). Izoláty patotypu P-4 infikují např. kultivary hrachu Aa134 (PI 269818) a Sankia (PI 269774) (Provvidenti a Alconero, 1986).

U patotypu P-4 nejsou příznaky choroby tak vážné jako u patotypu P-1 (Alconero a kol., 1986). Typickým příznakem napadení hrachu virem patotypu P-4 je zkracování internodií, redukce růstu infikovaných rostlin (Johansen a kol., 1996). Příznaky choroby se projevují později než u P-1 patotypů (Alconero a kol., 1986).

3.6.6 Patotypy U-1 a U-2

Byly popsány i zvláštní izoláty s novými biologickými vlastnostmi, které nebylo možné zařadit mezi existující patotypy P-1, P-2, P-3 nebo P-4, protože překonávaly odlišné kombinace diferenciačních linií. Pro tyto atypické izoláty původem z Pákistánu autoři navrhli zařazení jako patotypy P-5 a P-6 (Ali a Randles, 1997; Ali a Randles, 2001).

3.7 Geny rezistence u hrachu setého vůči PSbMV

U rostlin bylo identifikováno velké množství přirozeně se vyskytujících dominantních a recesivních genů rezistence proti potyvirům, mechanismus jejich působení není prozatím vždy objasněn.

Eukaryotický iniciační translační faktor eIF4E a jeho isoforma eIF(iso)4E jsou proteiny v hostitelské rostlině, které se po napadení virem PSbMV váží na VPg oblast v jeho genomu (Borgstrom a Johansen, 2001).

Odolnost vůči PSbMV je podmíněna recesivně, čtyři recesivně založené geny hrachu setého *sbm-1*, *sbm-2*, *sbm-3* a *sbm-4* poskytují odolnost vůči čtyřem potyvirovým patotypům P-1, P-2, P-3 a P-4 (Provvidenti a Alconero, 1986).

3.7.1 Gen rezistence *sbm-1*

Gen *sbm-1* se u hrachu setého nachází na 6. chromozómu ve IV. vazbové skupině a poskytuje rostlinám rezistenci vůči patotypu P-1 PSbMV (Provvidenti a Alconero, 1988a, 1988b; Torok a Randles, 2007).

Gen *sbm-1* byl mapován na vazebných mapách hrachu setého s použitím metod RFLPs, RAPDs a AFLPs. Výsledkem byla identifikace RFLP markerů spojených s *sbm-1* genem v genetických vzdálenostech od 5 cM do 10 cM (Frew a kol., 2002). Podrobná analýza senzitivních a rezistentní genotypů hrachu vedla také k vytvoření specifických markerů na vycházejících z detekce jednonukleotidového polymorfismu (SNP), a k detekci mutací v eIF4e faktoru, které souvisejí s rezistencí rostlin hrachu vůči PSbMV (Smýkal a kol., 2010).

3.7.2 Gen rezistence *sbm-2*

Gen rezistence *sbm-2* poskytuje rezistenci vůči patotypu P-2. U hrachu se nachází na 2. chromozómu ve II. vazbové skupině (Provvidenti a Alconero, 1988a; Johansen a kol., 2001; Olsen a Johansen, 2001; Frew a kol., 2002; Torok a Randles, 2007).

Gen recesivní rezistence *sbm-2* u *Pisum sativum* slouží jako virová determinanta proti PSbMV a byla identifikována v kódující N-oblasti P3 proteinu (Hjulsager a kol., 2006).

3.7.3 Gen rezistence *sbm-3*

Rezistenci vůči patotypu P-2 poskytuje spolu s genem *sbm-2* také gen *sbm-3*. Gen *sbm-3* se nachází na 6. chromozómu ve IV. vazbové skupině u hrachu setého (Provvidenti a Alconero, 1988a, 1988b; Johansen a kol., 2001). Geny rezistence *sbm-2* a *sbm-3* není schopen překonat patotyp P-3 (Hjulsager a kol., 2002).

3.7.4 Gen rezistence *sbm-4*

Geny *sbm-4* se taktéž nachází u hrachu setého na 6. chromozómu ve IV. vazbové skupině a poskytuje rezistenci rostlin vůči patotypu P-4 (Provvidenti a Alconero, 1988a, 1988b).

3.8 Ekonomický význam PSbMV

Pea seed-borne mosaic virus je ekonomicky významný semenem přenosný potyvirus, který přirozeně infikuje luštěniny. Virus může způsobit vysoké ztráty v produkci a to hlavně v případě, pokud k infekci dojde prostřednictvím semen (Jones a kol., 1998). PSbMV býval dříve mylně považován za původce slabě se projevujících chorob, protože často způsoboval mírné příznaky choroby a malé ztráty ve výnosu. Nicméně studie prováděné organizací ICARDA v Sýrii ukázaly, že ztráty ve výnosu jsou významné. U cizrny, bobu, čočky a hrachu byly ztráty 66 %, 40,5 %, 44,6 % a 49,2 %. Experimenty prováděné ve sklenících ukázaly, že patotyp P-1 redukuje produkci semen o 35 % a patotyp P-4 až o 82 %. Další studie ukázaly, že PSbMV infikuje až 42 % rostlin hrachu na polích (Plant Viruses Online, 1996). Tyto a další studie s PSbMV ukázaly, že tento virus je z hlediska ekonomického velmi významný, protože způsobuje choroby u hospodářsky významných rostlin a výrazně snižuje jejich produkci. Kontrola výskytu viru semenem přenosné mozaiky hrachu je založena na

kontrole komerčně dováženého materiálu, a na jeho eliminaci ze sbírek genových zdrojů, jakožto sekundárního zdroje šíření viru (Torok a Randles, 2007).

3.9 Detekce a identifikace PSbMV

Detekce a identifikace viru semenem přenosné mozaiky hrachu v listech a v semenech je možná tradičním testováním pomocí DAS-ELISA testu, pomocí RT-PCR, sekvencování, případně elektronové mikroskopie. (ICTVdB Management, 2006).

Pro sérologický DAS-ELISA test se odebírají vzorky z rostlin, které vykazují příznaky virového napadení (listová mozaika, prosvětlení žilek, kroucení listů, žloutnutí listů, deformace lusků a semen, poruchy růstu apod.). DAS-ELISA test (např. Fletcher, 1993; Johansen a kol., 1996; Šafářová a kol., 2008a) se v současnosti běžně provádí komerčně zakoupenými kity, např. firmy. DSMZ nebo Loewe Biochemica (Německo), podle návodů dodaných výrobcí.

Pro detekci a identifikaci potyvirů, mezi něž PSbMV patří, je využívána technika RT-PCR, kdy je virový genom pomocí reverzní transkripce přepsán do cDNA a vybraný úsek genomu pak amplifikován v následné PCR reakci (Johansen a kol., 1996; Borgstrom a Johansen, 2001; Olsen a Johansen, 2001; Torok a Randles, 2007).

Méně využívanou technikou je elektronová mikroskopie, pomocí které je možné detekovat přítomnost inkluzních tělísek anebo virionů v ultratenkých řezech listů nebo semen (Wang a kol., 1991; Roberts a kol., 2003).

4 Experimentální část

Cílem experimentální části bakalářské práce bylo detekovat a charakterizovat oblasti v genomu (P1 oblast, HC-Pro oblast, CI oblast a NIa/NIb oblast) vybraných atypických izolátů viru semenem přenosné mozaiky hrachu (*Pea seed-borne mosaic virus*, PSbMV).

