

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2020

Klára Vlková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Viry brukvovitých zelenin (r. *Brassica*) s důrazem
na *Turnip mosaic virus* a jeho hostitelský okruh**

Bakalářská práce

Klára Vlková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2020

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

Bibliografické údaje

Jméno a příjmení autora	Klára Vlková
Název práce	Viry brukvovitých zelenin (r. <i>Brassica</i>) s důrazem na <i>Turnip mosaic virus</i> a jeho hostitelský okruh
Typ práce	bakalářská
Pracoviště	Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UP v Olomouci
Vedoucí práce	Mgr. Dana Šafářová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2020
Klíčová slova	<i>Turnip mosaic virus</i> , <i>Brassicaceae</i> , genetická variabilita, RT-qPCR, kvantitativní PCR
Počet stran	42
Počet příloh	0
Jazyk	čeština

SOUHRN

Bakalářská práce se zabývá virem infikujícími brukvovitou zeleninu (r. *Brassica*) se zaměřením na *Turnip mosaic virus* (TuMV) a jeho hostitelský okruh.

V teoretické části práce jsou popisovány hlavní viry rostlin rodu *Brassica* se zaměřením na jejich taxonomické zařazení, geografické rozšíření, hostitelský okruh, příznaky infekce, přenos a šíření a molekulární vlastnosti. Konkrétně se jedná o *Cauliflower mosaic virus*, *Turnip yellow mosaic virus* a *Turnip yellows virus*. Zvláštní důraz je kladen na *Turnip mosaic virus*, u kterého jsou jednotlivé vlastnosti popsány podrobněji, charakterizována je také genetická variabilita a metody detekce. Závěr teoretické části je věnován metodě kvantitativní PCR a jejímu využití v detekci rostlinných virů.

Experimentální část byla zaměřena na detekci a následnou charakterizaci získaných izolátů TuMV. Pomocí sekvenování a fylogenetické analýzy byla zjištěna genetická variabilita 11 izolátů TuMV pocházejících z různých oblastí České republiky. Dále byla vyvinuta a optimalizována metoda detekce TuMV pomocí RT-kvantitativní PCR, která zahrnovala navržení primerů, optimalizaci teploty nasedání primerů a koncentrace primerů a absolutní kvantifikaci s využitím SYBR Premix Ex Taq™.

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Klára Vlková
Title	Viruses of <i>Brassicaceae</i> vegetable plants (g. <i>Brassica</i>) with the focus to the <i>Turnip mosaic virus</i> and its host range
Type of thesis	bachelor
Department	Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc
Supervisor	Mgr. Dana Šafařová, Ph.D.
The year of presentation	2020
Keywords	<i>Turnip mosaic virus</i> , <i>Brassicaceae</i> , genetic variability, RT-qPCR, quantitative PCR
Number of pages	42
Number of appendices	0
Language	Czech

SUMMARY

This bachelor thesis deals with viruses of *Brassicaceae* vegetable plants (g. *Brassica*) with the focus on the *Turnip mosaic virus* and its host range.

In the theoretical part the main viruses of the genus *Brassica* are described with the focus on their taxonomic classification, geographical distribution, host range, infection symptoms, transmission and spread and molecular properties. Specifically, it is *Cauliflower mosaic virus*, *Turnip yellow mosaic virus* and *Turnip yellows virus*. Special emphasis is placed on the *Turnip mosaic virus*, in which the properties are described in more detail and the genetic variability and detection methods are also characterized. The end of the theoretical part is devoted to the quantitative PCR method and its use in the detection of plant viruses.

The experimental part was focused on detection and subsequent characterization of obtained TuMV isolates. Sequencing and phylogenetic analysis revealed the genetic variability of 11 TuMV isolates from different regions of the Czech Republic. The TuMV detection method was developed and optimized using RT-quantitative PCR, which included primer design, optimization of primer annealing temperature and primer concentration and virus absolute quantification using SYBR Premix Ex Taq™.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Dany Šafářové, Ph.D. za použití uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci

podpis:

Děkuji Mgr. Daně Šafářové, Ph.D. za odborné vedení práce, věnovaný čas, trpělivost, a pomoc při vypracování bakalářské práce. Dále děkuji paní laborantce Janě Veselské za pomoc v laboratoři. Tato práce byla realizována za podpory projektu QK1910070 Národní agentury pro zemědělský výzkum (NAZV).

OBSAH

1	Úvod.....	1
2	Cíl práce	2
3	Literární přehled	3
3.1	Viry infikující brukvovitou zeleninu (r. <i>Brassica</i>)	3
3.1.1	<i>Cauliflower mosaic virus</i> (virus mozaiky kvěťáku, CaMV)	3
3.1.2	<i>Turnip yellow mosaic virus</i> (virus žluté mozaiky vodnice, TYMV).....	4
3.1.3	<i>Turnip yellows virus</i> (virus žloutenky vodnice, TuYV)	5
3.2	<i>Turnip mosaic virus</i> (virus mozaiky vodnice, TuMV)	6
3.2.1	Charakteristika čeledi <i>Potyviridae</i>	6
3.2.2	Charakteristika rodu <i>Potyvirus</i>	6
3.2.3	Geografické rozšíření TuMV	7
3.2.4	Hostitelský okruh TuMV	7
3.2.5	Příznaky infekce TuMV	8
3.2.6	Přenos a šíření viru TuMV.....	9
3.2.7	Molekulární vlastnosti TuMV	9
3.2.8	Genetická variabilita TuMV	10
3.2.9	Detekce TuMV	11
3.3	Kvantitativní PCR v detekci rostlinných virů	12
4	Materiál a metody	14
4.1	Biologický materiál.....	14
4.2	Použité chemikálie, soupravy a roztoky	14
4.3	Seznam použitých přístrojů a zařízení	15
4.4	Použité experimentální a vyhodnocovací postupy	16
4.4.1	Izolace RNA.....	16
4.4.2	Reverzní transkripce	17

4.4.3	PCR detekce TuMV	17
4.4.4	Elektroforéza PCR produktů v agarózovém gelu.....	18
4.4.5	Izolace PCR produktu z gelu	18
4.4.6	Sekvenování PCR fragmentů	19
4.4.7	Bioinformatická analýza	19
4.4.8	Optimalizace podmínek nasedání primerů pro qPCR	20
5	Výsledky	24
5.1	Genetická variabilita získaných izolátů TuMV	24
5.2	Optimalizace podmínek kvantitativní PCR (qPCR)	26
6	Diskuze.....	33
7	Závěr	35
8	Literatura	36

SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

BWYV	virus západní mozaiky řepy, <i>Beet western yellows virus</i>
CaMV	virus mozaiky květáku, <i>Cauliflower mosaic virus</i>
cDNA	komplementární DNA
CuMV	virus mozaiky okurky, <i>Cucumber mosaic virus</i>
dEPC	diethylpyrokarbonát
dH ₂ O	destilovaná voda
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
LMV	virus mozaiky salátu, <i>Lettuce mosaic virus</i>
PCR	polymerázová řetězová reakce, <i>polymerase chain reaction</i>
PPV	virus šarky švestky, <i>Plum pox virus</i>
PSbMV	virus semenem přenosné mozaiky hrachu, <i>Pea seed-borne mosaic virus</i>
PVY	Y virus bramboru, <i>Potato virus Y</i>
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce, <i>quantitative polymerase chain reaction</i>
RNA	ribonukleová kyselina
rpm	relativní centrifugační síla vyjádřená v jednotce rpm, tj. <i>revolutions per minute</i> = otáčky za minutu
RT	reverzní transkripce
ssRNA	jednovláknová RNA, <i>single-stranded RNA</i>
TSWV	virus bronzovitosti rajčete, <i>Tomato spotted wilt virus</i>
TuMV	virus mozaiky vodnice, <i>Turnip mosaic virus</i>
TuYV	virus žloutenky vodnice, <i>Turnip yellows virus</i>
TYMV	virus žluté mozaiky vodnice, <i>Turnip yellow mosaic virus</i>

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Fylogenetický strom izolátů TuMV sestavený na základě nukleotidových sekvencí genu pro plášťový protein.

Obrázek 2: Optimalizace teploty nasedání primerů pro primery (A) TuMV1F/TuMV1R a (B) TuMV1F/TuMV2R.

Obrázek 3: Optimalizace koncentrace primerů v amplifikaci pomocí MyTaq polymerázy a barviva SYBR Green pro koncentrace primerů (A) $0,2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a (B) $0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Obrázek 4: Optimalizace teploty nasedání primerů TuMV1F/TuMV1R pro detekci viru pomocí SYBR Premix Ex Taq™ kitu.

Obrázek 5: Optimalizace koncentrace primerů pro amplifikaci za použití SYBR Premix Ex Taq™ kitu.

Obrázek 6: Ověření spolehlivosti detekce TuMV pomocí primerů TuMV1F/TuMV1R za použití zředovací řady (10x) standardu, TuMV rekombinantního plazmidu.

Obrázek 7: Kalibrační křivka sestavená na základě ředění standardu, TuMV rekombinantního plazmidu.

Obrázek 8: Příklad průběhu kvantitativní PCR u vybraných izolátů TuMV.

Obrázek 9: Analýza teploty tání PCR produktů.

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Seznam testovaných TuMV pozitivních vzorků.

Tabulka 2: Sekvence použitých TuMV detekčních primerů.

Tabulka 3: Reakční podmínky pro TuF 8705–8726/TuR 9690–9669 PCR amplifikaci.

Tabulka 4: Reakční podmínky pro sekvenační značení.

Tabulka 5: Reakční podmínky gradientové PCR za použití detekčních primerů TuMV1F/TuMV1R a TuMV1F/TuMV2R.

Tabulka 6: Složení qPCR reakční směsi s MyTaq polymerázou a SYBR Green pro různé koncentrace primerů.

Tabulka 7: Reakční podmínky qPCR za použití MyTaq polymerázy a SYBR Green.

Tabulka 8: Složení qPCR reakční směsi pro kit SYBR Premix Ex Taq™.

Tabulka 9: Reakční podmínky gradientové PCR za použití detekčních primerů TuMV1F/TuMV1R a kitu SYBR Premix Ex Taq™.

Tabulka 10: Reakční podmínky qPCR pro SYBR Premix Ex Taq™.

Tabulka 11: Teoretické a detekované počty kopií zředovací řady standardu, TuMV rekombinantního plazmidu v 1 µl.

Tabulka 12: Spolehlivost detekce primery TuMV1F/TuMV1R ve vzorcích odlišného původu.

Tabulka 13: Detekované počty kopií vybraných izolátů TuMV pomocí qPCR.

1 ÚVOD

Rostliny rodu *Brassica* jsou významnými hospodářskými plodinami pěstovanými po celém světě. Častým patogenem brukvovitých plodin je *Turnip mosaic virus*, zástupce čeledi *Potyviridae*, u kterého došlo v průběhu času ke genetickému rozrůznění a přizpůsobení se různým hostitelům. Dnes se proto vyskytuje celosvětově, má široký okruh hostitelů a u brukvovitých plodin způsobuje významné hospodářské ztráty. Dalšími známými viry infikujícími brukvovité rostliny jsou *Cauliflower mosaic virus*, *Turnip yellows virus* nebo *Turnip yellow mosaic virus*.

Ve virologii je zapotřebí použití spolehlivých metod detekce virové infekce, v posledních letech se pro detekci kromě DAS-ELISA testu a konvenčních PCR technik používá také kvantitativní PCR. Její oblíbenost spočívá především v jednoduchosti, vysoké citlivosti a rychlosti reakce. Další výhodou je snížení rizika kontaminace při vyhodnocování, protože výsledek reakce je možné sledovat již v průběhu reakce.

2 CÍL PRÁCE

Cílem této bakalářské práce bylo (i) vypracovat literární rešerši charakterizující viry napadající brukvovitou zeleninu se zaměřením na TuMV a jeho hostitelský okruh, (ii) stanovit genetickou variabilitu získaných izolátů TuMV a (iii) vyvinout a optimalizovat metodu detekce TuMV pomocí RT-kvantitativní PCR.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Viry infikující brukvovitou zeleninu (r. *Brassica*)

Rostliny rodu *Brassica* patří mezi významné hospodářské plodiny, brukev řepka (*Brassica napus*) je hned po sóji (*Glycine max* L.) druhou nejvýznamnější olejninou na světě. Dalšími důležitými plodinami této skupiny jsou např. brukev zelná (*Brassica oleraceae*), zelí hlávkové (*Brassica oleracea* convar. *capitata* L.), kapusta hlávková (*Brassica oleracea* var. *sabauda* L.), květák (*Brassica oleracea* var. *botrytis*), brokolice (*Brassica oleracea* var. *italica*), kedluben (*Brassica oleracea* var. *gongylodes* L.), pekingské a čínské zelí (*Brassica rapa* var. *pekinensis* / *chinensis* L.), vodnice (*Brassica rapa* var. *rapa* L.) nebo tuřín (*Brassica napus* subsp. *napobrassica* L.). Tato velmi rozmanitá skupina sezónních plodin zahrnuje jednoleté i dvouleté rostliny (Gupta, 2016), které nacházejí využití v zemědělství, jako významná složka lidské stravy nebo jako potrava pro hospodářská zvířata, některé slouží k produkci průmyslových nebo potravinářských olejů.

Důležitými prvky je tak kvalita produkce a zároveň vysoký výnos brukvovitých zelenin. Kvalita produkce a výnos může být ovlivňován řadou faktorů, kromě nevyhovujících podmínek pro pěstování se na jejich snižování podílejí také onemocnění způsobená různými patogeny. Nejvýznamnější virové infekce vyvolávají čtyři viry, a to *Cauliflower mosaic virus* (virus mozaiky květáku, CaMV), *Turnip yellow mosaic virus* (virus žluté mozaiky vodnice, TYMV), *Turnip yellows virus* (virus žloutenky vodnice, TuYV) a *Turnip mosaic virus* (virus mozaiky vodnice, TuMV). Mezi další významné viry infikující rostliny rodu *Brassica* patří *Cucumber mosaic virus* (virus mozaiky okurky, CuMV), *Lettuce mosaic virus* (virus mozaiky salátu, LMV) nebo *Tomato spotted wilt virus* (virus bronzovitosti rajčete, TSWV). Rostliny mohou být infikovány jedním virem, avšak velmi časté jsou směsné infekce, kdy je rostlina napadena dvěma nebo více druhy virů (Moreno a kol., 2004).

3.1.1 *Cauliflower mosaic virus* (virus mozaiky květáku, CaMV)

Virus mozaiky květáku je prvním rostlinným virem, u kterého byla jako nositelka dědičné informace identifikována dvouvláknová DNA (Shepherd a kol., 1970). Pro virus je typická neobalená kulovitá částice s ikozahedrickým uspořádáním a s průměrem okolo 53 nm. Je zařazován do rodu *Caulimovirus*, který je jedním ze šesti rodů čeledi *Caulimoviridae* (Haas a kol., 2002). Infekce tímto virem byly zaznamenány po celém světě (Yasaka a kol., 2014). Jednotlivé izoláty infikují užší okruh hostitelů, především rostliny

z čeledi *Brassicaceae*, některé zástupce čeledi *Solanaceae* a některé izoláty mohou experimentálně infikovat i *Arabidopsis thaliana*. V závislosti na typu izolátu, typu hostitele a podmínkách prostředí jsou projevy infekce nejrůznějšího charakteru – chlorózy, nekrózy, mozaiky, prosvětlení žilek aj. (Melcher, 1989). Virus je přenášen neperzistentním způsobem (pouze na povrchu stiletu) několika druhy mšic, např. mšicí broskvoňovou (*Myzus persicae*). U neperzistentního způsobu přenosu CaMV byla identifikována pomocná strategie, kdy jsou virem kódovány pomocné proteiny P2 a P3, které interagují s receptory umístěnými ve stiletu mšic (Hoh a kol., 2010).

