

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2016

Karolína Vavroušková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



Molekulárně–biologická charakteristika genu
eIF4E* u rodu *Pisum

Bakalářská práce

Karolína Vavroušková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2016

Vedoucí práce: prof. RNDr. Milan Navrátil, CSc.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením prof. RNDr. Milana Navrátila, CSc. a za použití uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci:.....

Podpis:

Souhrn

V teoretické části mé bakalářské práce jsem se zaměřila na hostitelskou rezistenci u hrachu setého vůči *Pea seed-borne mosaic virus* (PSbMV) vyvolanou recesivními geny. Stěžejním tématem práce byl eukaryotní iniciační translační faktor (eIF4E), který hraje důležitou roli při navození rezistence. eIF4E rozeznává VPg protein u PSbMV, který je kovalentně vázán na 5' konci virové RNA, dochází mezi nimi k interakci a je umožněna translace virové RNA. U genu *eIF4E* hrachu byly zjištěny jednonukleotidové záměny, které vedou k substitucím v aminokyselinových řetzcích eIF4E. Některé z těchto záměn mohou za to, že nedochází k rozeznání VPg proteinu, nedojde tak k zahájení reprodukčního cyklu viru a je navozena rezistence.

Experimentální část byla zaměřena na analýzu 19 linií kulturních a primitivních kultivarů hrachu setého, u kterých byla zjišťována rezistence vůči PSbMV patotypu P-1 a P-2 na základě fenotypu a DAS-ELISA testu. Pomocí PCR genotypizace byly identifikovány alely *eIF4E^A*, *eIF4E^B*, *eIF4E^C* a *eIF4E^S*. V rámci práce se podařilo identifikovat potenciálně novou alelu, u které byl na základě sekvenační analýzy detekován dosud nepopsaný jednonukleotidový polymorfismus v pozici 197., což vedlo k tomu, že po překladu do aminokyselinové sekvence byl detekován místo argininu prolin. Toto zjištění vedlo k popisu potenciálně nové alely genu *eIF4E*.

Summary

In the theoretical part of this bachelor thesis I focused on host resistance in pea against *Pea seed borne mosaic virus* (PSbMV) induced by recessive resistance genes. The main topic of this thesis was eukaryotic initiation translation factor (eIF4E), which plays an important role in inducing resistance. eIF4E recognises VPg protein, which is covalently linked to 5' end virus RNA of PSbMV. They interact to each other and after that translation of virus RNA is permitted. In gene of eIF4E there were identified single nucleotide polymorphisms, which led to substitutions in amino acid chain of eIF4E. Some of these substitutions can cause not recognition of VPg protein, the replication cycle of virus is not launched and the resistance is induced.

Experimental part was focused on analysis 19 lines of primitive and cultivated cultivars of pea. Resistance against PSbMV pathotype P-1 and P-2 in these plants was detected by phenotype and by DAS-ELISA test and alleles of *eIF4E* were identified using PCR amplification. In this thesis was managed to detect potential new allele based on not yet described single nucleotide polymorphism in 197. position. After translation into amino acid sequence there was identified proline instead of arginine.

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu mé práce prof. RNDr. Milanu Navrátilovi, CSc. za odborné vedení, věcné připomínky a čas, který mi věnoval. Díky patří také celému týmu Laboratoře molekulární biologie mikroorganismů za příjemnou atmosféru a za veškerou pomoc při zpracování experimentální části mé bakalářské práce. Stejně tak děkuji Interní grantové agentuře Univerzity Palackého v Olomouci (IGA_PrF_2016_003) za podporu.

Obsah

1	Úvod.....	9
2	Cíle práce	10
3	Literární přehled	11
3.1	Rezistence rostlin vůči virovým patogenům.....	11
3.1.1	Nehostitelská rezistence	11
3.1.2	Hostitelská rezistence.....	12
3.2	Hostitelská rezistence podmíněná geny	12
3.2.1	Dominantní geny rezistence	13
3.2.2	Recesivní geny rezistence	15
3.2.2.1	Recesivní rezistence u <i>Pisum sativum</i>	17
3.3	Funkce translačních iniciačních faktorů eIF v eukaryotní buňce	18
3.3.1	Interakce eIF4E a VPg proteinu	19
3.4	Eukaryotní iniciační translační faktor 4E u <i>Pisum sativum</i>	20
3.4.1	Struktura a variabilita genu eIF4E	20
3.4.2	Sekundární a terciální struktura proteinu eIF4E	22
4	Materiál a metody	24
4.1	Biologický materiál	24
4.1.1	Hrách setý (<i>Pisum sativum</i> L.).....	24
4.1.2	Virové izoláty.....	24
4.2	Mechanická inokulace	25
4.3	Izolace DNA	25
4.4	DAS-ELISA test	25
4.5	Genotypizace hrachu pomocí polymerázové řetězové reakce	26
4.6	Elektroforetická separace PCR produktů.....	29
4.7	Izolace DNA pomocí DNeasy Plant Mini Kit	29
4.8	Sekvenování.....	30
4.8.1	Izolace PCR produktů z gelu.....	30
4.8.2	Sekvenační značení	30
4.8.3	Analýza sekvencí.....	31
4.9	Použité chemikálie.....	32
4.10	Použité kity	32
4.11	Použité roztoky a jejich složení	32
4.12	Použité přístroje	34
5	Výsledky	35
5.1.1	Linie vnímavé vůči patotypu P-1	35
5.1.2	Linie rezistentní vůči patotypu P-1	38