4.1 Materiál a metody

4.1.1 Biologický materiál

Jako biologický materiál byly použity tři izoláty viru semenem přenosné mozaiky hrachu (izolát 194, 204 a 262). Vzorky jednotlivých izolátů byly získány z rostlin hrachu setého (*Pisum sativum*) vnímavého kultivaru 'Merkur', které jsou udržovány ve sbírce virových izolátů Laboratoře molekulární biologie mikroorganismů na Katedře buněčné biologie a genetiky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

4.1.2 Izolace celkové RNA

Celková RNA byla izolována z cca 0,1g čerstvých listů pomocí NucleoSpin[®] RNA Plant kitu firmy Macherey-Nagel (kat. č. 740949.250). Izolace RNA byla provedena podle pokynů výrobce.

Po izolaci RNA byla stanovena čistota a koncentrace izolované RNA pomocí spektrofotometru NanoDrop1000 (Thermo Fisher Scientific Inc.).

Vzorky izolované RNA byly dlouhodobě uchovávány v -80°C.

4.1.3 Reverzní transkripce (RT)

Virová cDNA byla získána pomocí reverzní transkripce (RT) s pomocí 'Random' primerů nebo specifického 'reverse' primeru.

K 5 µl izolované RNA bylo přidáno 10 µl reakční směsi I („premix I“): 9 µl dEPC destilované vody a 1 µl (0,5µM) 'Random' primerů nebo 'reverse' primeru. Tato

směs o celkovém objemu 15 µl byla inkubována 5 min při teplotě 70°C a ihned po ukončení inkubace přenesena na led. Následně bylo do reakční směsi připipetováno 25 µl „premixu II“: 11,5 dEPC destilované vody, 8 µl RT-PCR pufru (5x), 4 µl dNTP (10 mM), 0,5 µl inhibitoru ribonukleasy (40 U/µl) a 1 µl AMV RT polymerázy (10 U/µl).

Reverzní transkripce proběhla v celkovém konečném objemu 40 µl v termocycleru Thermal Cycler Gene E (Techne), po dobu 60 min při 37°C nebo 42°C při přepisu pomocí „Random“ primerů respektive specifického „reverse“ primeru. Po proběhnutí reverzní transkripce byly vzorky cDNA dlouhodobě uchovávány v -20°C.

4.1.4 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Cílové oblasti komplementární DNA (cDNA), která byla získána reverzní transkripcí, byly následně amplifikovány pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) za použití specifické kombinace páru primerů.

4.1.4.1 Reakční směs pro PCR amplifikace

Reakční směs pro 1 vzorek obsahovala 2,5 µl RedTaq pufru (Sigma) (10x), 0,5 µl MgCl₂ (25 mM), 11,12 µl destilované vody, 6,25 µl dNTP (1 mM), 0,3125 µl „forward“ (F) primeru (20 pmol/µl), 0,3125 µl „reverse“ (R) primeru (20 pmol/µl) a 1 µl RedTaq polymerázy (1 U/µl).

Pro detekci oblasti P1 byla nově navržena a ověřována kombinace primerů:

- PSbMVP1F / PSbMVP1R1407

Pro detekci oblasti HC-Pro byla nově navržena a ověřována kombinace primerů:

- PSBMVHCProF / PSBMVHCProR

Pro detekci oblasti CI byla nově navržena a ověřována kombinace primerů:

- PSbMVCIF3863 / PSbMVCIR6057

Pro detekci oblasti NIa/NIb byla nově navržena a ověřována kombinace primerů:

- PSbMVVPgR(f)6619 / PSbNIbR

4.1.4.2 Podmínky PCR reakce

PCR reakce probíhala v termocycleru (T-Personal, Biometra) za těchto podmínek:

- počáteční pre-denaturace 94°C, 3 min
- 35 cyklů:
 - denaturace 94°C, 1 min
 - annealing 2 min
 - elongace 72°C, 2-3 min
- závěrečná elongace 72°C, 10 min

Teplota nasedání (annealing) primerů byla volena v závislosti na použité kombinaci primerů: pro kombinaci primerů PSbMVP1F / PSbMVP1R1407, PSbHCProR / PSbHCProR a PSbMVCIF3863 / PSbMVCIR6057 to byla teplota 55°C, pro kombinaci primerů PSbMVVPgR(f)6619 / PSbNIbR 51°C.

4.1.4.3 Vyhodnocení PCR produktů

Úspěšnost amplifikace a velikost PCR produktů byly hodnoceny pomocí elektroforetické separace (ELFO) v 2% agarózového gelu v prostředí TAE pufru. DNA byla barvena pomocí ethidium bromidu (0,01mg/50 ml agarózy) nebo barviva GelRed (5µl/50 ml agarózy; Biotium, Ltd.). Pro nanášení vzorků byl použit jednotný systém, tj. do první jamky gelu byly nanесeny 2 µl ladderu a do dalších jamek 5 µl analyzovaného vzorku. Migrace vzorků probíhala v TAE pufru (složení viz Příloha) při stejnosměrném napětí 70 V po dobu 45 minut. PCR produkty byly vizualizovány a dokumentovány pomocí UV transluminátoru a dokumentačního zařízení SynGene (Synoptics Ltd, UK).

4.1.5 Klonování a sekvencování

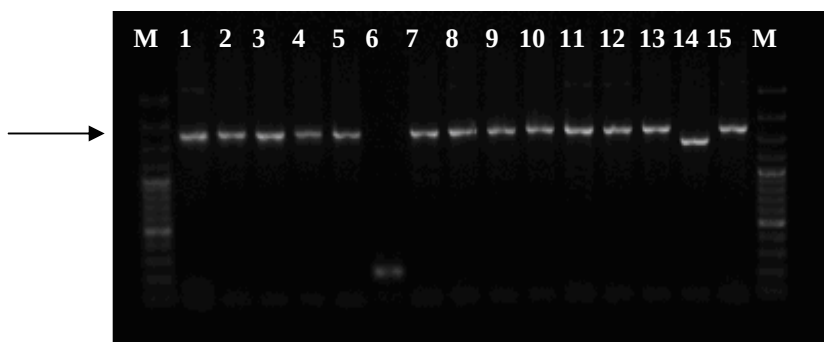
Následné klonování a sekvencování fragmentů bylo provedeno na pracovišti Laboratoře molekulární biologie mikroorganismů.

Jednotlivé PCR produkty byly pročištěny pomocí Gel extraction kitu (QIAGEN, kat. č. 28704) a následně klonovány pomocí pGEM-T cloning kitu (Promega, kat. č. A3600) v buňkách *Escherichia coli*, kmen JM109, podle pokynů výrobce. Jednotlivé pozitivní kolonie byly následně selektovány pomocí PCR reakce za použití kombinace

univerzálních primerů M13F/M13R a následně elektroforetické detekci velikosti produktů (příklad viz Obr. 11).

M13F/M13R amplikony odpovídající velikosti byly izolovány pomocí QIAquick Gel Extraction kitu (QIAGEN, kat. č. 28706) Vzorky byly následně značeny pomocí BigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing kitu (Applied Biosystems, kat. č. 4337455) a sekvencovány pomocí Genetického Analyzátoru ABI PRISM 3730 (Applied Biosystems) na Ústavu experimentální botaniky, AV ČR Olomouc.

Obr. 11: Detekce pozitivních kolonií nesoucích fragment HC-Pro.



(dráhy: M- marker – GeneRuller 100 bp Plus DNA ladder, Fermentas; 1-15: jednotlivé testované kolonie; šipka označuje specifický produkt)

4.1.6 Fylogenetická analýza

Sekvenační data byla analyzována a následně skládána do konečných sekvencí (kontigů) pomocí programu Seqman (DNASTAR, Lasergene).