CaMV byl prvním rostlinným virem, u kterého bylo provedeno celogenomové sekvenování (Franck a kol., 1980). Genom tvoří kruhová molekula dsDNA o velikosti okolo 8 000 bp. Virus využívá pro svou replikaci strategii typickou pro pararetroviry, virová dvouvláknová DNA je nejdříve přepsána do RNA a následně pomocí reverzní transkriptázy přepsána zpět do dsDNA (Hohn a kol., 1985).

3.1.2 Turnip yellow mosaic virus (virus žluté mozaiky vodnice, TYMV)

Turnip yellow mosaic virus má obalenou kulovitou ikozahedrickou částici s průměrem okolo 28 nm, která obsahuje (+)ssRNA. Virus je řazen do čeledi *Tymoviridae* a rodu *Tymovirus*. Pochází z Evropy, kromě tohoto kontinentu je rozšířen i v Asii nebo Austrálii. Název viru je odvozen od typického příznaku infekce – výrazných žlutých skvrn, které se vytvářejí na infikovaných listech. (Dreher, 2004). Virus napadá především rostliny rodu *Brassica*, avšak bylo prokázáno, že v experimentálních podmínkách infikuje i *Arabidopsis thaliana* (Martínez-Herrera a kol., 1994). Přírozeným vektorem je kousavý hmyz – dřepčící rodu *Phyllotreta*. Dalšími vektory jsou někteří zástupci hmyzu živící se hostitelskými rostlinami, jedná se o některé jiné brouky, kobylky, sarančata nebo škvory (Smith, 1977). Dále je virus přenosný i semeny (de Assis Filho a Sherwood, 2000; Hein, 1984) nebo velmi snadno mechanickou inokulací (Markham a Smith, 1949).

Výrazným znakem pozorovaným v infikovaných buňkách je koexistence infekční virové částice a prázdné kapsidy, dále také shlukování chloroplastů. Uvnitř chloroplastů se nacházejí váčky, které vznikly vchlípením membrány a jejichž tvorba byla indukována virovou částicí. Tyto váčky jsou využívány pro replikaci viru (Laflèche a kol., 1972). Genom je tvořen 6,3 kb, přičemž se v genomu vyskytuje výrazný nepoměr C a G bází (38 % C a 18 % G) (Bink a kol., 2002).

3.1.3 *Turnip yellows virus* (virus žloutenky vodnice, TuYV)

Ve starší literatuře je uváděn pod názvem *Beet western yellows virus* (virus západní mozaiky řepy, BWYV). Izoláty viru vykazovaly odlišnou variabilitu a hostitelskou specifitu, kdy evropské izoláty neinfikovaly cukrovou řepu (Graichen a Rabenstein, 1996; Stevens a kol., 1994). Na základě těchto poznatků International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) schválila návrh na reklasifikaci viru, který je nyní rozdělen na dva samostatné druhy – *Beet western yellows virus* (BWYV) a *Turnip yellows virus* (TuYV) (Mayo, 2002). Virová částice TuYV je kulovitá, obalená o průměru okolo 25 nm a obsahuje (+)ssRNA, virus je zařazen do rodu *Potyvirus* a čeledi *Luteoviridae*. Virus je rozšířen celosvětově.

TuYV má poměrně široký hostitelský okruh, infikuje minimálně 13 rostlinných čeledí, nejvíce však rostliny z čeledi *Brassicaceae* a *Fabaceae*. Virus napadá kromě planě rostoucích rostlin i hospodářsky významné plodiny, infekce způsobuje velké hospodářské ztráty v produkci řepky olejky (*Brassica napus* L.) (Jay a kol., 1999; Milošević a kol., 2016; Smith a Hinckes, 1985) a lociky seté (*Lactuca sativa*) (Walkey a Pink, 1990). Infekce virem se projevuje nejrůznějšími symptomy, které mohou být snadno zaměněny za příznaky způsobené stresem či nedostatkem některých důležitých živin – jedná se o zčervenání okrajů listů, žloutnutí až zčervenání žilek či zakrslý vzrůst rostlin. Avšak někdy se infekce neprojevuje viditelnými symptomy, zůstává tak bez povšimnutí (Stevens a kol., 2008). Virus je přenášen perzistentním způsobem, za hlavního přenašeče viru je považována mšice broskvoňová (*Myzus persicae*), virová infekce je omezena na floém hostitelských rostlin (Boissinot a kol., 2017).

3.2 *Turnip mosaic virus* (virus mozaiky vodnice, TuMV)

Virus mozaiky vodnice neboli *Turnip mosaic virus* (TuMV) je celosvětově rozšířený vláknitý virus s velikostí částice okolo 720 nm. Patří do čeledi *Potyviridae* a rodu *Potyvirus* (Tomlinson, 1970). Infikuje širokou škálu rostlin, především rostliny z čeledi *Brassicaceae* a je považován za jeden z nejvýznamnějších patogenů těchto kulturních plodin (Walsh a Jenner, 2006).

3.2.1 Charakteristika čeledi *Potyviridae*

Čeď *Potyviridae* je největší skupinou rostlinných RNA virů, do čeledi spadá deset rodů, a to *Bevemovirus*, *Brambyvirus*, *Bymovirus*, *Ipomovirus*, *Macluravirus*, *Poacevirus*, *Potyvirus*, *Roymovirus*, *Rymovirus* a *Tritimovirus* (Viralzone, 2019). Jednotlivé rody se od sebe liší hostitelským okruhem a také strukturou genomu. Virové částice jsou neobalené, vláknité a flexibilní o délce 650–900 nm a průměru 11–15 nm. Genom tvoří (+)ssRNA a jeho velikost se u jednotlivých zástupců pohybuje od 8,2 do 11,3 kb (Wylie a kol., 2017). Zvláštním případem je rod *Bymovirus*, virová částice zástupců rodu obsahuje dvě molekuly (+)ssRNA, které mají velikosti 250–300 a 500–600 nm (Adams a kol., 2012). Zároveň jsou zástupci rodu *Bymovirus* přenášeni především protisty *Polymyxa graminis* (Kashiwazaki a kol., 1991), kdežto zbytek čeledi je přenášen různými zástupci kmene členovců. Unikátním rysem sdíleným všemi druhy čeledi *Potyviridae* je indukce tvorby charakteristických cylindrických 'pinwheel' inkluzních tělísek v cytoplazmě infikovaných buněk (Edwardson, 1974). Tyto inkluze jsou tvořeny virovým CI proteinem ('cylindrical inclusion protein') a jsou využívány pro diagnostiku zástupců čeledi (Sorel a kol., 2014).

3.2.2 Charakteristika rodu *Potyvirus*

Rod *Potyvirus* je nejpočetnější ze všech deseti rodů čeledi *Potyviridae*, spadá do něj většina zástupců čeledi a podle nejnovějších dat z International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV, 2019) je v rodu zařazeno celkem 175 druhů. Skupina je pojmenována podle svého typického zástupce – *Potato virus Y* (Y virus bramboru, PVY). Potyviry jsou přenášeny neperzistentním způsobem více než 200 druhy mšic, někteří zástupci se mohou šířit také semeny. Pro zařazení do skupiny musí viry splňovat charakteristiky, jako jsou vláknité částice odpovídající velikosti, neperzistentní způsob přenosu mšicemi, tvorba 'pinwheel' inkluzí v cytoplazmě a možnost je sérologicky odlišit od morfologicky podobných virů.

Hospodářsky významnými zástupci jsou *Potato virus Y* (Y virus bramboru, PVY), *Plum pox virus* (virus šarky švestky, PPV), *Pea seed-borne mosaic virus* (virus semenem přenosné mozaiky hrachu, PSbMV) nebo *Turnip mosaic virus* (virus mozaiky vodnice, TuMV).

3.2.3 Geografické rozšíření TuMV

Na základě výsledků testování vzorků infikovaných rostlin z 28 zemí světa byl *Turnip mosaic virus* zařazen jako druhý nejvýznamnější virus infikující polní zeleninu hned po *Cucumber mosaic virus* (CuMV) (Tomlinson, 1987). První zmínky o TuMV pochází z roku 1921 z území Indiany a Washingtonu ve Spojených státech, kdy byl nezávisle na sobě objeven dvěma vědeckými týmy (Gardner a Kendrick, 1921; Schultz, 1921). Dnes je rozšířen pravděpodobně celosvětově, vyskytuje se v mírném i subtropickém pásu v Africe, Asii, Evropě, Oceánii, Severní a Jižní Americe (Ohshima a kol., 2002; Schwinghamer a kol., 2014). Byl dokonce prvním rostlinným virovým patogenem identifikovaným na území ostrova Islandu (Kegler a kol., 1998). V roce 1990 byl virus poprvé detekován v České republice (Špak a Kubelková, 1990).

3.2.4 Hostitelský okruh TuMV

Oproti jiným zástupců čeledi *Potyviriidae* je TuMV schopen infikovat velmi široký okruh hostitelů. Poprvé byl popsán v čínském zelí (*Brassica campestris* ssp. *chinensis*), japonské hořčici (*Brassica japonica*) a vodnici (*Brassica campestris* ssp. *rapa*) ve Spojených státech (Schultz, 1921). Napadá kulturní i planě rostoucí rostliny. Je známo, že infikuje nejméně 318 druhů ve více než 43 čeledích dvouděložných rostlin, včetně *Brassicaceae*, *Asteraceae*, *Chenopodiaceae*, *Fabaceae* a *Caryophyllaceae*, ale infikuje také jednoděložné rostliny (Blancard a kol., 2006; Tomlinson, 1970; Walsh a Jenner, 2002). Nejčastějším hostitelem jsou rostliny čeledi *Brassicaceae*, běžně infikuje květák, hlávkovou kapustu, růžičkovou kapustu, brokolici, tuřín, vodnici, brukev řepku, ředkev, křen, čínské zelí nebo řeřichu (Sutic a kol., 1999). TuMV se rychle přizpůsobuje prostředí, proto se jeho hostitelský okruh velmi rychle rozšiřuje a zahrnuje nové netypické rostliny, jako jsou např. lilie (r. *Lilium*) (Bellardi a Bertaccini, 2001), cizrna (r. *Cicer*) (Schwinghamer a kol., 2007), orchidej *Phalaenopsis* (Zheng a kol., 2008), *Pachycladon* (Fletcher a kol., 2010) nebo mochnyně dužnoplodá (*Physalis philadelphica*) (Liu a kol., 2012).

3.2.5 Příznaky infekce TuMV

Infekce vyvolaná TuMV se projevuje odlišně především v závislosti na typu izolátu a typu hostitelské rostliny. Infekce virem je systémová, dochází k tvorbě mozaik a nekróz. Typickým projevem je chlorotická mozaika, která zpravidla postihuje velkou část rostliny. Skvrny mohou mít kruhovitý nebo nepravidelný tvar, u nejstarších listů většinou dochází k jejich výraznému zežloutnutí po celé ploše (Moreno a Fereres, 2012). Nekrotická reakce se naopak projevuje deformacemi a následným odumíráním postižených pletiv. Mozaikové reakce většinou nemají za důsledek odumření rostlin, avšak dochází k jejich oslabení, tudíž jsou náchylnější na sekundární infekce způsobené dalšími patogeny. Nekrózy jsou pro některé rostliny letální. Uvedené symptomy se mohou projevovat na jedné rostlině odděleně v různých časových obdobích, některé izoláty však vyvolávají oba typy příznaků současně (Tomlinson a Ward, 1978; Walsh a Tomlinson, 1985). Při současném projevu obou typů příznaků může docházet k symptomům, jako jsou černé nekrotické prstence, skvrnitost a prosvětlení žilek (Shattuck, 1992).

Infekce způsobuje významné ekonomické ztráty u zelí, vodnice, tuřínu, hořčice a ředkve. Nejnáchylnější na infekci je zelí, u kterého vznikají příznaky, jako jsou zakrslost, prosvětlování žilek spojené s mramorováním listu v jejich okolí, skvrnitost, černé nekrotické léze a nekrotické prstence (Tompkins a Thomas, 1938; Walkey a Pink, 1988). Častým jevem je vznik nekróz uvnitř hlávek zelí při jejich dlouhodobém skladování. Zároveň byla pozorována nižší hmotnost infikovaných zelných hlávek oproti zdravým (Walkey a Webb, 1978; Walkey and Neely, 1980). Významné ztráty jsou pozorovány i u tuřínu. Infikované kořeny tuřínu jsou malé, dochází k jejich deformacím, v některých místech jsou zúžené a připomínají svým tvarem „husí krk“. Při časně infekci rostliny v době do dvanácti týdnů od vysetí jsou kořeny tuřínu pro konzumaci nebo další zpracování nepoužitelné (Shattuck a kol., 1989).

Směsné virové infekce jsou u rostlin rodu *Brassica* běžné. V případě TuMV bylo zjištěno, že v kombinaci s CaMV dochází k zesílení projevů infekce, zároveň je tato směsná infekce nejčastější. TYMV naopak ve směsné infekci s TuMV projevy infekce zmírňuje, TuYV se na změně intenzity projevu symptomů s TuMV nepodílí (Raybould a kol., 1999; Spence a kol., 2007). Kromě virových směsných infekcí bylo např. zjištěno, že vzájemně dochází k zesilování projevů infekce u TuMV a houbového patogenu *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*, který je také významným infekčním agens brukvovitých rostlin (Reyes a Chadha, 1972).

3.2.6 Přenos a šíření viru TuMV

Stejně jako ostatní zástupci čeledi *Potyviriidae* je virus přenášen neperzistentním způsobem mšicemi. Poprvé byl přenos mšicemi identifikován u mšice broskvoňové (*Myzus persicae*). Jako velmi efektivní byl také potvrzen přenos viru mšicí zelnou (*Brevicoryne brassicae* L.) (Clayton, 1930). Je známo více než 89 druhů mšic, kterými může být virus přenášen (Edwardson a Christie, 1986). Při interakci vektor a hostitel dochází k vzájemnému ovlivňování. Bylo zjištěno, že mšice *Lipaphis erysimi*, které také přenášejí TuMV, se rychleji množí na rostlinách infikovaných TuMV ve srovnání s rostlinami zdravými. U mšice broskvoňové (*Myzus persicae*) tento jev potvrzen nebyl (Adachi a kol., 2018). Virus není jinými druhy hmyzu běžně přenášen. Dosud nebyl potvrzen přenos viru semenou, jeho rezervoárem jsou infikované plodiny a planě rostoucí rostliny. V experimentálních podmínkách bylo zjištěno, že je virus velmi dobře přenosný mechanickou inokulací (Gardner a Kendrick, 1921; Hoggan a Johnson, 1935).

3.2.7 Molekulární vlastnosti TuMV

Turnip mosaic virus má pozitivně orientované vlákno RNA, tj. (+)ssRNA, které má na svém 5' konci, stejně jako jiní zástupci čeledi *Potyviriidae*, připojený virem kódovaný protein (VPg) s funkcí čepičky (Murphy a kol., 1991), 3' konec RNA je polyadenylovaný (Tremblay a kol., 1990). První úplná sekvence TuMV byla stanovena v roce 1992. Genom s velikostí okolo 9 830 nukleotidů obsahuje jeden velký otevřený čtecí rámec (ORF) o velikosti 9 489 bp a malou nekódující oblast (NCR) s velikostí 129 bp (Nicolas a Laliberté, 1992). Velký čtecí rámec genomu TuMV kóduje primární produkt – polyprotein o velikosti 358 kDa, který je dále štěpen virem kódovanými proteázami na celkem 10 funkčních proteinů. Od N- k C- konci polyproteinu jsou za sebou funkční proteiny řazeny následovně: P1 protein, HC-Pro ('helper component' proteáza), P3 protein, 6K1 peptid, CI ('cylindrical inclusion' protein), 6K2 peptid, NIa-VPg ('viral genome-linked' protein), NIa-Pro ('nuclear inclusion body' a-proteáza), NIb ('nuclear inclusion body b' s funkcí RNA-dependentní RNA polymerázy) a CP (plášťový protein) (Riechmann a kol., 1992).

V genomu TuMV byl objeven i druhý, malý čtecí rámec označovaný jako 'PIPO' ('Pretty Interesting Potyviriidae ORF'). Tento čtecí rámec se nachází v genomu v pozici 3 079 až 3 258 v překryvu s oblastí kódující polyprotein, konkrétně s oblastí pro P3 protein. Bylo zjištěno, že je nezbytný pro životaschopnost viru. I při plně funkčním polyproteinu jsou následky pro virus letální, pokud dojde k mutaci v oblasti 'PIPO' ORF (Chung a kol., 2008).

3.2.8 Genetická variabilita TuMV

Předpokládá se, že ke vzniku a rozrůznění TuMV došlo v uplynulých tisíci letech, pravděpodobně z předka společného s dnešním izolátem TuMV infikujícím orchideje – TuMV OM. S aktivním zemědělstvím došlo k jeho přenosu na rostliny čeledi *Brassicaceae* a specializaci na tohoto hostitele (Nguyen a kol., 2013b). Původní rozlišení izolátů se soustředilo především na hostitelskou specifitu a interakci s geny rezistence. Na základě toho byly izoláty rozdělovány do skupin označovaných C₁–C₈ podle odlišností pozorovaných u čínského zelí (Green a Deng, 1985; Provvidenti, 1980). Dále byly také izoláty rozlišovány na různé patotypy (Jenner a Walsh, 1996) nebo sérotypy (Jenner a kol., 1999; Stabolone a kol., 1998).

Později byla větší pozornost věnována genetické variabilitě, a to na úrovni RNA i proteinů. Byla studována variabilita především oblasti genu pro plášťový protein (Ohshima a kol., 2002; Sánchez a kol., 2003) nebo celého polyproteinu (Farzadfar a kol., 2008; Tomimura a kol., 2003). Izoláty TuMV tak byly přerozděleny na základě fylogenetických vztahů do čtyř základních skupin – World-B, basal-B, basal-BR, Asian-BR, kdy jako nejvariabilnější a nejpůvodnější z nich byla identifikována skupina basal-B; a později byla doplněna skupina Orchis. Izoláty patotypu B infikují především rostliny rodu *Brassica* a téměř neinfikují rostliny rodu *Raphanus* a izoláty patotypu BR infikují rostliny rodu *Brassica* i *Raphanus* (Ohshima a kol., 2002; Tan a kol., 2004; Tomimura a kol., 2003). V jednotlivých fylogenetických skupinách se vyvíjejí izoláty podle geografického rozšíření a také podle hostitelů, nejsou však známy změny v nukleotidových nebo aminokyselinových sekvencích, které by tyto preference způsobovaly (Tomimura a kol., 2003). Zároveň dochází do jisté míry k prolínání patotypů skupiny World-B, ve které se vyvíjejí v menším zastoupení i izoláty patotypu BR (Ohshima a kol., 2002; Tomimura a kol., 2003). Bylo zjištěno, že euroasijské izoláty vykazují poměrně velkou variabilitu, nejvzdálenější evropské a asijské izoláty TuMV vykazují vzájemnou identitu úplných anebo částečných nukleotidových sekvencí okolo 77 % a kolem 88 % v aminokyselinových sekvencích (Tomimura a kol., 2003).

Hlavním procesem zvyšující genetickou variabilitu TuMV je rekombinace, která je běžná uvnitř i mezi liniemi. Bylo zjištěno, že rekombinace je u TuMV velmi častá, zejména v P1 oblasti a na rozhraní jednotlivých genů polyproteinu, byl popsán výskyt až 65–76 % rekombinantních izolátů ve srovnání s jejich celkovým počtem, nejčastěji se jedná o izoláty původem z asijských zemí spadající do hostitelské skupiny BR (Farzadfar a kol., 2008; Nguyen a kol., 2013b; Ohshima a kol., 2007; Tan a kol., 2004).

3.2.9 Detekce TuMV

Virové částice TuMV a typická 'pinwheel' inkluzní tělíska v infikovaných buňkách je možné identifikovat za použití elektronového mikroskopu (Hiebert a McDonald, 1973) či v reakci s protilátkami pomocí imunoelektronové mikroskopie (Walkey a Webb, 1984), nicméně pro rutinní detekci TuMV nejsou tyto metody příliš využívány. Standardně používanou metodou pro detekci TuMV je DAS-ELISA test, metoda je založena na interakci viru s protilátkami, komplex protilátka-virus-protilátka-enzym je vizualizován přidáním substrátu, který je rozkládán enzymem na barevný produkt (Jenner a kol., 1999; Richter a kol., 1994). Dalšími metodami využívajícími pro detekci viru protilátky jsou Western blot nebo 'Tissue Blot Immunoassay' (TBIA). Při detekci pomocí Western blottingu jsou používány nejčastěji protilátky specifické pro plášťový protein TuMV (Ling a kol., 1995; Suehiro a kol., 2004). TBIA je rychlá a spolehlivá metoda často využívaná pro detekci rostlinných virů, při které je šťáva z čerstvých rostlinných pletiv přenesena přímo na nitrocelulózovou membránu, která je inkubována s odpovídajícími protilátkami a následně je reakce vizualizována přidáním chromogenního substrátu (Chang a kol., 2011; Lin a kol., 1990).

Nejspolehlivější metody detekce TuMV jsou založeny na detekci nukleové kyseliny, jedná se o RT-PCR a RT-qPCR, obecně jsou to rychlé metody na provedení, nicméně časově náročné je samotné navržení a optimalizace metody pro věrohodné a opakovatelné výsledky (Espy a kol., 2006; McIngvale a kol., 2002). Detekce TuMV pomocí PCR zahrnuje izolaci celkové RNA z rostliny, reverzní transkripci za vzniku cDNA pomocí random primerů, oligo(dT) primeru nebo specifických primerů, samotnou PCR amplifikaci a její vyhodnocení. Pro amplifikaci je velmi často využívána oblast plášťového proteinu a to pravděpodobně proto, že plášťový protein plní několik důležitých funkcí – obaluje virovou RNA, hraje roli v regulaci replikace, podílí se na přenosu viru mšicemi nebo na pohybu viru v rostlině (Urcuqui-Inchima a kol., 2001). V případě konvenční PCR jsou amplifikovány produkty o velikosti okolo 700–1 000 bp, které jsou následně detekovány např. pomocí elektroforetické separace (Cai a kol., 2007; Sánchez a kol., 2003; Zhao a kol., 2013). Rychlejší a citlivější metoda je detekce TuMV pomocí kvantitativní PCR (buď jedнокroková nebo dvoukroková RT-qPCR), kdy je virová nukleová kyselina amplifikována specifickými primery, pro detekci je také používána oblast genu pro plášťový protein TuMV (Kamitani a kol., 2019; Martín a Elena, 2009; Vijayan a kol., 2017).

3.3 Kvantitativní PCR v detekci rostlinných virů

Detekce virů založená na PCR je rychlá a spolehlivá metoda. Kromě klasické PCR je pro zjišťování přítomnosti virových částic používána také kvantitativní PCR (qPCR). Při qPCR je možné sledovat průběh reakce spolu s nárůstem množství DNA v každém cyklu, a proto je oproti klasické PCR možné stanovit přesné množství DNA či RNA (použitím RT-qPCR) (Freeman a kol., 1999). Detekce nukleové kyseliny je umožněna použitím fluorescenčních barviv nebo sond v reakci, které interagují s DNA a jejichž signál je v průběhu reakce monitorován pomocí speciálního termocykléru. Samotná fluorescenční barviva jsou nespecifická a interagují s jakoukoliv dvouvláknovou DNA, pokud se v reakci vyskytuje DNA jednovláknová, k navázání barviva nedojde. Nejpoužívanější fluorescenční technologií je SYBR Green, i přes svou nespecifickou vazbu na DNA. Dále mohou být při qPCR používány fluorescenční sondy obsahující sekvence komplementární k detekovanému úseku DNA, které zvyšují specifitu reakce, používány jsou např. TaqMan, Scorpion nebo FRET sondy (Mirmajlessi a kol., 2015).

Při kvantitativní PCR jsou amplifikovány krátké úseky DNA většinou o velikosti 70–100 bp, čímž je zajištěna vyšší efektivita reakce. Zároveň je metoda rychlejší, jelikož není nutné PCR produkt dále detekovat, např. pomocí elektroforetické separace či kolorimetrických reakcí (Sun a kol., 2018). Metoda (ať už za použití SYBR Green nebo sond) je velmi citlivá, jelikož jsou detekovány i velmi nízké koncentrace nukleové kyseliny ve vzorku, např. ve srovnání s ELISA testem bylo zjištěno, že je detekce pomocí qPCR asi 1 000x citlivější (Boben a kol., 2007).

Existují dva přístupy, které jsou používány pro stanovení množství templátové DNA na základě průběhu reakce ve vzorcích o známé vstupní koncentraci – absolutní a relativní kvantifikace. Absolutní kvantifikace umožňuje stanovení přesného počtu kopií cílového fragmentu, je založena na použití standardů o známé koncentraci. Ze standardů je sestrojena kalibrační křivka a koncentrace neznámých vzorků jsou z kalibrační křivky odečítány pomocí hodnot Ct. Tento způsob vyhodnocení qPCR je často používán v mikrobiologii pro stanovení výchozího počtu kopií studovaných mikroorganismů (Becker-André a Hahlbrock, 1989; Pfaffl a Hageleit, 2001). Relativní kvantifikace je obvykle využívána ke stanovení genové exprese. Míra genové exprese je vztahována k vnitřnímu standardu, tzv. house-keeping genu, jehož exprese je v průběhu reakce ve všech vzorcích konstantní. Pro výpočet relativní kvantifikace je nejčastěji používána komparativní metoda delta-delta ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) (Livak a Schmittgen, 2001) nebo metoda podle Pfaffla (Pfaffl, 2001).

Metoda detekce pomocí kvantitativní PCR je v rostlinné virologii využívána stále častěji, můžeme detekovat různé druhy virů a zároveň od sebe odlišit i jednotlivé izoláty. U virů brukvovitých zelenin je známé především využití qPCR u *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) v souvislosti s testováním GMO rostlin. Nejedná se přímo o detekci CaMV, ale o detekci 35S promotoru CaMV, který se ve většině případech využívá pro transformaci rostlin (Hull a kol., 2009). U dalších virů brukvovitých rostlin byla metoda detekce a kvantifikace viru pomocí qPCR vyvinuta i pro TYMV (Penazova a kol., 2016), TuYV (Chomic a kol., 2011) nebo TuMV (Martín a Elena, 2009), ve všech případech s využitím oblasti genu pro plášťový protein jako amplifikovaného fragmentu.

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Biologický materiál

K analýze bylo použito 13 vzorků odebraných z různých druhů rostlin čeledi *Brassicaceae* pocházejících z různých lokalit regionu Morava (tabulka 1). U těchto vzorků byla prokázána přítomnost TuMV pomocí DAS-ELISA testu (Bioreba Ltd.) provedeného v Laboratoři molekulární biologie mikroorganismů.

Tabulka 1: Seznam testovaných TuMV pozitivních vzorků.

Označení vzorku	Lokalita	Druh rostliny
10-2019	Pustějov	kedluben bílý
21-2019	Pustějov	kedluben bílý
22-2019	Jistebník	čínské zelí
27-2019	Jistebník	tuřín
39-2019	Jistebník	tuřín
41-2019	Jistebník	křen
47-2019	Sedlnice	tuřín
53-2019	Sedlnice	tuřín
CZEVSE71	Beskydy	křen
K1	Lednice	křen
K3	Lednice	křen
CHK	Česká republika	křen
KA1	Slavonín	květák

4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky

Chemikálie

- β -merkapt ethanol (SERVA, kat. č. 28625.02)
- Agarose ITM (Ambresco, kat. č. 97062-250)
- dNTPs mix (Thermo ScientificTM, kat. č. R0191)
- Ethanol (99,8%) pro UV spektroskopii (Lach-Ner, kat. č. 20025-U99-M1000-1)
- GeneRulerTM 100 bp DNA Ladder (Thermo ScientificTM, kat. č. SM0241)
- GeneRulerTM 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo ScientificTM, kat. č. SM0321)
- GelRed® Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, kat. č. 41002)
- Hoechst 33258 (Thermo ScientificTM, kat. č. H1398)
- Isopropylalkohol p. a. (Lach-Ner, kat. č. 20037-AT0-M1000-1)

- Random primery (Promega Corporation, kat. č. C1181)
- SYBR™ Green I Nucleic Acid Gel Stain – 10 000x v DMSO (Thermo Scientific™, kat. č. S7585)

Roztoky

- 0,1% bromfenolová modř ve 30% glycerolu
- 70% ethanol (701,4 ml 99,8% ethanolu doplnit do 1 000 ml dH₂O)
- Ethidium bromid (Biotium, kat. č. 40042) (koncentrace 5 mg·ml⁻¹)
- 50x TAE (navážit 242 g Tris, odměřit 57,1 ml ledové kyseliny octové a 37,2 ml 0,5mol·l⁻¹ EDTA-Na₂·2H₂O a doplnit do 1 000 ml dH₂O)
- 1x TAE pufr (20 ml 50x TAE doplnit do 1 000 ml dH₂O)
- 10x TNE (navážit 12,11 g Tris, 3,72 g 10mmol·l⁻¹ EDTA-Na₂·2H₂O a 116,89 g NaCl a doplnit do 1 000 ml dH₂O)

Soupravy

- BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Thermo Scientific™, kat. č. 4337455)
- BioScript™ Reverse Transcriptase Kit (Bioline, kat. č. BIO-27036)
- QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, kat. č. 28706)
- MyTaq™ DNA polymerase (Bioline, kat. č. BIO-21105)
- MyTaq™ Red DNA polymerase (Bioline, kat. č. BIO-21108)
- NucleoSpin RNA Plant Kit (Macherey-Nagel, kat. č. 740120.250)
- SYBR Premix Ex Taq™ (Takara Bio Inc., kat. č. RR420Q)

4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

- centrifuga Biofuge pico (Heraeus)
- dokumentační systém G:box se softwarem GeneSnap (Syngene)
- elektroforetická komůrka HU 10 (Scie-Plas)
- fluorometr Hoefer DyNa Quant 200 (Amershan Biosciensis)
- homogenizátor FastPrep-24 (MP Biomedicals)
- laboratorní váhy A&D EK 200G (A&D Co. Ltd.)
- laminární box PV-100 (Telstar)
- mikrovlnná trouba MA 85050 (OTF)
- minicentrifuga Prism Mini Centrifuge (Labnet International)
- spektrofotometr NanoDrop 1000 (Thermo Scientific™)