Identifikace a míra podobnosti získaných sekvencí DNA se sekvencemi známými byla zjištěna srovnáním s databází GenBank prostřednictvím programu BLAST (<http://www.ncbi.nih.gov/blast>).

Získané nukleotidové a odvozené aminokyselinové sekvence byly pomocí programu MEGA 4.0 (Tamura a kol., 2007) následně porovnány se sekvencemi odpovídajících genomických oblastí izolátů PSbMV dostupných v databázi GenBank. Mimo to byly v analýzách použity i odpovídající sekvence izolátu PSB117CZ původem z ČR, náležícího k patotypu P-1 (Šafářová a kol., 2008a). Matice získané z jednotlivých přiřazení pokrývající úplné oblasti P1, HCPro a NIa/NIb, byly využity pro stanovení

fylogenetické příbuznosti jednotlivých izolátů za pomoci neighbor-joining analýzy programu ClustalW (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/top-e.html>).

Vlastní fylogenetické stromy byly vizualizovány pomocí programu TreeViewX version 0.5.0 (Page, 1996).

4.2 Výsledky

Pro studium vybraných oblastí genomu byly zvoleny dříve na území České republiky identifikované izoláty viru semenem přenosné mozaiky hrachu (PSbMV), původem z hrachu, vykazující atypické biologické vlastnosti (Šafářová, osobní sdělení), tyto izoláty byly označeny jako 194, 204 a 262. Experimentální rostliny hrachu, cv. Merkur, vykazovaly po infekci jednotlivými izoláty typické příznaky infekce PSbMV, především silnou mozaiku a svinutku listů.

RNA byla ve všech třech případech úspěšně izolována z příznakových listů pokusných rostlin. Při orientační spektrofotometrické analýze byla potvrzena její kvalita, poměr absorbance A260/280 se pohyboval v rozmezí 1,9-2,0.

Pro detekce cílových oblastí byla zvolena technika RT-PCR. V první fázi byla virová RNA přepsána do cDNA za použití „Random“ primerů. V jednotlivých případech byla ověřována i možnost tohoto přepisu i za pomoci tzv. „reverse“ specifických primerů.

4.2.1 P1 oblast

Pro detekci a amplifikaci oblasti P1 byla použita a ověřena nově navržená kombinace primerů PSbMVP1F / PSbMVP1R1407, očekávaný fragment o délce 1428 bp pokrýval celou oblast P1 proteázy a N-terminální oblast HCPro. Byla testována aplikace dvou postupů reverzní transkripce, která vedla k úspěšné syntéze virové cDNA a následné amplifikace cílové oblasti. Jak při použití RT-PCR „Random“ primerů PSbMVP1F / PSbMVP1R1407, tak při použití PSbMVP1R1407-PSbMVP1F / PSbMVP1R1407 byly získány produkty očekávané velikosti o délce cca cca 1400 bp. Po provedení reverzní transkripce s pomocí „Random“ primerů byly zaznamenány slabé nespecifické produkty o menší velikosti (viz. Obr. 12).

Následně byla provedena genetická analýza amlikonů, tj. analýza podobnosti a fylogenetická analýza příbuznosti. Porovnáním všech sekvencí získaných sekvencí u izolátů PSB117CZ, 194, 204 a 262 s databází GenBank pomocí algoritmu BLAST byla prokázána jejich identita s P1 oblastmi různých izolátů PSbMV.

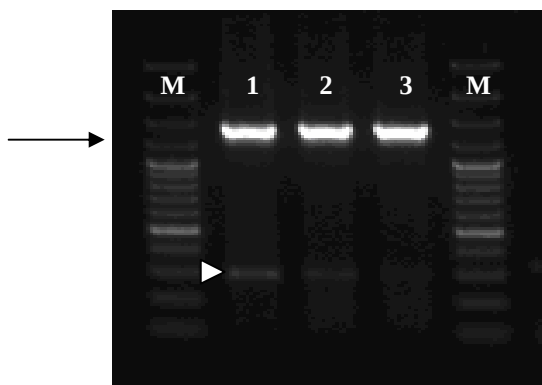
Tab. 1: Podobnost izolátů v oblasti P1.

Izolát	DPD1 (P-1) (Ac. No. D10930.1)	L-1 (P-2) (Ac. No. AJ252242.1)	S6 (P-4) (Ac. No. AF127770.1)
PSB117CZ	99 %	85 %	81 %
194	97 %	85 %	81 %
204	97 %	85 %	81 %
262	99 %	85 %	81 %

Při analýze získaných sekvencí pokrývajících oblast P1-5'HCPro o délce 1428 bp vykazovaly sekvence největší podobnost s izolátem DPD1 (Ac. No. D10930.1), příslušejícímu k patotypu P-1, podle očekávání nižší podobnost s izoláty příslušejícími k patotypům P-2 a P-4 (viz. Tab. 1.).

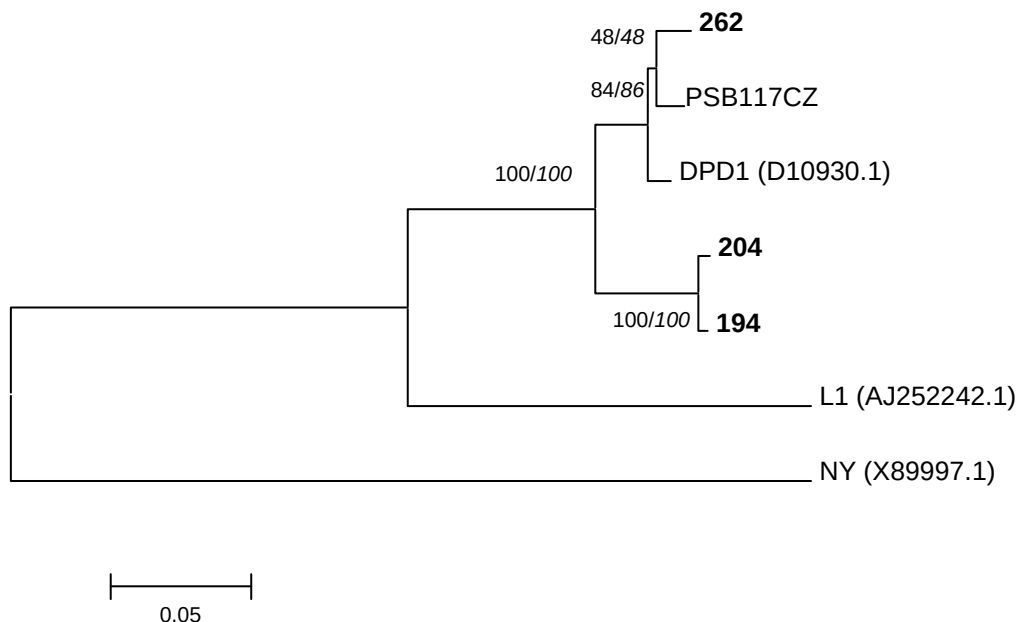
Následná fylogenetická analýza P1 oblasti rozčlenila izoláty 194, 204 a 262 na základě nukleotidových a aminokyselinových sekvencí do dvou clusterů. Do clusteru I náleží izolát 262, který je fylogeneticky příbuzný s českým izolátem PSB117CZ a DPD1. Do clusteru II náleží izolát 194, který je fylogeneticky příbuzný s izolátem 204 (viz. Obr. 13).

Obr. 12: Detekce amplikonů P1 oblasti (cca 1400 bp) jednotlivých atypických izolátů PSbMV



(dráhy M: marker – GeneRuller 100 bp Plus DNA ladder, Fermentas; 1: izolát 204; 2: izolát 194; 3: izolát 262; šipka označuje specifický produkt; $\triangleright$ nespecifický produkt)

Obr. 13: Fylogenetický strom izolátů PSbMV vytvořený pomocí neighbor-joining analýzy na základě nukleotidových a aminokyselinových sekvencí P1 oblasti genomu.

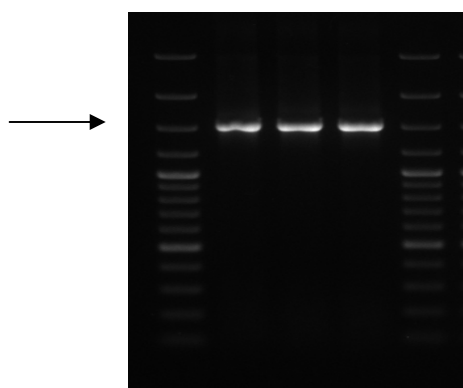


Izoláty jsou popsány jménem a přístupovým kódem databáze GenBank. Čísla představují hodnoty bootstrap získané při neighbor-joining analýze nukleotidových (standardní písmo) a aminokyselinových (*kurzíva*) sekvencí.

4.2.2 HC-Pro oblast

Pro detekci a amplifikaci HC-Pro oblasti byla použita kombinace nově navržených primerů PSBMVHCProF / PSBMVHCProR. Komplementární cDNA získaná v reverzní transkripci za použití 'Random' primerů a za použití primerů PSBMVHCProR. Sledovaná oblast pak byla amplifikována v následné PCR reakce. Po PCR reakci byly detekovány produkty o očekávané velikosti cca 1500 bp (viz. Obr. 14). Při použití cDNA získané s pomocí 'Random' primerů nebyly zaznamenány žádné nespecifické produkty.

Obr. 14: Detekce amplikonů HC-Pro oblasti (cca 1500 bp) jednotlivých atypických izolátů PSbMV



(dráhy M: marker – GeneRuler 100 bp Plus DNA ladder, Fermentas; 1: izolát 204; 2: izolát 194; 3: izolát 262; šipka označuje specifický produkt)

Následně byla provedena genetická analýza amplikonů, analýza podobnosti a fylogenetická analýza příbuznosti. Porovnáním všech sekvencí HC-Pro oblasti u izolátů PSB117CZ, 194, 204 a 262 s databází GenBank pomocí algoritmu BLAST byla prokázána jejich identita s HC-Pro oblastmi různých izolátů PSbMV.

Při analýze získaných sekvencí pokrývajících oblast HC-Pro o délce 1495 bp vykazovaly sekvence největší podobnost s izolátem DPD1 (Ac. No. D10930.1), příslušejícímu k patotypu P-1 a podle očekávání nižší podobnost s izoláty příslušejícími k patotypům P-2 a P-4 (viz. Tab. 2).

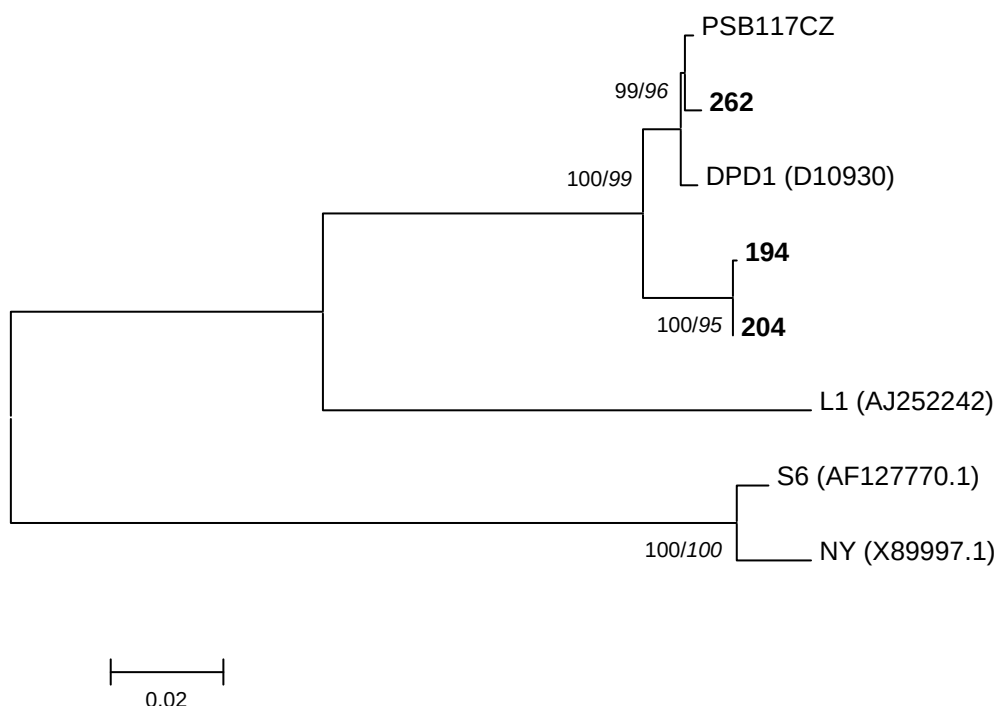
U oblasti HC-Pro o délce 1337 bp byly zkoumané izoláty 194, 204 a 262 rozděleny fylogenetickou analýzou na základě nukleotidových a aminokyselinových sekvencí do tří clusterů. V obou případech, byly zjištěny obdobné příbuzenské vztahy, byla prokázána vyšší příbuznost českých izolátů s izolátem DPD1. Fylogenetická

analýza nukleotidových sekvencí prokázala příbuznost izolátu 262 a s českým izolátem PSB117CZ a DPD1; druhou větev vytvořily izoláty 194 a 204, izoláty ostatních patotypů se vyvětvily opět samostatně (viz. Obr. 15).

Tab. 2: Podobnost izolátů v oblasti HC-Pro.

Izolát	DPD1 (P-1) (Ac. No. D10930.1)	L-1 (P-2) (Ac. No. AJ252242.1)	NY (P-4) (Ac. No. X89997.1)
PSB117CZ	98 %	78 %	71 %
194	95 %	79 %	71 %
204	95 %	79 %	71 %
262	98 %	79 %	72 %

Obr. 15: Fylogenetický strom PSbMV vytvořený pomocí neighbor-joining analýzy na základě nukleotidových a aminokyselinových sekvencí HC-Pro oblasti genomu.



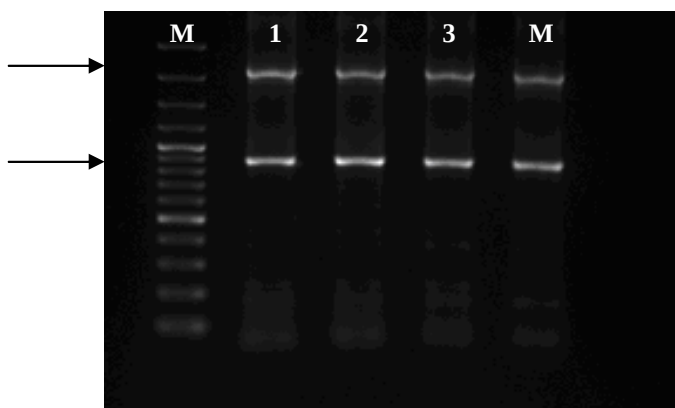
Izoláty jsou popsány jménem a přístupovým kódem databáze GenBank. Čísla představují hodnoty bootstrap získané při neighbor-joining analýze nukleotidových (standardní písmo) a aminokyselinových (*kurzíva*) sekvencí.