- termoblok Mixing Block MB-102 (Bioer)
- termocyklér gradientový T-Gradient (Biometra)
- termocyklér pro kvantitativní PCR Rotor-Gene 3000TM (Corbett Research)
- termocyklér T100 (Bio-Rad)
- UV transluminátor UVT-14L (Herolab)
- vortex MS2 Minishaker (IKA)
- výrobce šupinkového ledu IceFlaker GB 903 (Brema)
- zdroj stejnosměrného napětí MP-250V (Major Science) a Power Station 300 (Labnet)

4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

4.4.1 Izolace RNA

Celková RNA byla izolována pomocí NucleoSpin RNA Plant kitu podle modifikovaného postupu výrobce. 80 mg rostlinného materiálu bylo homogenizováno v 700 μl pufru RA1 s přídatkem 7 μl β -merkaptoethanolu pomocí homogenizátoru FastPrep24 třepáním rychlostí 5 $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ po dobu 30 s. Homogenát byl přepipetován na filtr s fialovým kroužkem. Filtr se vzorkem byl centrifugován 1 min při 13 000 rpm. Filtrát byl bez porušení peletu přenesen do čisté mikrozkušavky, bylo přidáno 700 μl ethanolu a vzorek byl promíchán vortexováním. Následně byl vzorek přepipetován na vazebnou membránu kolonky s modrým kroužkem. Byla provedena centrifugace 1 min při 13 000 rpm. Kolonka byla přemístěna do nové jímací zkumavky. Na střed kolonky bylo nanášeno 350 μl MDB pufru a vzorek byl centrifugován 1 min při 13 000 rpm. Do sterilní mikrozkušavky byla připravena směs 10 μl rDNase I a 90 μl DNase reakčního pufru. Z této směsi bylo napipetováno 95 μl na střed kolonky. Kolonka byla inkubována 15 min při pokojové teplotě. Následovala série promývání kolonky, kdy po každém promytí následovala centrifugace 1 min při 13 000 rpm – 200 μl RA2 pufru, 600 μl RA2 pufru a 250 μl pufru RA3. Při každém promývacím kroku byla vždy vyměněna jímací zkumavka za novou. Poté byla kolonka umístěna do nové 'RNase-free' zkumavky a na fritu kolonky bylo aplikováno 60 μl RNase-free vody. Následovala centrifugace 1 min při 13 000 rpm. Mikrozkušavky s uvolněnou RNA byly okamžitě umístěny na led. Koncentrace a čistota RNA byla stanovena spektrofotometricky pomocí NanoDrop 1000.

4.4.2 Reverzní transkripce

Pro získání cDNA byla provedena dvoukroková reverzní transkripce pomocí kitu BioScript s použitím random primerů. Veškerá práce probíhala v laminárním boxu na ledu. Byly připraveny dvě reakční směsi – reakční směs I a II. K reakční směsi I o celkovém objemu 7 μl obsahující 4 μl dEPC H₂O, 1,5 μl 10mmol·l⁻¹ dNTPs mixu a 1,5 μl 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ random primerů byly přidány 3 μl RNA o koncentraci 300 ng· μl^{-1} . Pro rozvolnění RNA byla směs inkubována při 70 °C 5 min. Po uplynutí inkubační doby byly zkumavky se vzorky ihned umístěny na led. K této směsi byla přidána reakční směs II o celkovém objemu 20 μl obsahující 12 μl dEPC H₂O, 6 μl 5x RT-PCR pufru, 1 μl 40U· μl^{-1} inhibitoru ribonukleas a 1 μl 200U· μl^{-1} Bioscript™ reverzní transkriptázy. Celkový objem reakce byl 30 μl . Zkumavky byly vloženy do termocykléru, kde byly inkubovány 10 min při 25 °C, 30 min při 42 °C a následně 5 min při 85 °C. Získaná cDNA byla následně uchovávána při -20 °C.

4.4.3 PCR detekce TuMV

Pomocí primerů TuF 8705–8726 a TuR 9690–9669 (viz tabulka 2) byla amplifikována oblast plášťového proteinu (CP) genomu TuMV. Reakční směs obsahovala 5 μl MyTaq Red reakčního pufru, 17,3 μl deionizované vody, 0,25 μl 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ TuF 8705–8726 primeru, 0,25 μl 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ TuR 9690–9669 primeru a 0,2 μl 5U· μl^{-1} MyTaq polymerázy. K reakční směsi byly přidány 2 μl cDNA vzorku. PCR zkumavky byly vloženy do termocykléru, kde proběhla reakce podle parametrů uvedených v tabulce 3.

Tabulka 2: Sekvence použitých TuMV detekčních primerů.

Primer	Sekvence 5'–3'	Reference
TuF 8705–8726	CAAGCAATCTTTGAGGATTATG	Sánchez a kol., 2003
TuR 9690–9669	TATTTCCATAAGCGAGAATAC	

Tabulka 3: Reakční podmínky pro TuF 8705–8726/TuR 9690–9669 PCR amplifikaci.

	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	2 min	1
Denaturace	95	30 s	35
Nasedání primerů	53	30 s	
Syntéza	72	1 min	1
Dosyntetizování	72	5 min	

4.4.4 Elektroforéza PCR produktů v agarózovém gelu

Separace PCR produktů probíhala v 1% agarózovém gelu. 50 ml rozeřáté agarózy bylo odměřeno do kádinky a ke směsi bylo přidáno 2,5 µl barviva GelRed. Po důkladném rozmíchání barviva byla směs nalita do připravené vaničky s vloženým hřebínkem. Gel tuhnul 15 min při pokojové teplotě, následně minimálně dalších 15 min při 4–6 °C v chladničce. Připravený agarózový gel byl vložen do komůrky, poté byl převrstven 1x TAE pufrům a byl opatrně vyjmut hřebínek. Do první jamky bylo napipetováno 1,5 µl standardu relativní molekulové hmotnosti GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder, do následujících jamek byly pipetovány PCR produkty o objemu 5 µl. Separace probíhala cca 45 min při 80 V, následně byl gel vyhodnocen v dokumentačním systému Syngene pomocí UV transluminátoru a softwaru GeneSnap.

4.4.5 Izolace PCR produktu z gelu

TuF 8705–8726/TuR 9690–9669 PCR produkty byly izolovány z gelu pomocí QIAquick Gel Extraction kitu (QIAGEN) podle postupu doporučeného výrobcem. Byl připraven 1% agarózový gel, kdy k 75 ml rozvařené agarózy byly přidány 4 µl ethidium bromidu. Produkty byly rozděleny při 80 V cca 45 min. Po elektroforetické separaci byl gel umístěn na UV transluminátor a sterilním skalpelem z něj byly vyříznuty viditelné PCR produkty o očekávané velikosti. Vyříznutý gen byl umístěn do sterilní 1,5ml mikrozkušavky, k obsahu zkumavky byl přidán QG pufr v poměru 1 : 3 (hmotnost vzorku : objem pufru). Mikrozkušavky byly inkubovány 10 min při 50 °C v termobloku, dokud nedošlo k úplnému rozpuštění gelu. Následně byl přidán 1 objem izopropanolu a směs byla jemně promíchána. Směs byla napipetována na QIAquick kolonku v jímací zkumavce a centrifugována 1 min při 13 000 rpm, filtrát byl odstraněn. Na kolonku bylo aplikováno 500 µl QG pufru a kolonka byla centrifugována 1 min při 13 000 rpm, filtrát byl opět odstraněn. Následovalo přidání 750 µl PE pufru a centrifugace. Kolonka byla umístěna do nové mikrozkušavky. Na kolonku bylo napipetováno 30 µl deionizované vody a byla centrifugována 1 min při 13 000 rpm. Izolovaná DNA byla uchovávána při –20 °C. Koncentrace izolované DNA byla stanovena použitím fluorometru.

4.4.6 Sekvenování PCR fragmentů

Sekvenační značení DNA fragmentů bylo provedeno pomocí BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing kitu podle pokynů výrobce. Byly připraveny dvě reakční směsi, každá z nich obsahovala 1 µl sekvenačního pufru, 1 µl BigDye reakční směsi a 2 µl 1,6 µmol·l⁻¹ primeru (jedna směs obsahovala TuF 8705–8726, druhá TuR 9690–9669 primer). Ke každé směsi bylo přidáno 6 µl templátové DNA o celkovém množství 20 ng. Vzorky byly vloženy do termocykléru, kde proběhla reakce podle parametrů uvedených v tabulce 4. Připravené vzorky byly analyzovány pomocí genetického analyzátoru ABI PRISM 3730 na pracovišti Ústavu experimentální botaniky, AV ČR-CR Haná UPOL, Olomouc.

Tabulka 4: Reakční podmínky pro sekvenační značení.

	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	1 min	1
Denaturace	95	10 s	
Nasedání primerů	50	5 s	40
Syntéza	60	4 min	

4.4.7 Bioinformatická analýza

Výstupy ze sekvenování byly poskládány do konečných kontigů pomocí programu Seqman Lasergene (Dnastar, Inc.). Identita sekvencí byla potvrzena porovnáním se známými sekvencemi databáze GenBank (Benson a kol., 2013) pomocí programu BLASTN (Zhang a kol., 2000). Získané sekvence byly následně porovnány se sekvencemi TuMV dostupnými v databázi GenBank, pomocí algoritmu ClustalW byly ze sekvencí vytvořeny mnohočetné alignmenty. Genetická variabilita izolátů a jejich fylogenetické vztahy byly následně analyzovány neighbor-joining metodou v programu MEGA7 (Kumar a kol., 2016). Získané fylogenetické stromy byly vizualizovány pomocí Tree Explorer (MEGA7).

4.4.8 Optimalizace podmínek nasedání primerů pro qPCR

Pro potřeby této práce byly navrženy dvě dvojice detekčních primerů TuMV1F/TuMV1R a TuMV1F/TuMV2R pro detekci TuMV pomocí kvantitativní PCR. Pro stanovení optimální teploty nasedání primerů byla provedena gradientová PCR. Byly připraveny dvě reakční směsi, kdy každá z nich obsahovala 4 μl 5x MyTaq reakčního pufru, 13,4 μl dH₂O, 0,2 μl 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ TuMV1F primeru, 0,2 μl 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ TuMV1R nebo TuMV2R primeru a 0,2 μl 5U $\cdot\mu\text{l}^{-1}$ MyTaq polymerázy. Ke směsi byly přidány 2 μl cDNA vzorků připravených výše popsanou reverzní transkripcí. Reakce proběhla v gradientovém termocykléru za podmínek uvedených v tabulce 5, v reakci byly použity čtyři různé teploty nasedání primerů, konkrétně teploty 57, 60, 63 a 66 °C. Produkty byly elektroforeticky separovány v 2% agarózovém gelu za standardních podmínek uvedených výše.

Následovala analýza teploty tání PCR produktů. Do 0,1ml zkumavek bylo napipetováno 10 μl PCR produktu a 0,5 μl barviva SYBR Green. Stripy zkumavek byly uzavřeny a vloženy do qPCR termocykléru Rotor-Gene 3000TM, kde byla spuštěna analýza pomocí softwaru RotorGene při teplotách 50–99 °C, kdy teplota stoupala po 0,5 °C, při prvním kroku po dobu 30 s, v následujících krocích se zvyšující se teplotou každých 5 s.

Tabulka 5: Reakční podmínky gradientové PCR za použití detekčních primerů TuMV1F/TuMV1R a TuMV1F/TuMV2R.

	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	2 min	1
Denaturace	95	20 s	
Nasedání primerů	57 / 60 / 63 / 66	20 s	35
Syntéza	72	20 s	
Dosyntetizování	72	5 min	1

4.4.9 Optimalizace podmínek kvantitativní PCR (qPCR)

Byla optimalizována metoda detekce TuMV pomocí kvantitativní PCR. Byly mezi sebou porovnávány dva různé typy reakčních směsí – směs s MyTaq polymerázou a barvivem SYBR Green a kit pro kvantitativní PCR SYBR Premix Ex TaqTM. Pro detekci byla použita pouze kombinace primerů TuMV1F/TuMV1R, u každého chemismu byla optimalizována teplota nasedání primerů a jejich koncentrace. Zároveň u směsi s MyTaq polymerázou byla v reakci testována i různá koncentrace SYBR Green.

MyTaq-SYBR Green kvantitativní PCR

Teplota nasedání primerů TuMV1F/TuMV1R pro směs s MyTaq polymerázou byla optimalizována výše popsaným postupem, byla použita stejná reakční směs i podmínky reakce.

Byla provedena qPCR pro dvě různé koncentrace primerů (0,1 a 0,2 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) a zároveň pro dvě různé koncentrace SYBR Green (500x a 400x). Složení jednotlivých reakčních směsí je uvedeno v tabulce 6. Směs byla napipetována do 0,1ml PCR zkumavek a byly k ní přidány 2 μl cDNA. Vlastní reakce proběhla společně s následnou analýzou teploty tání produktů podle programu cyklování uvedeného v tabulce 7.

Tabulka 6: Složení qPCR reakční směsi s MyTaq polymerázou a SYBR Green pro různé koncentrace primerů.

Položka	Koncentrace pracovního roztoku	Konečná koncentrace	Objem na 1 test [μl]
MyTaq reakční pufr	5x	1x	4
dH ₂ O	-	-	doplnit do celkového objemu 20 μl
SYBR Green	10 000x	500x / 400x	1 / 0,8
TuMV1F primer	20 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	0,2 / 0,1 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	0,2 / 0,1
TuMV1R primer	20 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	0,2 / 0,1 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	0,2 / 0,1
MyTaq polymeráza	5 U· μl^{-1}	1 U·reakce ⁻¹	0,2
vzorek	-	-	2
celkový objem	20 μl		

Tabulka 7: Reakční podmínky qPCR za použití MyTaq polymerázy a SYBR Green.

	Teplota [$^{\circ}\text{C}$]	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	2 min	1
Denaturace	95	10 s	
Nasedání primerů	66	10 s	50
Syntéza	72	10 s	
Analýza teploty tání	50–99	30 s v prvním kroku po 5 s v následujících (změna teploty po 0,5 $^{\circ}\text{C}$)	1

qPCR s kitem SYBR Premix Ex Taq™

Teplota nasedání primerů TuMV1F/TuMV1R byla optimalizována pomocí gradientové PCR, testovány byly teploty nasedání primerů 66, 68 a 70 °C, složení reakční směsi je uvedeno v tabulce 8. Ke směsi byly přidány 2 µl cDNA vzorků, vlastní reakce probíhala za podmínek uvedených v tabulce 9.

Tabulka 8: Složení qPCR reakční směsi pro kit SYBR Premix Ex Taq™.

Položka	Koncentrace pracovního roztoku	Konečná koncentrace	Objem [µl] na 1 test
SYBR Ex Taq Premix	2x	1x	4
dH ₂ O	-	-	doplnit do celkového objemu 20 µl
TuMV1F primer	20 µmol·l ⁻¹	0,2 / 0,15 / 0,1 µmol·l ⁻¹	0,2 / 0,15 / 0,1
TuMV1R primer	20 µmol·l ⁻¹	0,2 / 0,15 / 0,1 µmol·l ⁻¹	0,2 / 0,15 / 0,1
vzorek	-	-	2
celkový objem	20 µl		

Tabulka 9: Reakční podmínky gradientové PCR za použití detekčních primerů TuMV1F/TuMV1R a kitu SYBR Premix Ex Taq™.

	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	2 min	1
Denaturace	95	20 s	
Nasedání primerů	66 / 68 / 70	20 s	35
Syntéza	72	20 s	
Dosyntetizování	72	5 min	1

Byla provedena qPCR s použitím tří různých koncentrací primerů (0,1, 0,15 a 0,2 µmol·l⁻¹) a 2 µl cDNA vzorků, složení reakční směsi je uvedeno v tabulce 8. Reakce byly provedeny v triplicátech za podmínek uvedených v tabulce 10.