4.2.3 CI oblast

Pro detekci a amplifikaci oblasti CI byla použita a ověřena možnost použití nově navržené kombinace primerů PSbMVCIF3863 / PSbMVCIR6057. Reverzní transkripce byla provedena jen za použití 'Random' primerů, následná PCR reakce proběhla úspěšně, na elektroforetickém gelu reakci byly detekovány 2 produkty, jeden o očekávané velikosti cca 2200 bp, druhý o velikosti cca 900 bp (viz. Obr. 16).

Analýza podobnosti a fylogenetická analýza nebyla u této oblasti genomu provedena. Orientační sekvenční analýza krátkého fragmentu potvrdila, že se jedná o oblast CI, tj. došlo k navázání primerů uvnitř amplifikované oblasti.

Obr. 16: Detekce amplikonů CI oblasti jednotlivých atypických izolátů PSbMV



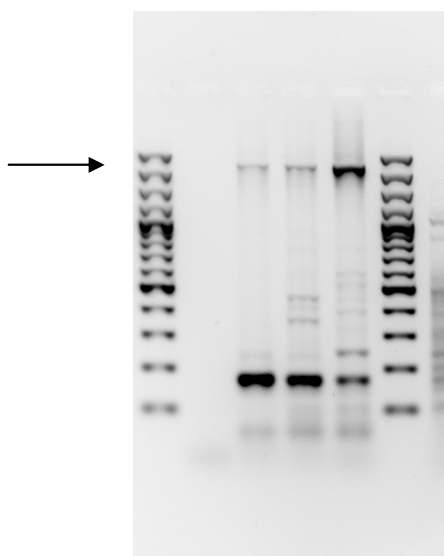
(dráhy M: marker – GeneRuller 100 bp Plus DNA ladder, Fermentas; 1: izolát 204; 2: izolát 194; 3: izolát 262, 4. izolát 204; šipka označuje specifický produkt)

4.2.4

NIa/NIb oblast

Pro detekci a amplifikaci oblasti NIa/NIb byla použita a ověřena kombinace nově navržených primerů PSbMVVPgR(f)6619 / PSbNIbR. Komplementární DNA byla získána za použití 'Random' primerů, v následující PCR byla sledovaná oblast amplifikována za pomoci PCR reakce. U všech vzorků případech byly detekovány produkty o očekávané velikosti cca 2300 bp, bylo zaznamenáno velké množství nespecifických produktů (viz Obr. 17).

Obr. 17: Detekce amplikonů NIa/NIb oblasti (cca 2300 bp) jednotlivých atypických izolátů PSbMV



(dráhy M: marker – GeneRuler 100 bp Plus DNA ladder, Fermentas; 1: izolát 204; 2: izolát 194; 3: izolát 262; šipka označuje specifický produkt)

Následně byla provedena genetická analýza podobnosti sekvencí a fylogenetická analýza příbuznosti izolátů. Porovnáním všech sekvencí NIa/NIb oblasti u izolátů PSB117CZ, 194, 204 a 262 s databází GenBank pomocí algoritmu BLAST byla prokázána jejich identita s oblastí NIa/NIb různých izolátů PSbMV.

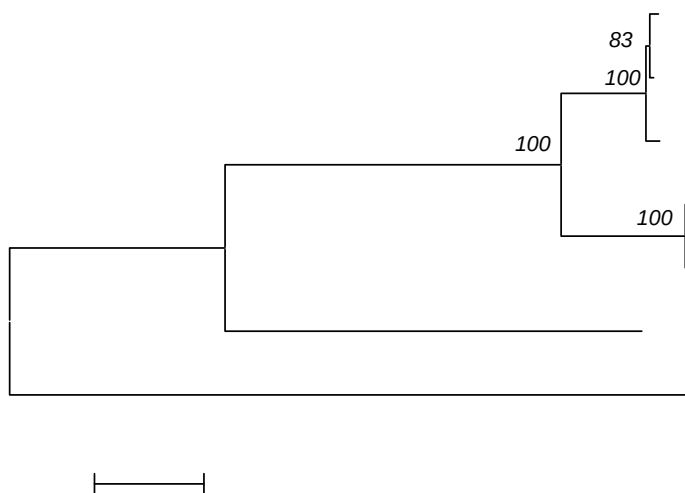
Při analýze získaných sekvencí pokrývajících oblast NIa/NIb o délce 2355 bp, vykazovaly sekvence největší podobnost s izolátem DPD1 (Ac. No. D10930.1), příslušejícímu k patotypu P-1, podle očekávání nižší podobnost s izoláty příslušejícími k patotypům P-2 a P-4 (viz. Tab. 3).

Tab. 3: Podobnost izolátů v oblasti NIa/NIb.

Izolát	DPD1 (P-1) (Ac. No. D10930.1)	L-1 (P-2) (Ac. No. AJ252242.1)	NY (P-4) (Ac. No. X89997.1)
PSB117CZ	99 %	87 %	81 %
194	96 %	87 %	81 %
204	95 %	87 %	81 %
262	99 %	87 %	82 %

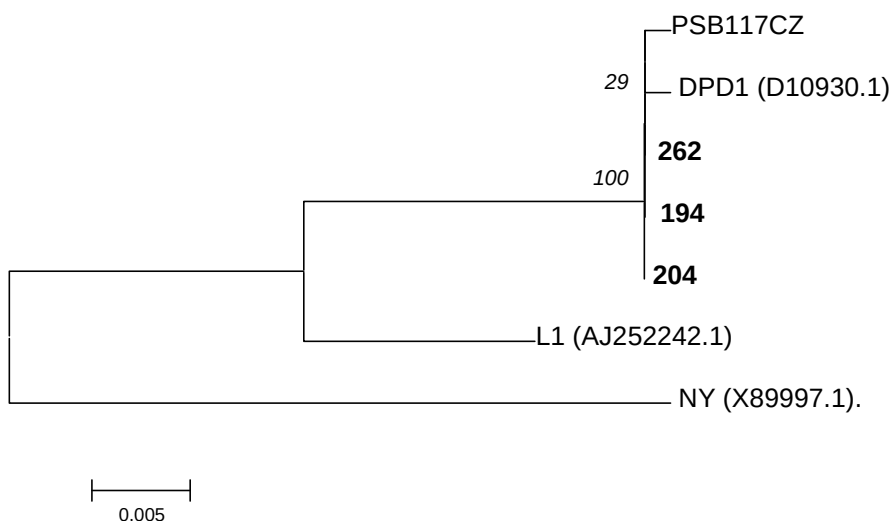
Fylogenetická analýza oblasti NIa/NIb o délce 2355 bp rozdělila zkoumané izoláty na základě nukleotidových a aminokyselinových sekvencí do tří samostatných clusterů. Fylogenetická analýza nukleotidových sekvencí prokázala, podobnost izolátů PSB117CZ, 262 a DPD1 s izoláty 194 a 262, které však vytvořily samostatnou větev (viz. Obr. 18). Analýza aminokyselinových sekvencí prokázala stejné příbuzenské vztahy, české izoláty však nevykázaly statisticky průkazné rozdíly, naopak se opět průkazně vyvětvily izoláty L1 a NY (viz. Obr 19).

Obr. 18: Fylogenetický strom izolátů PSbMV vytvořený pomocí neighbor-joining analýzy na základě nukleotidových sekvencí NIa-NIb oblasti genomu.



Izoláty jsou popsány jménem a přístupovým kódem databáze GenBank. Čísla představují hodnoty bootstrap získané při neighbor-joining analýze.

Obr. 19: Fylogenetický strom izolátů PSbMV vytvořený pomocí neighbor-joining analýzy na základě aminokyselinových sekvencí NIa-NIb oblasti genomu.



Izoláty jsou popsány jménem a přístupovým kódem databáze GenBank. Čísla představují hodnoty bootstrap získané při neighbor-joining analýze.

5 Diskuze

Virus semenem přenosné mozaiky hrachu (*Pea seed-borne mosaic virus*, PSbMV) je významný patogen napadající bobovité rostliny. Způsobuje značné ztráty na hospodářsky významných plodinách, které jsou pěstovány v různých zemích světa. V České republice se *Pea seed-borne mosaic virus* vyskytuje především na rostlinách hrachu setého (*Pisum sativum* L.). Napadení rostliny virem PSbMV se projevuje typickými symptomy, nejčastějšími příznaky jsou chlorotická mozaika listů a svinování listů (Piáková a kol., 2006; Plant Viruses Online, 2006; Šafářová a kol., 2008a). K charakterizaci viru PSbMV nebo jeho původu nestačí znát pouze jeho vlastní epidemiologii, rychlost projevu choroby u napadených rostlin, intenzitu vyvolaných symptomů nebo úspěšnost přenosu semenem. Tyto faktory totiž nemusí být spojeny s konkrétním izolátem viru, ale i s genotypem hostitelské rostliny (Provvidenti a Alconero, 1986; Khetarpal a Maury, 1987; Alconero a kol., 1989; Ali a Randles, 1997; Ali a Randles, 2001; Hjulsager a kol., 2002).

Existence rezistentních linií hrachu vedla k vytvoření systému patotypizace. Jednotlivé izoláty viru semenem přenosné mozaiky hrachu byly na základě neschopnosti překonávat ‚sbm‘ geny rezistence u rostlin rozděleny do čtyř patotypů – P1, P-2, P-3 a P-4. Zastoupení izolátů viru v jednotlivých patotypech souvisí i s jejich geografickým původem, proto je systém patotypizace užitečný také pro zjišťování zdrojů infekce. Patotyp P-1 byl popsán hlavně v Evropě (Johansen a kol., 1996), dále v Asii (Pakistán), méně v Austrálii (Ali a Randles, 1997; Ali a Randles, 2001; Torok a Randles, 2007) a v USA (Torok a Randles, 2007). Patotyp P-4 byl popsán v Austrálii (Torok a Randles, 2007) a na Novém Zélandu (Fletcher, 1993). Stanovení těchto čtyř patotypů ale není dostačující, protože existují izoláty viru, které disponují atypickými biologickými vlastnostmi, překonávají odlišné kombinace diferenciacních linií, označené jako např. patotypy U-1, U-2, izoláty Pv nebo Pi (Khetarpal a kol, 1990; Ali a Randles, 1997; Ali a Randles, 2001; Torok a Randles, 2007).

Do této skupiny atypických izolátů, jež nelze na základě biologických vlastností zařadit do žádného z patotypů, patří také studované izoláty PSbMV (194, 204 a 262), přestože na infikovaných rostlinách hrachu setého vyvolávají typické příznaky infekce, které jsou stejné jako u již popsaných jiných českých izolátů (Šafářová a kol., 2008b).

Pomocí genetické analýzy oblastí P1, HC-Pro a NIa/NIb byla prokázána fylogenetická příbuznost izolátů 194, 204 a 262 se známými izoláty evropského (DPD1) a českého původu (PSB117CZ), příslušejícími k patotypu P-1 (Borgstrom a Johansen, 2001; Olsen a Johansen, 2001; Šafářová a kol., 2008a). Ve sledovaných oblastech nebyly nalezeny žádné mutace, na základě kterých by byly izoláty odlišeny od ostatních patotypů. Obdobné studie prováděli Ali a Randles (2001). Porovnávali izoláty z Pakistánu s izoláty US a S6 a analyzovali jejich genomické oblasti NIb/CP/UTR a P1-Pro/HC-Pro. Genetickou variabilitu australských a pakistánských izolátů studovali Torok a Randles (2007). V obou pracích autoři odlišili jednotlivé izoláty, ale nebyli schopni je rozdělit do skupin podle patotypů, nebo dokonce odlišit nové U-1 a U-2 patotypy. Tyto zjištěné údaje naznačují, že pouze malé změny v sekvencích genomu mohou způsobit změny v biologických vlastnostech. Tým dr. Johansena již dříve prokázal účinnost takových substitucí: krátká substituce v centrální oblasti VPg ovlivnila virulenci viru (Borgstrom a Johansen, 2001), záměna jedné aminokyseliny v oblasti HC-Pro ovlivnila šíření viru v rostlině (Andersen a Johansen, 1998).

6 Závěr

Ve své bakalářské práci jsem shrnula dosavadní poznatky o viru *Pea seed-borne mosaic virus* (PSbMV). PSbMV, náležící do čeledi *Potyviridae*, je ekonomicky velmi důležitý patogen, který je pravděpodobně rozšířen po celém světě. Jeho přirozeným hostitelem jsou rostliny čeledi *Fabaceae* (rody *Pisum*, *Lathyrus*, *Lens*, *Cicer* a *Vicia*). Na různých rostlinách se infekce virem projevuje různými příznaky nebo se také nemusí vůbec projevovat. Typickými příznaky choroby jsou listová mozaiky a svinování listů. *Pea seed-borne mosaic virus* významně snižuje zemědělskou produkci a kvalitu u hospodářsky důležitých plodin čeledi *Fabaceae*, např. u hrachu setého, čočky kuchyňské, cizrny beraní a bobu obecného. Genom viru je nedělený a skládá se z 10 oblastí: P1-Pro, HC-Pro, P3, 6K1, CI, 6K2, NIa-VPg, NIa-Pro, NIb a CP. Čtyři z těchto oblastí byly objektem studia v praktické části mé bakalářské práce.

V praktické části jsem se zabývala izoláty 194, 204 a 262 hrachu setého (*Pisum sativum* L.), konkrétně oblastmi P1, HC-Pro, CI a NIa/NIb.

Byla ověřena možnost a vhodnost použití „Random“ primerů a specifických primerů pro syntézu komplementární DNA. Ve všech případech byla tato cDNA úspěšně získána, při použití „random“ primerů došlo v následné PCR amplifikaci k tvorbě nespecifických produktů.

Nově navržené primery a jejich kombinace se ukázaly jako vhodné pro detekci a syntézu vybraných genomických oblastí sledovaných českých izolátů, tj. kombinace primerů PSbMVP1F / PSbMVP1R1407 pro syntézu fragmentu pokrývajícího P1 oblast, kombinace PSBMVHCProF / PSBMVHCProR pro syntézu oblasti HC-Pro, kombinace PSbMVCIF3863 / PSbMVCIR6057 pro syntézu CI oblasti a, kombinace primerů PSbMVVPgR(f)6619 / PSbNIbR pro syntézu NIa-NIb oblasti. Ve všech případech došlo k amplifikaci cílové oblasti, což bylo potvrzeno pomocí sekvencování a analýzy BLAST.