Tabulka 10: Reakční podmínky qPCR pro SYBR Premix Ex Taq™.

	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	30 s	1
Denaturace	95	5 s	45
Nasedání primerů a syntéza	66	20 s	

Absolutní kvantifikace

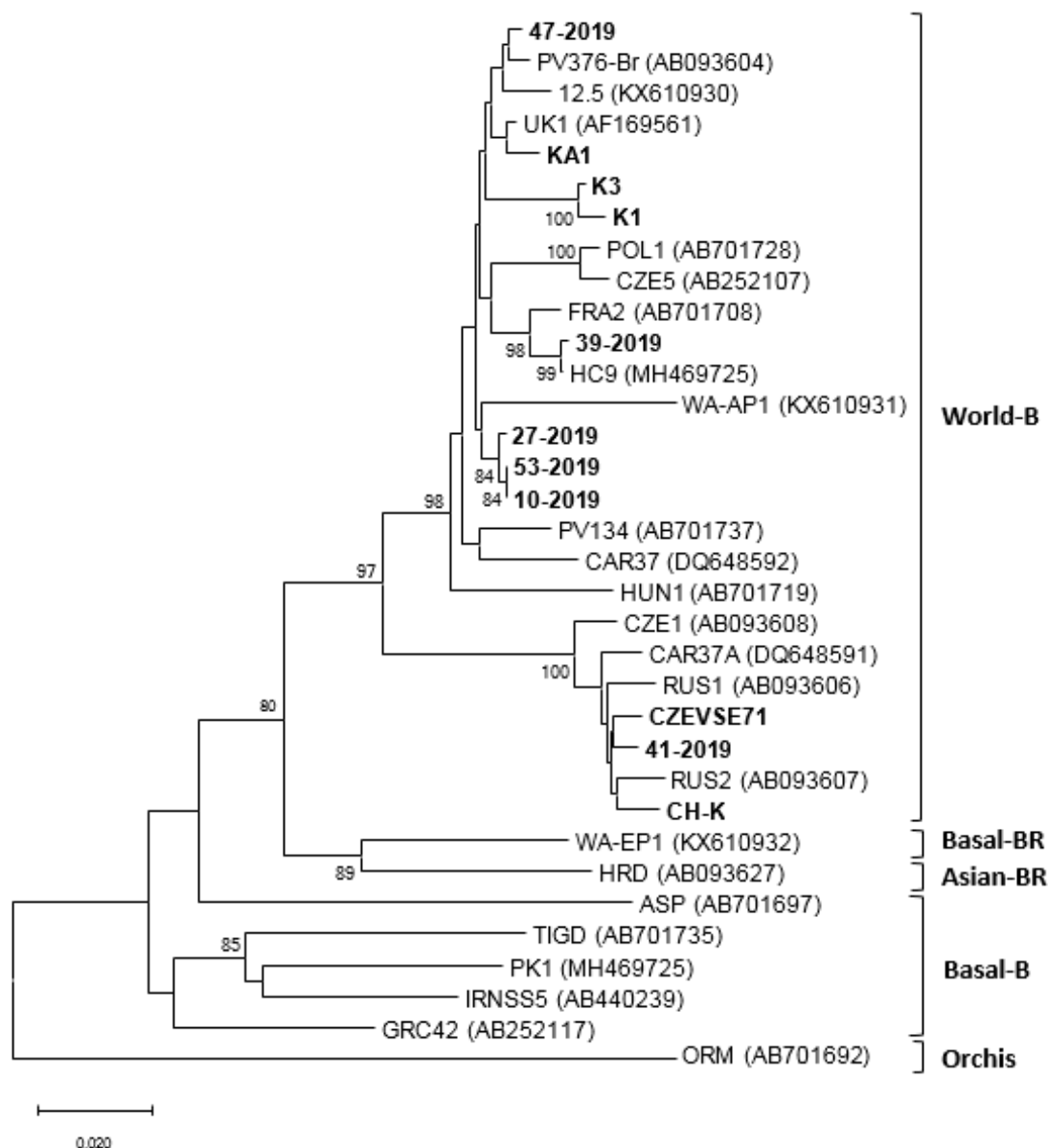
Byla připravena zředovací řada vzorků, vzorky cDNA byly postupně ředěny dEPC H₂O 10x, 100x, 1 000x a 10 000x. Pracovníky Laboratoře molekulární biologie mikroorganismů byl připraven standard, rekombinantní plazmid pGEM-T nesoucí TuMV amplikon Tu8705/Tu9669 o velikosti 985 bp. U plazmidu byla zjištěna koncentrace pro stanovení počtu kopií a z tohoto standardu byla připravena kalibrační řada o ředění 10x (10¹x–10⁹x). Byla připravena reakční směs pro SYBR Premix Ex Taq™ kit s primery o koncentraci 0,1 μmol·l⁻¹ (složení viz tabulka 8), která byla rozpipetována do 0,1ml zkumavek a následně byly přidány 2 μl vzorku (standardu nebo cDNA), analýza byla provedena ve třech opakováních. Reakce proběhla podle programu uvedeného v tabulce 10. Absolutní kvantifikace byla provedena metodou stanovení Ct (RotorGene). Ze vzorků o známé koncentraci byla následně vytvořena kalibrační křivka pro absolutní kvantifikaci a byly zjištěny koncentrace získaných izolátů.

5 VÝSLEDKY

5.1 Genetická variabilita získaných izolátů TuMV

S cílem charakterizovat genetickou variabilitu TuMV bylo analyzováno 11 izolátů TuMV pocházejících z různých oblastí České republiky – Pustějov, Jistebník, Lednice, Sedlnice, Beskydy, Slavonín a jeden z blíže nespecifikované lokality, převážně z vlastních sběrů pracoviště nebo byly izoláty poskytnuty ze sbírky ÚMBR AV ČR v Českých Budějovicích. Pomocí RT-PCR za použití primerů TuF 8705–8726 a TuR 9690–9669 a sekvenování byly získány sekvence o délce 898 nebo 869 nt (pro izolát K1) pokrývající celou oblast genu pro plášťový protein. Porovnáním získaných sekvencí se známými sekvencemi viru dostupnými v databázi GenBank bylo pomocí programu BLASTN potvrzeno, že se jedná o izoláty TuMV. Izoláty 10-2019, 27-2019, 47-2019 a 53-2019 vykazovaly největší identitu (99,12–99,34 %) se sekvencí izolátu UT (Acc. No. AB701736). Izoláty K1 a K3 vykazovaly 96,67–97,37% identitu s izoláty DNK4 (Acc. No. AB701704.1) a NDJ (Acc. No. AB093616). Izoláty CH-K a 41-2019 byly nejpodobnější s izolátem RUS2 (Acc. No. AB093607) s identitou 98,46 a 98,57 %. Identitu 98,70 % vykazoval izolát CZEVS71 se sekvencí DNK2 (Acc. No. AB252108) a identita 99,66 % byla stanovena u izolátu 39-2019 s izolátem HC9 (Acc. No. MH469725). Izolát KA1 vykazoval identitu 99,22 % se sekvencí NLD2 (Acc. No. AB701727). Vzájemná identita studovaných českých izolátů byla 91,20–100 %.

Fylogenetickou analýzou bylo zjištěno, že všechny studované izoláty vytvořily skupinu (klastr) společně s typovými českými a evropskými izoláty početné fylogenetické skupiny World-B (viz obrázek 1). Studované izoláty se rozdělily do dvou hlavních větví. Izoláty CZEVS71, CH-K a 41-2019 vytvořily společně s dříve popsáním izolátem českým CZE1, polským CAR37A a ruskými izoláty RUS1 a RUS2 jednu průkaznou větev, zbývající se vyvětvily např. s českým izolátem CZE5 anebo TuMV typovým britským izolátem UK1 v druhou, variabilnější větev. Na základě porovnání hostitelské specifity jednotlivých izolátů bylo zjištěno, že v méně početné větvi byly všechny studované izoláty (CZEVS71, CH-K a 41-2019) izolovány z křenu selského (*A Armoracia rusticana*) stejně tak jako izoláty CAR37A a RUS1. Druhá větev byla variabilnější, co se hostitelů týče, ze studovaných českých izolátů se zde vyvětvily všechny (27-2019, 39-2019, 47-2019 a 53-2019), které byly izolovány z tuřínu, dále KA1 z kvěťáku, 10-2019 z kedlubnu bílého. Vyvětvily se zde také studované izoláty K1 a K3 a typový izolát CAR37, které byly izolovány z křenu selského (*A Armoracia rusticana*). Početné zastoupení ve větvi měly typové izoláty infikující brukev řepku (*B Brassica napus*).

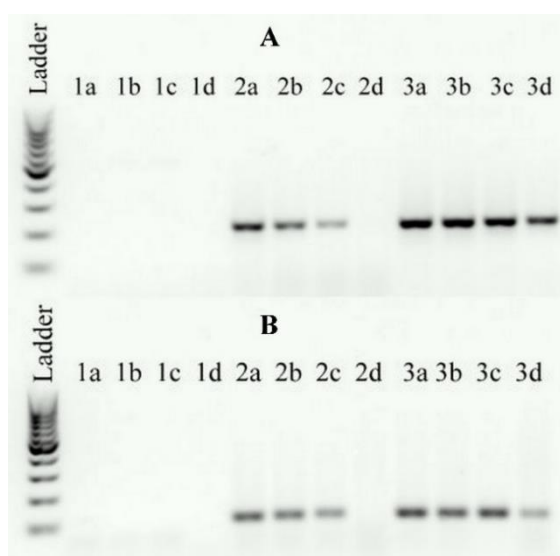


Obrázek 1: Fylogenetický strom izolátů TuMV sestavený na základě nukleotidových sekvencí genu pro plášťový protein (Strom byl vytvořen použitím neighbor-joining metody, ve stromu jsou zobrazeny pouze hodnoty bootstrap ≥ 70 . Svorkami jsou označeny základní fylogenetické skupiny. Jednotlivé izoláty jsou popsány názvem izolátu a Accession Number (v závorce). Měřítko představuje 0,02 substitucí na pozici, jako outgroup byl použit izolát TuMV ORM (Acc. No. AB701692)).

5.2 Optimalizace podmínek kvantitativní PCR (qPCR)

S cílem vytvořit a optimalizovat vhodný systém detekce TuMV pomocí kvantitativní PCR byly mezi sebou porovnávány metody detekce – amplifikace pomocí MyTaq polymerázy s barvivem SYBR Green a SYBR Premix Ex TaqTM kit.

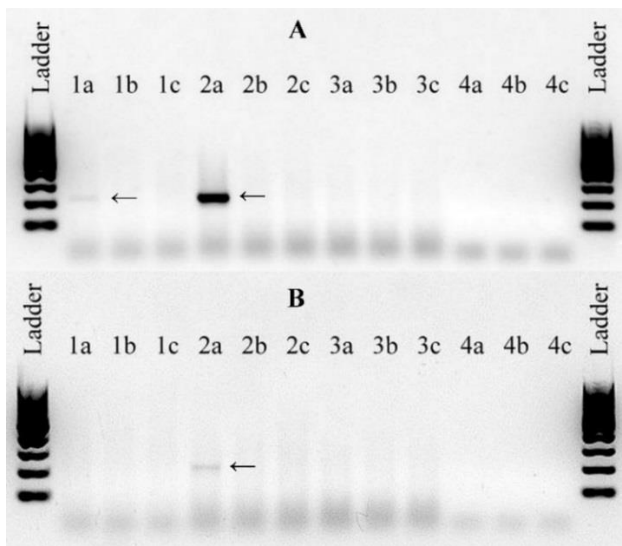
Na základě porovnání různých teplot nasedání primerů při použití MyTaq polymerázy a barviva SYBR Green byla jako nejvhodnější z nich identifikována teplota 66 °C pro obě dvojice primerů. Při této teplotě nedocházelo ke vzniku falešně pozitivních produktů v negativní kontrole na rozdíl od nižších teplot. U kombinace primerů TuMV1F/TuMV2R však při teplotě 66 °C docházelo k výraznému úbytku PCR produktu, efektivita reakce byla nižší ve srovnání s primery TuMV1F/TuMV1R (viz obrázek 2). Pro další práci byla proto používána pouze dvojice primerů TuMV1F/TuMV1R.



Obrázek 2: Optimalizace teploty nasedání primerů pro primery (A) TuMV1F/TuMV1R a (B) TuMV1F/TuMV2R (vzorky – 1: blank, 2: negativní kontrola, 3: 53-2019, teplota nasedání primerů – a: 57 °C, b: 60 °C, c: 63 °C, d: 66 °C, ladder: GeneRulerTM 100 bp DNA Ladder).

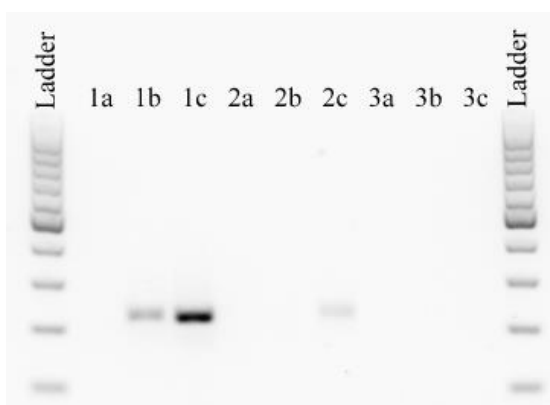
Porovnáním dvou různých koncentrací primerů byla zaznamenána nižší citlivost reakce a vznik menšího množství produktu při použití koncentrace primerů $0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ve srovnání s $0,2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (viz obrázek 3). Byla zaznamenána mírná inhibice reakce při použití vyšší koncentrace barviva SYBR Green (500x), při nižší koncentraci (400x) byl počátek amplifikace detekován o 2 cykly dříve.

Při používání tohoto systému neměla v reakcích amplifikační křivka optimální sigmoidní průběh, křivky pozitivních vzorků začínaly stoupat v 15. až 20. cyklu.

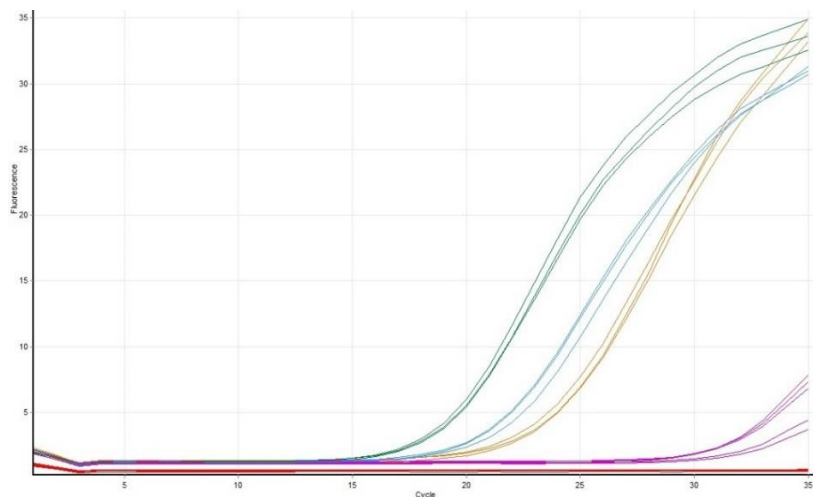


Obrázek 3: Optimalizace koncentrace primerů v amplifikaci pomocí MyTaq polymerázy a barviva SYBR Green pro koncentrace primerů (A) $0,2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a (B) $0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (vzorky – 1: K1, 2: 10-2019, 3: negativní kontrola, 4: blank, teplota nasedání primerů – a: $66 \text{ }^\circ\text{C}$, b: $68 \text{ }^\circ\text{C}$, c: $70 \text{ }^\circ\text{C}$; ladder – GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder).