Při porovnáním získaných sekvencí oblastí P1, HC-Pro a NIa/NIb bylo zjištěno, že zkoumané izoláty 194, 204, 262 a typický český izolát PSB117CZ vykazují vysokou podobnost (95-99 %) s izolátem DPD1, patotypu P-1. Nižší podobnost (78–87 %) vykazovaly zkoumané izoláty s izolátem L-1, patotypu P-2. U oblasti P1 vykazovaly zkoumané izoláty 81% podobnost s izolátem S6, patotypu P-4, u oblasti HC-Pro 71-

72% podobnost s izolátem NY, patotypu P-4 a u oblasti NIa/NIb 81-82% podobnost s izolátem NY, patotypu P-4.

Genetická analýza jednotlivých fragmentů prokázala příbuznost analyzovaných českých izolátů, kdy nejvyšší stupeň příbuznosti vykazoval atypický izolát 262 s dříve popsáním izolátem PSB117CZ, a izoláty 194 a 204. Fylogenetická analýza prokázala homologii nukleotidových i aminokyselinových sekvencí P1, HC-Pro a NIa/NIb oblastí českých izolátů s referenčním izolátem viru PSbMV DPD1, patotypu P-1.

V rámci analyzovaných genomických fragmentů nebyla identifikována oblast nebo zřetelná mutace, která by mohla souviset s jejich odlišnými biologickými vlastnostmi.

7 ***Seznam použité literatury***

- Aapola A.A., J.E. Knesek a G.I. Mink, 1974: The influence of inoculation procedure on the host range of pea seed-borne mosaic virus. *Phytopathology* 64: 1003-1006.
- Abraham A., K.M. Makkouk, D. Gorf, A.G. Lencho, K. Ali, N. Tadesse, A. Yusuf a A. Lencho, 2000: Survey of faba bean (*Vicia faba* L.) virus diseases in Ethiopia. *Phytopathologia Mediterranea* 39: 277-282.
- Aftab M. a A. Freeman, (2006): Temperate Pulse Viruses: Pea Seedborne Mosaic Virus (PSBMV). *Agriculture Notes*, AG1267, (ISSN 1329-8062)
- Alconero R., R. Provvidenti a D. Gonsalves, 1986: Three Pea Seedborne Mosaic Virus Pathotypes from Pea and Lentil Germ Plasm. *Plant Disease* 70: 783-786.
- Ali A. a J.W. Randles, 1997: Early Season Survey of Pea Viruses in Pakistan and the Detection of Two New Pathotypes of Pea Seedborne Mosaic Potyvirus. *Plant Disease* 81: 343-347.
- Ali A. a J.W. Randles, 2001: Genomic heterogeneity in *Pea seed-borne mosaic virus* isolates from Pakistan, the centre of diversity of the host species, *Pisum sativum*. *Archives of Virology* 146: 1855-1870.
- Andersen K. a I.E. Johansen, 1998: A Single Conserved Amino Acid in the Coat Protein Gene of Pea Seed-Borne Mosaic Potyvirus Modulates the Ability of the Virus to Move Systemically in *Chenopodium quinoa*. *Virology* 241: 304-311.
- Borgstrom B. a I.E. Johansen, 2001: Mutations in *Pea seedborne mosaic virus* Genome-Linked Protein VPg Alter Pathotype-Specific Virulence in *Pisum sativum*. *The American Phytopathological Society* 6: 707-714.
- Bos L. 1970: The identification of three new viruses isolated from *Wisteria* and *Pisum* in the Netherlands and the problem of variation within potato virus Y group. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 76: 8-46.
- Fauquet C.M., M.A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger a L.A. Ball, 2005: *Virus Taxonomy: VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Academic Press, San Diego – London, p. 825.
- Fletcher J.D., 1993: Surveys of virus diseases in pea, lentil, dwarf and broad bean crops in South Island, New Zealand. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 21: 45-53.

- Frew T.E., A.C. Russell a G.M. Timmerman-Vaughan, 2002: Sequence tagged site markers linked to the *smbl* gene for resistance to pea seedborne mosaic virus in pea. *Plant Breeding* 121: 512-516.
- Fry P.R a B.R. Young, 1980: Pea seed-borne mosaic virus in New Zealand. *Aus. Plant Pathology* 9: 10-11.
- Gao Z. S. Eyers, C. Thomas, N. Ellis a A. Maule, 2004: Identification of markers tightly linked to sbm recessive genes for resistance to *Pea seed-borne mosaic virus*. *Theoretical and Applied Genetics* 109: 488-494.
- Grünwald N.J., W. Chen, a R.C. Larsen, 2004. Pea Diseases and their Management. In *Disease Management of Fruits and Vegetables. II. Vegetable Diseases*, edited by S. A. M. H. Naqvi and K. G. Mukerji. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Hampton R.O., 1969: Characteristics of virus particles associated with the seed-borne pea fizzle-top disease. *Phytopathology* 59: 1029.
- Hjulsager C.K., B.S. Olsen, D.M.K. Jensen, M.I. Cordea, B.N. Krath, I.E. Johansen a O.S. Lund, 2006: Multiple determinants in the coding region of *Pea seed-borne mosaic virus* P3 are involved in virulence against *sbm-2* resistance. *Virology* 355: 52-61.
- Hjulsager C.K., O.S. Lund a I.E. Johansen, 2002: A New Pathotype of *Pea seedborne mosaic virus* Explained by Properties of the P3-6k1-and Viral Genome-Linked Protein (VPg)-Coding Regions. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15: 169-171.
- ICTVdB Management (2006). 00.057.0.01.048.Pea seed-borne mosaic virus. 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>)
- Inouye T., 1967: A seed-borne mosaic virus of pea. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 33: 38-42.
- Johansen I.E., W.G. Dougherty, K.E. Keller, D. Wang a R.O. Hampton, 1996: Multiple viral determinants affect seed transmission of pea seed borne mosaic virus in *Pisum sativum*. *Journal of General Virology* 77: 3149-3154.
- Johansen I.E., K.E. Keller, W.G. Dougherty a R.O. Hampton, 1996: Biological and molecular properties of a pathotype P-1 and a pathotype P-4 isolate of pea seed-borne mosaic virus. *Journal of General Virology* 77: 1329-1333.

- Johansen E., O.F. Rasmussen, M. Heide a B. Borkhardt, 1991: The complete nucleotide sequence of pea seed-borne mosaic virus RNA. *Journal of General Virology* 72: 2625-2632.
- Johansen E., O.S. Lund, Ch.K. Hjulsager a J. Laursen, 2001: Recessive Resistance in *Pisum sativum* and Potyvirus Pathotype Resolved in a Gene-for-Cistron Correspondence between Host and Virus. *Journal of Virology* 14: 6609-6614.
- Jones A.L., I.E. Johansen, S.J. Bean, I. Bach a A.J. Maule, 1998: Specificity of resistance to pea seed-borne mosaic potyvirus in transgenic peas expressing the viral replicase (NIb) gene. *Journal of General Virology* 79: 3129-3137.
- Keller K.E., I.E. Johansen, R.R. Martin a R.O. Hampton, 1998: Potyvirus Genome-Linked Protein (VPg) Determines Pea Seed-Borne Mosaic Virus Pathotype-Specific Virulence in *Pisum sativum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11: 124-130.
- Khetarpal R.K. a Y. Maury, 1987: Pea seed-borne mosaic virus: a review. *Agronomie* 7 (4): 215-224.
- Khetarpal R.K., Y. Maury, R. Cousin, A. Burghofer a A. Varma, 1990: Studies on resistance of pea to Pea seed-borne mosaic virus and new pathotypes. *Annals of Applied Biology* 116: 297-304.
- Kowalska C., 1979: Viruses infecting pea (*Pisum L.*) in Poland. *Genetica Polonica* 20: 211-215.
- Lindsten K., S. Brishhammar a K. Tomenius, 1976: Investigations on relationship and variation of some legume viruses within the potyvirus group. *Meddelande-Statens Vaxtskyddsanstalt* 16: 289-322.
- Mabrouk O. a A.N. Mansour, 1998: Effect of pea seed borne mosaic and broad bean stain viruses on lentil growth and yield in Jordan. *Scientia Horticulturae* 73: 175-178.
- Matthews P., J.R.O. Dawson a G.H. Hills, 1981: Pea seed-borne mosaic virus (PSbMV). *John Innes Seventy-first Annual Report* (1980): 31-32.
- Miličič D. a J. Grbelja, 1977: Pea seed-borne mosaic virus in some pea cultivars in Yugoslavia. *Zaštita Bilja* 28:147-154.
- Mink G.I., J. Kraft, J. Knesek a A. Jafri, 1969: A seed-borne virus of pea. *Phytopathology* 59: 1342-1343.
- Musil M., 1966: Über das Vorkommen des Virus des Blattrollens der Erbse in der Slowakei (Vorläufige Mitteilung). *Biológia (Bratislava)* 21: 133-138.