Druhá testovaná metoda byla detekce pomocí komerčního kitu SYBR Premix Ex Taq™. Při teplotě nasedání primerů $68 \text{ }^\circ\text{C}$ bylo výrazně sníženo množství získaného PCR produktu ve srovnání s teplotou $66 \text{ }^\circ\text{C}$. Při teplotě $70 \text{ }^\circ\text{C}$ nevznikaly PCR produkty žádné (viz obrázek 4), proto byla jako optimální opět zvolena teplota nasedání primerů $66 \text{ }^\circ\text{C}$. S ohledem na tuto skutečnost byly upraveny podmínky PCR amplifikace doporučené výrobcem.



Obrázek 4: Optimalizace teploty nasedání primerů TuMV1F/TuMV1R pro detekci viru pomocí SYBR Premix Ex Taq™ kitu (vzorky – 1: 10-2019, 2: negativní kontrola, 3: blank, teplota nasedání primerů – a: $70 \text{ }^\circ\text{C}$, b: $68 \text{ }^\circ\text{C}$, c: $66 \text{ }^\circ\text{C}$, ladder: GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder).

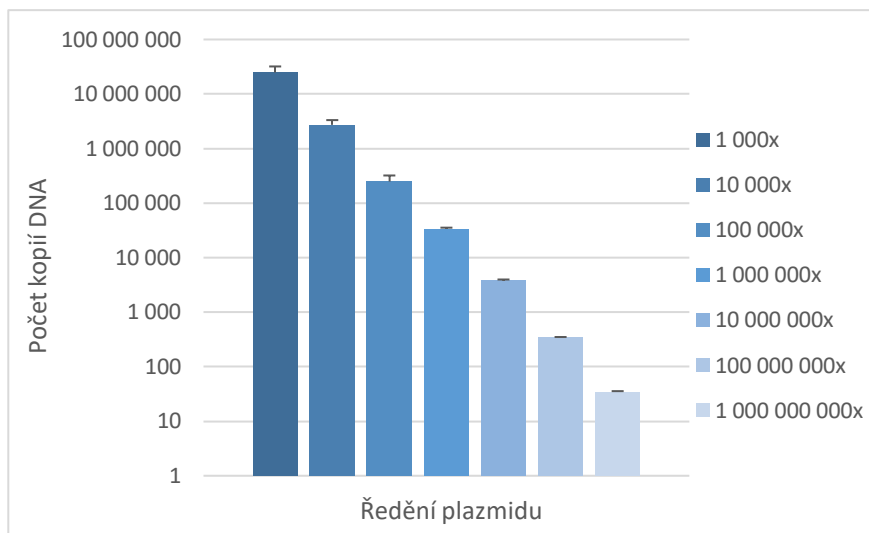


Obrázek 5: Optimalizace koncentrace primerů pro amplifikaci za použití SYBR Premix Ex TaqTM kitu (zelená: $0,2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, modrá: $0,15 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, oranžová: $0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$).

Při porovnání tří různých koncentrací primerů byl pozorován mírně odlišný průběh amplifikační reakce, použitím koncentrace primerů $0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ byl zaznamenán největší nárůst množství PCR produktu v reakci, proto byla tato koncentrace, i přes amplifikaci v pozdějších cyklech, vyhodnocena jako nejvhodnější (viz obrázek 5).

Amplifikace s použitím SYBR Premix Ex TaqTM kitu byla vyhodnocena z hlediska průběhu jako vhodnější ve srovnání s amplifikací pomocí MyTaq polymerázy a barviva SYBR Green.

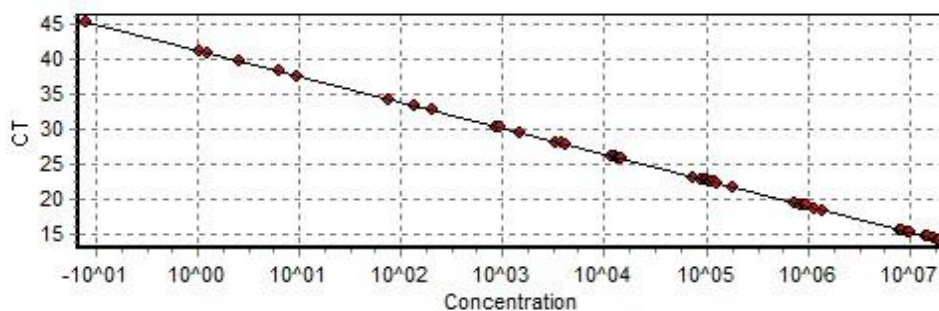
Spolehlivost a citlivost detekční metody byla ověřována za pomoci umělé kontroly, kdy jako templátová DNA pro amplifikační reakci byl použit rekombinantní plazmid pGEM-T nesoucí fragment Tu8705/Tu9669, dále jen TuMV rekombinantní plazmid. Z roztoku plazmidu o koncentraci $151 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ byla připravena kalibrační řada o ředění 10^x , o koncentraci 35 000 000–35 kopií v $1 \mu\text{l}$ vzorku. Při zředění 10^1x a 10^2x byly koncentrace plazmidu natolik vysoké, že reakce byla zainhibována a nebylo možné odečíst výsledné počty kopií, proto nebyly do kalibrační řady použity. Produkty však byly při těchto ředěních získány, jejich specifita byla potvrzena v analýze teploty tání PCR produktů. Při ředěních 10^3 – 10^5x byly detekovány nižší počty kopií (chyba 22,24–29,09 %) oproti očekávání, při nižších koncentracích (ředění 10^6 – 10^9x) byly detekovány hodnoty blížíící se očekávání, kdy rozsah chyby pipetování byl 1,47–6,50 % (viz obrázek 6 a tabulka 11).



Obrázek 6: Ověření spolehlivosti detekce TuMV pomocí primerů TuMV1F/TuMV1R za použití zřed'ovací řady (10x) standardu, TuMV rekombinantního plazmidu.

Tabulka 11: Teoretické a detekované počty kopií zřed'ovací řady standardu, TuMV rekombinantního plazmidu v 1 μ l.

ředění	10^3x	10^4x	10^5x	10^6x	10^7x	10^8x	10^9x
Teoretický počet kopií	35 000 000	3 500 000	350 000	35 000	3 500	350	35
Detekovaný počet kopií	24 817 006	2 721 546	248 564	33 750	3 728	345	35
Chyba [%]	29,09	22,24	28,98	4,93	6,50	1,47	2,77



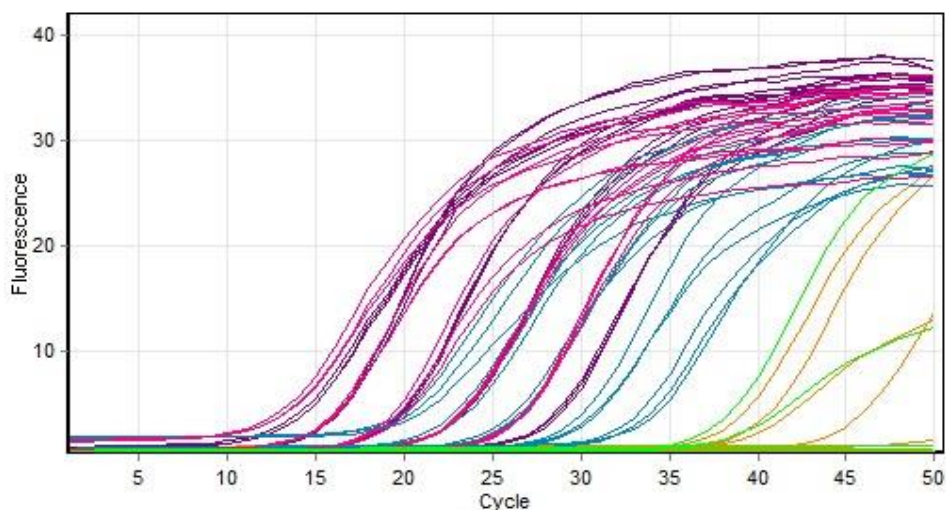
Obrázek 7: Kalibrační křivka sestavená na základě ředění standardu, TuMV rekombinantního plazmidu.

Pro vytvoření kalibrační křivky byly použity spolehlivější hodnoty ředění 10^6 až 10^9x (viz obrázek 7). Reakce proběhla s efektivitou (E) 86,63 %, korelační

koeficient (R^2) byl 0,9997 a sklon kalibrační křivky (k) $-3,690$. Spolehlivost reakce byla ověřována i u standardních vzorků, cDNA byla získána z listů tuřínu, křene, kvěťáku a kedlubnu. Amplifikace byla ve všech případech úspěšná, při použití zředovací řady byly u vzorků detekovány efektivita amplifikace odpovídající umělému standardu. Vysoká koncentrace vstupní cDNA a tím i izolátu viru měla obdobný inhibující účinek jako v případě standardu, TuMV rekombinantního plazmidu. Nejnižší efektivita reakce (90,76 %) společně s nejméně vhodnou hodnotou pro sklon kalibrační křivky $-3,565$ byla zaznamenána pro tuřín. Efektivita reakce přes 100 % (109,42 %) byla zaznamenána spolu se sklonem kalibrační křivky $-3,115$ pro vzorek izolovaný z listu kedlubnu, pro křen byly získány hodnoty 97,86 % a $-3,374$ a pro kvěťák 94,56 % a $-3,460$. Korelační koeficient (R^2) byl pro vzorek křenu 0,9905, kvěťáku 0,9971, tuřínu 0,9979 a kedlubnu 0,9739 (viz tabulka 12).

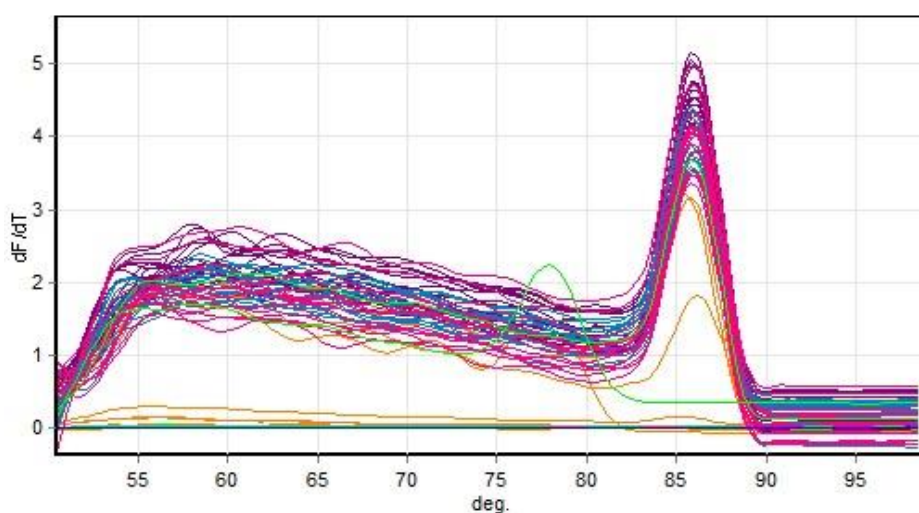
Tabulka 12: Spolehlivost detekce primery TuMV1F/TuMV1R ve vzorcích odlišného původu.

	Efektivita (E) [%]	Sklon kalibrační křivky (k)	korelační koeficient (R)	korelační koeficient umocněný na druhou (R^2)
standard	86,63	$-3,690$	0,9998	0,9997
křen	97,86	$-3,374$	0,9953	0,9905
kvěťák	94,56	$-3,460$	0,9986	0,9971
tuřín	90,76	$-3,565$	0,9989	0,9979
kedluben	109,42	$-3,115$	0,9869	0,9739



Obrázek 8: Příklad průběhu kvantitativní PCR u vybraných izolátů TuMV. (růžová: KA1, fialová: CH-K, modrá: K1, oranžová: negativní kontrola, zelená: blank).

Při reakcích s cDNA izolátů virů s ředěním 10x (viz obrázek 8) se hodnota Ct u vzorků s nejvyšší koncentrací pohybovala v rozmezí 14–17. U blanku a negativních kontrol byla zaznamenána nespecifická amplifikace, která však byla na základě analýzy teploty tání PCR produktů (T_m) dobře odlišitelná od pozitivních vzorků. T_m izolátů byla 86 °C, T_m nespecifických produktů byla 78 °C (viz obrázek 9).



Obrázek 9: Analýza teploty tání PCR produktů (růžová: KA1, tmavě fialová: CH-K, modrá: K1, oranžová: negativní kontrola, zelená: blank).

S ohledem na velký počet vzorků a s cílem standardizovat výsledky byla provedena absolutní kvantifikace za použití kalibrační řady vytvořené s použitím standardu, TuMV rekombinantního plazmidu a vzorek CH-K, ředění 10x, byl využit jako kalibrační kontrola. Nejvyšší koncentrace TuMV byla zaznamenána u vzorků CH-K izolovaného z křenu a KA1 z kvěťáku. Koncentrace v řádech milionu kopií v nejvyšších koncentracích byly zjištěny pro vzorky 10-2019 z kedlubnu, 41-2019 z křene a 47-2019 z tuřínu. Naopak nejnižší koncentrace byly zjištěny pro vzorky K1 z křene a 39-2019 z tuřínu (viz tabulka 13).

Tabulka 13: Detekované počty kopií vybraných izolátů TuMV pomocí qPCR.

Vzorky	Průměrné počty detekovaných kopií				
	cDNA neředěná	Ředění cDNA			
		10x	100x	1 000x	10 000x
CH-K	18 727 642	9 184 257	914 060	101 188	3 711
K1	122 897	92 413	13 331	1 099	137
KA1	16 010 728	8 796 538	1 095 524	125 444	13 672
10-2019	7 495 681	5 418 643	1 990 058	145 165	11 655
39-2019	264 996	446 713	190 052	19 234	901
41-2019	2 445 954	1 490 066	248 301	18 677	811
47-2019	6 566 409	4 350 554	652 305	48 662	4 802

6 DISKUZE

Turnip mosaic virus je významným celosvětově rozšířeným patogenem infikujícím široký okruh hostitelů, především rostliny čeledi *Brassicaceae*. Genetické rozrůznění izolátů TuMV souvisí s rychlým přizpůsobováním se novým hostitelům a podmínkám prostředí. Vzájemná identita eurasijských izolátů je udávána okolo 77 % a více (Tomimura a kol., 2003). Pro zjištění evolučních vztahů mezi jednotlivými izoláty je používána fylogenetická analýza, na jejímž základě jsou izoláty TuMV rozdělovány do pěti základních fylogenetických skupin – World-B, basal-B, basal-BR, Asian-BR a Orchis (Ohshima a kol., 2002; Tan a kol., 2004; Tomimura a kol., 2003). Guerret a kol. (2016) vytvořili jiný systém rozdělení izolátů TuMV, a to na fyloskupiny I–VI, které se částečně překrývají s rozdělením původním. Skupina World-B byla rozdělena do dvou skupin (I a II), skupiny Asian-BR a basal-BR se spojily dohromady (III) a skupina basal-B se rozdělila na dvě (IV a V). Toto rozdělení ale nelze brát jako spolehlivé, jelikož větvení skupin I a II stromu má hodnotu bootstrap nižší než 70.

Skupina World-B bývá rozdělována na další tři podskupiny (se spolehlivou hodnotou bootstrap větší než 90), někdy přímo označované jako B1, B2 a B3, kdy je u skupiny B1 možné pozorovat náznak preference k určité geografické oblasti, zahrnuje české, ruské a polské izoláty. Dále bývá rozdělována také skupina basal-B, a to na podskupiny B1 a B2 (Nguyen a kol., 2013a; Ohshima a kol., 2002; Yasaka a kol., 2015; Yasaka a kol., 2017).

V této práci byla porovnávána vzájemná variabilita českých izolátů TuMV, konkrétně oblastí genu pro plášťový protein, izoláty vykazovaly poměrně vysokou identitu 91,20–100 %. Izoláty 10-2019 z kedlubnu a 53-2019 z tuřínu, které pocházely z různých oblastí, byly dokonce v oblasti genu pro plášťový protein identické. Mohlo by se jednat o stejné izoláty, u kterých došlo k přenosu na jiné místo, pro potvrzení by bylo však nutné znát celogenomovou sekvenci. Větvení evolučního stromu odpovídalo dnes používanému rozdělení, izoláty se rozdělily do pěti hlavních skupin. Podle očekávání se ve stromu vyvětvily typové izoláty s výjimkou australského izolátu WA-AP1, který běžně spadá do skupiny basal-B, nicméně ve stromu došlo k jeho vyčlenění ve skupině World-B. Studované izoláty se vyvětvily ve skupině World-B, čímž se potvrdila jejich podobnost s dříve popsány českými izoláty CZE1 a CZE5 (Tan a kol., 2004; Tomimura a kol., 2004). Skupina World-B se dále rozdělila na dvě průkazné větve, které dosud v žádné dostupné práci zabývající se variabilitou TuMV nebyly identifikovány. V rámci méně početné větve byl pozorován náznak geografické

preference – izoláty české, ruské a polské, stejně jako ve výše uvedené podskupině World-B1, a zároveň je zde i náznak hostitelské specifity (křen selský). V rámci druhé větve bylo naopak pozorováno různorodé geografické rozšíření i hostitelská specifita (tuřín, kedluben, křen, brukev řepka a další).

Dále byla vyvinuta a optimalizována metoda detekce TuMV pomocí RT-qPCR pro snadnější a rychlejší diagnostiku TuMV s využitím absolutní kvantifikace. Byly mezi sebou porovnávány dva typy metod. Metodu RT-qPCR s využitím SYBR Green a MyTaq polymerázy je možné pro detekci TuMV použít, byly získávány specifické produkty, avšak křivky neměly optimální průběh a zároveň byl virus detekován v pozdějších cyklech. Spolehlivější metoda detekce byla vytvořena za využití SYBR Premix Ex TaqTM kitu, kterou bylo dosahováno standardních výsledků, v reakci docházelo ke specifické amplifikaci potvrzené získáváním stejných teplot tání virových produktů. Zároveň měly křivky optimální tvar oproti předchozí metodě. Metoda je zároveň robustní, je tedy dosahováno obdobných výsledků i při menších chybách.

Pro stanovení počtu kopií vzorků použitím absolutní kvantifikace je třeba sestavit kalibrační křivku standardu, ze které je následně možné odečíst podle hodnot Ct koncentraci vzorků. Pro spolehlivé výsledky absolutní kvantifikace je vhodné, aby kalibrační křivka byla sestavena minimálně ze šesti bodů pro pokrytí co největšího rozsahu koncentrace cílového fragmentu DNA (Bustin a kol., 2012). Spolehlivost reakce optimalizované metody s využitím SYBR Premix Ex TaqTM kitu byla ovlivněna použitím neúplné kalibrační křivky pouze o čtyřech ředěních, a to z důvodu vysoké chybovosti pipetování při vyšších koncentracích standardu – ředění 10^3 – 10^5 x (22,24–29,09 %), které pro kalibrační křivku nebyly použity. V nižších koncentracích již bylo dosahováno spolehlivějších hodnot. Reakce standardu proběhla s efektivitou (E) 86,63 % a hodnotou R^2 0,9998 a sklonem kalibrační křivky (k) –3,690. Spolehlivá efektivita amplifikace se v praxi pohybuje okolo 90–105 % a sklon kalibrační křivky okolo hodnot –3,2 až –3,5, optimální je hodnota –3,32 (Johnson a kol., 2013). Z výše uvedeného vyplývá, že pro další práci a potvrzení spolehlivosti navrženého detekčního postupu bude potřeba sestavit novou kalibrační křivku s větším počtem bodů a menší chybovostí v pipetování.

Funkčnost metody byla potvrzena použitím reálných vzorků, u nichž byly získávány specifické počty kopií i přes nižší vstupní koncentraci vzorku ve srovnání se standardem. Zároveň reakce u reálných vzorků probíhala s vyšší efektivitou (u všech nad 90 %), nejvhodnější hodnoty byly získány pro vzorek křenu (99,86 % a –3,374).

7 ZÁVĚR

V rámci této práce byla analyzována genetická variabilita 11 českých izolátů TuMV z různých hostitelů a různých oblastí ČR, konkrétně variabilita oblasti genu pro plášťový protein. Vzájemná identita studovaných izolátů byla 91,20–100 %, izoláty se fylogenetickou analýzou zařadily do skupiny World-B, kde vytvořily dvě průkazné větve, které dříve nebyly detekovány, u jedné z nich s náznakem hostitelské specifity – specializace izolátů na křen. Byla potvrzena podobnost izolátů s dříve popsány českými izoláty.

Byly navrženy vhodné detekční primery a vyvinuta a optimalizována spolehlivá metoda detekce TuMV pomocí RT-qPCR a jeho absolutní kvantifikace s využitím komerčního kitu SYBR Premix Ex Taq™. Spolehlivost metody byla ověřena použitím standardu, TuMV rekombinantního plazmidu, a také použitím reálných vzorků – detekce TuMV izolátů infikujících křen, tuřín, kedluben bílý a zelí. Pro dokončení přípravy metodického postupu by však bylo vhodné zopakovat a standardizovat detekci viru za použití uměle vytvořené kontroly, rekombinantního plazmidu a pro potenciální vysokou koncentraci viru v rostlině.

8 LITERATURA

- Adachi S., Honma T., Yasaka R., Ohshima K., Tokuda M. (2018): Effects of infection by Turnip mosaic virus on the population growth of generalist and specialist aphid vectors on turnip plants. *PLoS ONE* 13(7): 1–8.
- Adams M. J., Zerbini F., French R., Rabenstein F., Frank, Stenger D. C., Valkonen J.P.T. (2012): Family Potyviridae. *Virus Taxonomy*, 9th Report of the International Committee for Taxonomy of Viruses: 1069–1089.
- Becker-André M., Hahlbrock K. (1989): Absolute mRNA quantification using the polymerase chain reaction (PCR). A novel approach by a PCR aided transcript titration assay (PATTY). *Nucleic Acids Research* 17: 9437–9446.
- Bellardi M. G., Bertaccini A. (2001): First report of Turnip mosaic virus in lily. *Journal of Plant Pathology* 83: 69.
- Benson D. A., Cavanaugh M., Clark K., Karsch-Mizrachi I., Lipman D. J., Ostell J., Sayers E.W. (2013): GenBank. *Nucleic Acids Research* 41: D36-42.
- Bink H. H. J., Hellendoorn K., van der Meulen J., Pleij C. W. A. (2002): Protonation of non-Watson–Crick base pairs and encapsidation of turnip yellow mosaic virus RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 13465–13470.
- Blancard D., Lot H., Maisonneuve B., Ryder E. J. (2006): *A colour atlas of diseases of lettuce and related salad crops: observation, biology and control*. Manson, London.
- Boben J., Kramberger P., Petrovič N., Cankar K., Peterka M., Štrancar A., Ravnikar M. (2007): Detection and quantification of Tomato mosaic virus in irrigation waters. *European Journal of Plant Pathology* 118: 59–71.
- Boissinot S., Pichon E., Sorin C., Piccini C., Scheidecker D., Ziegler-Graff V., Brault V. (2017): Systemic propagation of a fluorescent infectious clone of a Polerovirus following inoculation by Agrobacteria and aphids. *Viruses* 9(7): E166.
- Bustin S., Zaccara S., Nolan T. (2012): An introduction to the real-time polymerase chain reaction. *Quant. Real Time PCR Applied Microbiology*: 3–26.
- Cai L., Xu Z. Y., Chen K. R., Yang L. Y., Hou M. S. (2007): Virulence variation of Turnip mosaic virus to oilseed rape and sequencing of coat protein genes. *Acta Phytopathologica Sinica* 37(2) 169–174.
- Chang P. G. S., McLaughlin W., Tolin S. A. (2011): Tissue blot immunoassay and direct RT-PCR of cucumoviruses and potyviruses from the same NitroPure nitrocellulose membrane. *Journal of Virological Methods* 171(2): 345–351.
- Chomic A., Winder L., Armstrong K. F., Pearson M. N., Hampton J. G. (2011): Detection and discrimination of members of the family Luteoviridae by real-time PCR and SYBR® GreenER™ melting curve analysis. *Journal of Virological Methods* 171: 46–52.
- Chung B. Y. W., Miller W. A., Atkins J. F., Firth A. E. (2008): An overlapping essential gene in the Potyviridae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 5897–5902.
- Clayton E. E. (1930): A study of the mosaic disease of Crucifers. *Journal of Agricultural Research* 40: 263–270.

- de Assis Filho F. M., Sherwood J. L. (2000): Evaluation of seed transmission of Turnip yellow mosaic virus and Tobacco mosaic virus in *Arabidopsis thaliana*. *Phytopathology* 90: 1233–1238.
- Dreher T. W. (2004): Turnip yellow mosaic virus: transfer RNA mimicry, chloroplasts and a C-rich genome. *Molecular Plant Pathology* 5: 367–375.
- Edwardson J. R. (1974): Some properties of the potato virus Y-group. Experiment Station Monograph Series - Florida Agricultural Experiment Station: No 4, 398.
- Edwardson J. R., Christie R. G. (1986): Viruses infecting forage legumes. Agricultural Experiment Stations, Institute of food and agricultural sciences, University of Florida, Gainesville.
- Espy M. J., Uhl J. R., Sloan L. M., Buckwalter S. P., Jones M. F., Vetter E. A., Yao J. D. C., Wengenack N. L., Rosenblatt J. E., Cockerill F. R., Smith T. F. (2006): Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clinical Microbiology Reviews* 19: 165–256.
- Farzadfar S., Tomitaka Y., Ikematsu M., Golnaraghi A. R., Pourrahim R., Ohshima K. (2008): Molecular characterisation of Turnip mosaic virus isolates from Brassicaceae weeds. *European Journal of Plant Pathology* 124: 45–55.
- Fletcher J. D., Lister R. A., Bulman S. R., Heenan P. B. (2010): First record of Turnip mosaic virus in *Pachycladon* spp. (Brassicaceae): An endangered native plant species in New Zealand. *Australasian Plant Disease Notes* 5: 9–10.
- Franck A., Guilley H., Jonard G., Richards K., Hirth L. (1980): Nucleotide sequence of cauliflower mosaic virus DNA. *Cell* 21: 285–294.
- Freeman W. M., Walker S. J., Vrana K. E. (1999): Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *BioTechniques* 26: 112–122, 124–125.
- Gardner M. W., Kendrick J. B. (1921): Turnip mosaic. *Journal of Agricultural Research* 22: 123–124.
- Graichen K., Rabenstein F. (1996): European isolates of beet western yellows virus (BWYV) from oilseed rape (*Brassica napus* L. ssp. *napus*) are non-pathogenic on sugar beet (*Beta vulgaris* L var. *altissima*) but represent isolates of turnip yellows virus (TuYV). *Journal of Plant Diseases and Protection* 103: 233–245.
- Green S. K., Deng T. C. (1985): Turnip mosaic virus strains in cruciferous hosts in Taiwan. *Plant Disease* 69: 28–31.
- Guerret M. G. L., Nyalugwe E. P., Maina S., Barbetti M. J., van Leur J. A. G., Jones R. A. C. (2016): Biological and molecular properties of a Turnip mosaic virus (TuMV) strain that breaks TuMV resistances in *Brassica napus*. *Plant Disease* 101: 674–683.
- Gupta S. K. (2016): Brassicas, In: Gupta, S. K. (ed.): *Breeding oilseed crops for sustainable production*, pp. 33–53, Academic Press, San Diego.
- Haas M., Bureau M., Geldreich A., Yot P., Keller M. (2002): Cauliflower mosaic virus: still in the news. *Molecular Plant Pathology* 3: 419–429.
- Hein A. (1984): Transmission of Turnip yellow mosaic virus by seeds of *Camelina sativa* (gold of pleasure). *Journal of plant diseases and protection* 91: 549–551.
- Hiebert E., McDonald J. G. (1973): Characterization of some proteins associated with viruses in the potato Y group. *Virology* 56: 349–361.
- Hoggan I., Johnson J. (1935): A virus of Crucifers and other hosts. *Phytopathology* 25: 640–644.

- Hoh F., Uzest M., Drucker M., Plisson-Chastang C., Bron P., Blanc S., Dumas C. (2010): Structural insights into the molecular mechanisms of Cauliflower mosaic virus transmission by its insect vector. *Journal of Virology* 84: 4706–4713.
- Hohn T., Hohn B., Pfeiffer P. (1985): Reverse transcription in CaMV. *Trends in Biochemical Sciences* 10: 205–209.
- Hull R., Covey S. N., Dale P. (2009): Genetically modified plants and the 35S promoter: assessing the risks and enhancing the debate. *Microbial Ecology in Health and Disease* 12: 1–5.
- International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). [online] [navštíveno 27. 12. 2019]. Dostupné z <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>.
- Jay C. N., Rossall S., Smith H. G. (1999): Effects of beet western yellows virus on growth and yield of oilseed rape (*Brassica napus*). *The Journal of Agricultural Science* 133: 131–139.
- Jenner C. E., Keane G. J., Jones J. E., Walsh J. A. (1999): Serotypic variation in turnip mosaic virus. *Plant Pathology* 48: 101–108.
- Jenner C. E., Walsh J. A. (1996): Pathotypic variation in turnip mosaic virus with special reference to European isolates. *Plant Pathology* 45: 848–856.
- Johnson G., Nolan T., Bustin S. (2013): Real-time quantitative PCR, pathogen detection and MIQE. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) 943: 1–16.
- Kamitani M., Nagano A. J., Honjo M. N., Kudoh H. (2019): A survey on plant viruses in natural Brassicaceae communities using RNA-Seq. *Microbial Ecology* 78: 113–121.
- Kashiwazaki S., Minobe Y., Hibino H. (1991): Nucleotide sequence of barley yellow mosaic virus RNA 2. *The Journal of General Virology* 72: 995–999.
- Kegler H., Ehrig F., Rabenstein F. (1998): Evidence of a plant virus in Iceland. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 31: 241–246.
- Kumar S., Stecher G., Tamura K. (2016): MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33: 1870–1874.
- Laflèche D., Bové C., Dupont G., Mouchès C., Astier T., Garnier M., Bové J. M. (1972): Site of viral RNA replication in the cells of higher plants: TYMV-RNA synthesis on the chloroplast outer membrane system. *Proceedings of the 8th FEBS Meeting: RNA Viruses/ribosomes* 27: 43–71.
- Lin N. S., Hsu Y. H., Hsu H. T. (1990): Immunological detection of plant viruses and a mycoplasma-like organism by direct tissue blotting on nitrocellulose membranes. *Phytopathology* 80: 824–828.
- Ling K. S., Provvidenti R., Gonsalves D. (1995): Detection of turnip mosaic virus isolates using an antiserum to coat protein breakdown products. *Plant Disease* 79(8): 809–812.
- Liu H. Y., Koike S. T., Xu D., Li R. (2012): First report of Turnip mosaic virus in tomatillo (*Physalis philadelphica*) in California. *Plant Disease* 96: 296.
- Livak K. J., Schmittgen T. D. (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods San Diego California* 25: 402–408.
- Markham R., Smith K. M. (1949): Studies on the virus of turnip yellow mosaic. *Parasitology* 39: 330–342.