- Olsen B.S. a I.E. Johansen, 2001: Nucleotide sequence and infectious cDNA clone of the L1 isolate of *Pea seed-borne mosaic potyvirus*. Archives of Virology 146: 15-25.
- Page R. D. M., 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. Computer Applications in the Biosciences 12: 357-358.
- Pelet F., 1980: Pea seed-borne mosaic virus (La mosaïque héréditaire du pois). Revue Suisse de Viticulture, Arboriculture, Horticulture 12: 281.
- Piáková Z., R. Pokorný a R. Dostálová, 2006: Výskyt virových patogenů hrachu na území ČR. Úroda 2: 10-11.
- Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database. Version: 20th August 1996. (<http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/vide/>)
- Smýkal P., D. Šafářová, M. Navrátil a R. Dostalová, 2010: Marker assisted pea breeding: eIF4E allele specific markers to pea seed-borne mosaic virus (PSbMV) resistance. Molecular Breeding DOI: 10.1007/s11032-009-9383-7.
- Stevenson W.R. a D.J. Hagedorn, 1969: A new seed-borne virus of peas. Phytopathology 59: 1051-1052.
- Šafářová D., M. Navrátil, J. Petrusová, R. Pokorný a Z. Piáková, 2008a: Genetic and biological diversity of the Pea seed-borne mosaic virus isolates occurring in Czech Republic. Acta Virologica 52: 53-57.1
- Šafářová D., J. Petrusová, M. Navrátil, 2008b: *Pea seed borne mosaic virus* isolates in the Czech Republic - existence of the novel pathotype? Book of Abstracts, The 3rd Conference of the International Working Group on Legume and Vegetable Viruses (IWGLVV) , 19. - 22.8.2008, Ljubljana Slovinsko, pp. 40.
- Tamura K., J. Dudley, M. Nei a S. Kumar, 2007: MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution 24:1596-1599.
- Thakur V.S., M.S. Thakur a S.M.P. Khurana, 1984: The pea seed-borne mosaic virus disease of pea in Himachal Pradesh. Indian Journal of Plant Pathology 2: 156-160.
- Thottappilly G.E. a H. Schmutter, 1968: Zur Kenntnis eines mechanisch Samen-, Pilz- and Insektenübertragbaren neuen Virus der Erbse. Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz 75: 1-8.

- Timmerman G.M., V.L. Calder a L.E.A. Bolger, 1990: Nucleotide sequence of the coat protein gene of pea seed-borne mosaic potyvirus. *Journal of General Virology* 71: 1869-1872.
- Torok V.A. a J.V. Randles, 2007: Discriminating Between Isolates of PSbMV Using Nucleotide Sequence Polymorphisms in the HC-Pro Coding Region. *Plant Disease* 91: 490-496.
- Wang D. a A.J. Maule, 1994: A Model for Seed Transmission of a Plant Virus: Genetic and Structural Analyses of Pea Embryo Invasion by Pea Seed-Borne Mosaic Virus. *The Plant Cell* 6: 777-787.
- Wang D, R.D. Woods, A.G. Swaby a A.J. Cockbain, 1991: Detection of pea see-borne mosaic virus virion and pinwheel inclusion body proteins in leaf and seed tissues of pea (*Pisum sativum L*) by immunogold labelling. *Agronomie* 11: 387-394.
- Zimmer R.C. a S.T. Ali-Khan, 1976: New seed-borne virus of field peas. *Canada Agriculture* 21: 6-8.

7.1 Použité internetové zdroje

- <http://www.biolib.cz>
- <http://canadianbiodiversity.mcgill.ca/english/species/insects/insectpages/aphididae.htm>
- <http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/top-e.html>
- http://education.expasy.org/images/Potyvirus_genome.jpg
- <http://www.inra.fr/hyppz/RAVAGEUR/6acypis.htm>
- <http://www.ncbi.nih.gov/blast>

8 *Seznam použitých zkratk a symbolů*

A	adenin
AFLPs	amplified fragment lenght polymorphisms
AMK	aminokyselina
bp	base pairs, páry bází
C	cytosin
cDNA	komplementární DNA
CI protein	cytoplasmatic inclusion, protein cytoplazmatických inkluzí
cM	centiMorgan
CsCl	chlorid cesný
CP	coat protein, plášťový protein
DAS-ELISA	double antibody sandwich ELISA
dEPC	diethylpyrokarbonát
dNTP	deoxynukleosidtrifosfát
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
ELFO	elektroforéza
ELISA	enzym-linked immunosorbent assay
EtBr	ethidium bromid
f-primer	forward primer, přímý primer
G	guanin
HC-Pro protein	helper component-proteinase
ICARDA	International Centre for Agriculture in the Dry Areas
ICTVdB	the International Committee on Taxonomy of Viruses database
MgCl ₂	chlorid hořečnatý
NIa protein	nuclear inclusion a, protein jaderných inkluzí a
Nib protein	nuclear inclusion b, protein jaderných inkluzí b
ORF	open reading frame, otevřený čtecí rámec
PCR	polymerase chain reaction, polymerázová řetězová reakce
PSbMV	<i>Pea seed-borne mosaic virus</i>
RAPDs	random amplified polymorphic DNAs
RFLPs	restriction fragment lenght polymorphisms
RNA	ribonukleová kyselina

r-primer	reverse primer, zpětný primer
RT	reverse transcription, reverzní transkripce
RT-PCR	reverse transcription - polymerase chain reaction, reverzní transkripce - polymerázová řetězová reakce
S	Svedberg = sedimentační konstanta
T	thymín
Taq polymerase	termostabilní polymeráza izolovaná z bakterie <i>Thermus aquaticus</i>
U	uracil
UV záření	ultrafialové záření
VPg	viral genome-linked protein, protein spojený s virovým genomem
+ssRNA	positive orientated single stranded RNA – pozitivně orientovaná jednovláknová RNA

9 Přílohy

9.1 Složení roztoků

5x TAE pufr

- Tris 24,2 g
- ledová kyselina octová 5,71 ml
- 0,5 M EDTA 10 ml

pH pufru (8,0) se upravuje kyselinou octovou, pufr se doplňuje vodou do 1000 ml.

9.2 Příprava 2% agarózy

300 ml 2% agarózy

- agaróza 6 g
- 1x TAE 300 ml

Pracovní roztok je 5x TAE, proto je nutno ředit na 1x TAE, směs 1x TAE a agarózy se zahřívá po dobu asi 4 minut, než dojde k úplnému rozpuštění agarózy v 1x TAE.