- Martín S., Elena S. F. (2009): Application of game theory to the interaction between plant viruses during mixed infections. *The Journal of General Virology* 90: 2815–2820.
- Martínez-Herrera D., Romero J., Martínez-Zapater J., Ponz F. (1994): Suitability of *Arabidopsis thaliana* as a system for the study of plant-virus interactions. *Fitopatología* 29: 132–136.
- Mayo M. A. (2002): Virology division news: ICTV at the Paris ICV: Results of the Plenary session and the binomial ballot. *Archives of Virology* 147: 2254–2260.
- McIngvale S. C., Elhanafi D., Drake M. A. (2002): Optimization of reverse transcriptase PCR to detect viable shiga-toxin-producing *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 799–806.
- Melcher U. (1989): Symptoms of Cauliflower mosaic virus infection in *Arabidopsis thaliana* and turnip. *Botanical Gazette* 150: 139–147.
- Milošević D., Ignjatov M., Nikolić Z., Stanković I., Bulajić A., Marjanović-Jeromela A., Krstić B. (2016): The presence of turnip yellows virus in oilseed rape (*Brassica napus* L.) in Serbia. *Pestic. Fitomedicina* 31: 37–44.
- Mirmajlessi S. M., Loit E., Mänd M., Mansouripour S. M. (2015): Real-time PCR applied to study on plant pathogens: potential applications in diagnosis - a review. *Plant Protection Science* 51: 177–190.
- Moreno A., Blas C.D., Biurrún R., Nebreda M., Palacios I., Duque M., Fereres A. (2004): The incidence and distribution of viruses infecting lettuce, cultivated *Brassica* and associated natural vegetation in Spain. *Ann. Appl. Biol.* 144: 339–346.
- Moreno A., Fereres A. (2012): Virus diseases in lettuce in the Mediterranean Basin, In: Loebenstein, G., Lecoq, H. (Eds.): *Advances in Virus Research, Viruses and Virus Diseases of Vegetables in the Mediterranean Basin*, pp. 247–288, Academic Press, San Diego.
- Murphy J. F., Rychlik W., Rhoads R. E., Hunt A. G., Shaw J. G. (1991): A tyrosine residue in the small nuclear inclusion protein of tobacco vein mottling virus links the VPg to the viral RNA. *Journal of Virology* 65: 511–513.
- Nguyen H. D., Tran H. T. N., Ohshima K. (2013a): Genetic variation of the Turnip mosaic virus population of Vietnam: A case study of founder, regional and local influences. *Virus Research* 171: 138–149.
- Nguyen H. D., Yasuhiro T., Ho S. Y. W., Duchêne S., Vetten H.-J., Lesemann D., Walsh J. A., Gibbs A. J., Ohshima K. (2013b): Turnip mosaic potyvirus probably first spread to Eurasian *Brassica* crops from wild orchids about 1000 years ago. *PLoS ONE* 8(2): 1–13.
- Nicolas O., Laliberté J. F. (1992): The complete nucleotide sequence of turnip mosaic potyvirus RNA. *Journal of General Virology* 73: 2785–2793.
- Ohshima K., Tomitaka Y., Wood J. T., Minematsu Y., Kajiyama H., Tomimura K., Gibbs A. J. (2007): Patterns of recombination in turnip mosaic virus genomic sequences indicate hotspots of recombination. *The Journal of General Virology* 88: 298–315.
- Ohshima K., Yamaguchi Y., Hirota R., Hamamoto T., Tomimura K., Tan Z., Sano T., Azuhata F., Walsh J. A., Fletcher J., Chen J., Gera A., Gibbs A. (2002): Molecular evolution of Turnip mosaic virus: evidence of host adaptation, genetic recombination and geographical spread. *The Journal of General Virology* 83: 1511–1521.
- Penazova E., Eichmeier A., Pokluda R. (2016): New real-time RT-PCR assays for detection of TYMV (Turnip yellow mosaic virus) and evaluation of reaction of cabbages

- to TYMV infection. Proceedings of International PhD Students Conference: 742–747.
- Pfaffl M. W. (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29(9): e45, 2002–2007.
- Pfaffl M. W., Hageleit M. (2001): Validities of mRNA quantification using recombinant RNA and recombinant DNA external calibration curves in real-time RT-PCR. *Biotechnology Letters* 23: 275–282
- Provvidenti R. (1980): Evaluation of Chinese cabbage cultivars from Japan and the People's Republic of China for resistance to turnip mosaic virus and cauliflower mosaic virus. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 105: 571–573.
- Raybould A. F., Maskell L. C., Edwards M. L., Cooper J. I., Gray A. J. (1999): The prevalence and spatial distribution of viruses in natural populations of Brassica oleracea. *New Phytologist* 141: 265–275.
- Reyes A. A., Chadha K. C. (1972): Interaction between *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* and turnip mosaic virus in *Brassica campestris* var. *chinensis* seedlings. *Phytopathology* 62, 1424–1428.
- Richter J., Proll E., Rabenstein F., Stanarius A. (1994): Serological detection of members of the Potyviridae with polyclonal antisera. *Journal of Phytopathology*: 142: 11–18.
- Riechmann J. L., Laín S., García J. A. (1992): Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. *Journal of General Virology* 73: 1–16.
- Sánchez F., Wang X., Jenner C. E., Walsh J. A., Ponz F. (2003): Strains of Turnip mosaic potyvirus as defined by the molecular analysis of the coat protein gene of the virus. *Virus Research* 94: 33–43.
- Schultz E. S. (1921): A transmissible mosaic disease of chinese cabbage, mustard and turnip. *Journal of Agricultural Research* 22: 173-178.
- Schwingamer M. W., Schilg M. A., Walsh J. A., Bambach R. W., Cossu R. M., Bambridge J. M., Hind-Lanoiselet T. L., McCorkell B. E., Cross P. (2014): Turnip mosaic virus: potential for crop losses in the grain belt of New South Wales, Australia. *Australasian Plant Pathology* 43: 663–678.
- Schwingamer M. W., Thomas J. E., Parry J. N., Schilg M. A., Dann E. K. (2007): First record of natural infection of chickpea by Turnip mosaic virus. *Australasian Plant Disease Notes* 2: 41–43.
- Shattuck V. I. (1992): The biology, epidemiology, and control of Turnip mosaic virus, In: Janick J. (ed.): *Plant Breeding Reviews* 14, pp. 199–238, John Wilkey and Sons, New York.
- Shattuck V. I., Brolley B., Stobbs L. W., Lougheed E. C. (1989): The effect of turnip mosaic virus infection on the mineral content and storability of field-grown rutabaga. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 20: 581–595.
- Shepherd R. J., Bruening G. E., Wakeman R. J. (1970): Double-stranded DNA from cauliflower mosaic virus. *Virology* 41: 339–347.
- Smith H., Hinckes J. (1985): Studies on Beet western yellows virus in oilseed rape (*Brassica napus* ssp. *oleifera*) and sugar beet (*Beta vulgaris*). *Annals of Applied Biology* 107: 473–484.
- Smith K. M. (1977): *Plant viruses*, 6. ed. Science Paperbacks, Chapman and Hall, London.
- Sorel M., Garcia J. A., German-Retana S. (2014): The Potyviridae cylindrical inclusion helicase: A key multipartner and multifunctional protein. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 27: 215–226.

- Špak J., Kubelková D. (1990): Occurrence of turnip mosaic virus in opium poppy (*Papaver somniferum*) in CSFR. *Ochrana Rostlin - UVTIZ (CSFR)* 26: 257–261.
- Spence N. J., Phiri N. A., Hughes S. L., Mwaniki A., Simons S., Oduor G., Chacha D., Kuria A., Ndirangu S., Kibata G. N., Marris G. C. (2007): Economic impact of Turnip mosaic virus, Cauliflower mosaic virus and Beet mosaic virus in three Kenyan vegetables. *Plant Pathology* 56: 317–323.
- Stavolone L., Alioto D., Ragozzino A., Laliberté J. F. (1998): Variability among turnip mosaic potyvirus isolates. *Phytopathology* 88: 1200–1204.
- Stevens M., Clark B., McGrann G. (2008): Turnip yellows virus (syn Beet western yellows virus): An emerging threat to European oilseed rape production. *Research Review* No. 69, HGCA, London.
- Stevens M., Smith H. G., Hallsworth P. B. (1994): The host range of beet yellowing viruses among common arable weed species. *Plant Pathology* 43: 579–588.
- Suehiro N., Natsuaki T., Watanabe T., Okuda S. (2004): An important determinant of the ability of Turnip mosaic virus to infect *Brassica* spp. and/or *Raphanus sativus* is in its P3 protein. *Journal of General Virology* 85: 2087–2098.
- Sun S. R., Ahmad K., Wu X. B., Chen J. S., Fu H. Y., Huang M. T., Gao S. J. (2018): Development of quantitative Real-time PCR assays for rapid and sensitive detection of two Badnavirus species in sugarcane. *BioMed Research International* 2018: 1–10.
- Sutic D. D., Ford R. E., Tomic M. T. (1999): *Handbook of plant virus diseases*. CRC Press, New York.
- Tan Z., Wada Y., Chen J., Ohshima K. (2004): Inter- and intralineage recombinants are common in natural populations of Turnip mosaic virus. *The Journal of General Virology* 85: 2683–2696.
- Tomimura K., Gibbs A., Jenner C. E., Walsh J., Ohshima K. (2003): The phylogeny of Turnip mosaic virus; comparisons of 38 genomic sequences reveal a Eurasian origin and a recent "emergence" in East Asia. *Molecular Ecology* 12: 2099–111.
- Tomimura K., Špak J., Katis N., Jenner C. E., Walsh J. A., Gibbs A. J., Ohshima K. (2004): Comparisons of the genetic structure of populations of Turnip mosaic virus in West and East Eurasia. *Virology* 330: 408–423.
- Tomlinson J. A. (1987): Epidemiology and control of virus diseases of vegetables. *Annals of Applied Biology* 110: 661–681.
- Tomlinson J. A. (1970): Turnip mosaic virus. *Descriptions of Plant Viruses*. [online] [navštíveno 25. 10. 2019]. Dostupné z <http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=008>.
- Tomlinson J. A., Ward C. M. (1978): The reactions of swede (*Brassica napus*) to infection by Turnip mosaic virus. *Annals of Applied Biology* 89, 61–69.
- Tompkins C. M., Thomas H. R. (1938): A mosaic disease of Chinese cabbage. *Journal of Agricultural Research* 56: 541–551.
- Tremblay M. F., Nicolas O., Sinha R. C., Lazure C., Laliberté J. F. (1990): Sequence of the 3'-terminal region of turnip mosaic virus RNA and the capsid protein gene. *Journal of General Virology* 71: 2769–2772.
- Urcuqui-Inchima S., Haenni A., Bernardi F. (2001): Potyvirus proteins: A wealth of functions. *Virus Research* 74: 157–75.
- Vijayan V., López-González S., Sánchez F., Ponz F., Pagán I. (2017): Virulence evolution of a sterilizing plant virus: Tuning multiplication and resource exploitation. *Virus Evolution* 3(2): 1–11.

- Viralzone. [online] [navštíveno 25. 10. 2019]. Dostupné z <https://viralzone.expasy.org/48>.
- Walkey D. G. A., Neely H. A. (1980): Resistance in white cabbage to necrosis caused by turnip and cauliflower mosaic viruses and pepper-spot. *The Journal of Agricultural Science* 95: 703–713.
- Walkey D. G. A., Pink D. A. C. (1990): Studies on resistance to beet western yellows virus in lettuce (*Lactuca sativa*) and the occurrence of field sources of the virus. *Plant Pathology* 39: 141–155.
- Walkey D. G. A., Pink D. A. C. (1988): Reactions of white cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*) to four different strains of turnip mosaic virus. *Annals of Applied Biology* 112: 273–284.
- Walkey D. G. A., Webb M. J. W. (1984): The use of a simple electron microscope serology procedure to observe relationships of seven potyviruses. *Journal of Phytopathology* 110: 319–327.
- Walkey D. G. A., Webb M. J. W. (1978): Internal necrosis in stored white cabbage caused by turnip mosaic virus. *Annals of Applied Biology* 89: 435–441.
- Walsh J. A., Jenner C. E. (2006): Resistance to Turnip mosaic virus in the Brassicaceae, In: Loebenstein, G., Carr, J.P. (eds.), *Natural Resistance Mechanisms of Plants to Viruses*, pp. 415–430, Springer Netherlands, Dordrecht.
- Walsh J. A., Jenner C. E. (2002): Turnip mosaic virus and the quest for durable resistance. *Molecular Plant Pathology* 3: 289–300.
- Walsh J. A., Tomlinson J. A. (1985): Viruses infecting winter oilseed rape (*Brassica napus* ssp. *oleifera*). *Annals of Applied Biology* 107: 485–495.
- Wylie S., Adams M., Chalam C., Kreuze J., López-Moya J. J., Ohshima K., Praveen S., Rabenstein F., Frank, Stenger D., Wang A., Zerbini F., Consortium I., Lefkowitz E., Davison A. J., Siddell S. G., Simmonds P., Adams M. J., Smith D. B., Orton R. J., Sanfaçon H. (2017): ICTV virus taxonomy profile: Potyviridae. *Journal of General Virology* 8: 352–354.
- Yasaka R., Fukagawa H., Ikematsu M., Soda H., Korkmaz S., Golnaraghi A., Katis N., Ho S. Y. W., Gibbs A. J., Ohshima K. (2017): The timescale of emergence and spread of Turnip mosaic potyvirus. *Scientific Reports* 7: 1–14.
- Yasaka R., Nguyen H. D., Ho S. Y. W., Duchêne S., Korkmaz S., Katis N., Takahashi H., Gibbs A. J., Ohshima K. (2014): The temporal evolution and global spread of Cauliflower mosaic virus, a plant pararetrovirus. *PLoS ONE* 9(1): 1–12.
- Yasaka R., Ohba K., Schwinghamer M. W., Fletcher J., Ochoa-Corona F. M., Thomas J.E., Ho S. Y. W., Gibbs A. J., Ohshima K. (2015): Phylodynamic evidence of the migration of turnip mosaic potyvirus from Europe to Australia and New Zealand. *Journal of General Virology* 96: 701–713.
- Zhang Z., Schwartz S., Wagner L., Miller W. (2000): A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology: A Journal of Computational Molecular Cell Biology* 7: 203–214.
- Zhao L., Feng C., Hao X., Wang R., Hu L., Wang Q., Wu Y. (2013): Detection and molecular variability of Turnip mosaic virus (TuMV) in Shaanxi, China. *Journal of Phytopathology* 162(7–8): 519–522.
- Zheng Y. X., Chen C. C., Chen Y. K., Jan F. J. (2008): Identification and characterization of a Potyvirus causing chlorotic spots on *Phalaenopsis* orchids. *European Journal of Plant Pathology* 121(1): 87–95.