5.1.3	Linie s vnímavými i rezistentními rostlinami vůči patotypu P-1	40
5.1.4	Linie kompletně vnímavé vůči patotypu P-2	41
5.1.5	Linie kompletně rezistentní vůči patotypu P-2	41
5.1.6	Linie s vnímavými i rezistentními rostlinami vůči patotypu P-2	41
6	Diskuze	44
7	Závěr	48
8	Seznam použité literatury	49
9	Příloha	56
9.1	Část mnohočetného alignmentu genu <i>eIF4E</i> u vybraných rostlin s typickými inzercemi a delecemi v intronu 3	56

1 Úvod

Pea seed-borne mosaic virus patří do čeledi *Potyviridae* a jeho přirozeným hostitelem je hrách, bob, čočka nebo cizrna. Infekce může způsobovat velké hospodářské škody, proto je v našem zájmu studium mechanismů navozujících rezistenci a pěstování rezistentních genotypů, díky kterým můžeme zabránit každoročním vysokým škodám v zemědělství.

U hrachu je jedním ze způsobů ochrany proti infekcím způsobeným PSbMV rezistence podmíněná recesivními geny. Tyto geny ve většině případů kódují protein eukaryotního iniciačního translačního faktoru (eIF4E), který je nezbytný pro zahájení translace. eIF4E se specificky váže na čepičku na 5' konci mRNA, umožňuje vazbu dalších iniciačních faktorů a také vazbu malé ribozomální podjednotky. V případě potyvirů dochází místo čepičky k interakci s virovým VPg proteinem navázaným na 5' konci virové RNA, a tím je umožněna translace virové +ssRNA. Aminokyselinovými substitucemi u eIF4E je možné navodit rezistenci vůči *Pea seed-borne mosaic virus*. Princip takto vzniklé rezistence je takový, že nedojde k vytvoření vazby mezi VPg proteinem a eukaryotním iniciačním translačním faktorem. Tím pádem nedojde k nasednutí malé podjednotky ribozomu a dalších iniciačních faktorů a je potlačena translace virové +RNA.

Experimentální část bakalářské práce byla zaměřena na detekci alel *eIF4E* u různých linií *Pisum sativum* a na porovnání zjištěné alely s fenotypovým projevem rostliny po infekci způsobené PSbMV.

2 Cíle práce

- Vypracování literární rešerše se zaměřením na genetickou variabilitu genu *eIF4E* a jeho biologického významu pro navození rezistence rostlin vůči virům.
- Zvládnutí metod: odběr vzorku, izolace DNA, PCR, sekvenování, bioinformatika, detekce viru pomocí ELISA testu, pěstování hrachu, inokulace.
- Detekce a typizace genu *eIF4E* ve vybraném souboru kulturních a primitivních kultivarů hrachu.
- Stanovení biologické funkce potenciálně nových variant genu *eIF4E*.

3 Literární přehled

3.1 Rezistence rostlin vůči virovým patogenům

Rostliny musí každý den odolávat širokému spektru patogenů, mezi které patří i viry. Jedná se o submikroskopické intracelulární parazity, kteří obsahují nukleovou kyselinu uloženou v bílkovinném obalu. Ta je schopna zprostředkovat svoji replikaci jen uvnitř vhodné hostitelské buňky. Pokud virus pronikne do rostliny, může dojít k zahájení replikačního cyklu a následnému rozšíření v rostlině. Pokud se virus rozšíří například v sadech, plantážích nebo na poli, mohou vznikat velké hospodářské škody. U mnohých rostlin se vyvinuly mechanismy zajišťující jejich rezistenci vůči těmto patogenům (Hammond–Kosack a Parker, 2003). Dle Coopera a Jonese (1983) je rostlina rezistentní, pokud dokáže potlačit replikaci viru, a tudíž je schopna potlačit i symptomy infekce. Fraser (1990) rozlišuje 3 typy rezistence - nehostitelskou, odrůdovou, kdy jsou pouze určité genotypy rostlin rezistentní nebo naopak vnímavé, a získanou, při které dochází ke zvýšení obranných mechanismů rostliny například po předchozí infekci. Dangl a Jones (2001) a Thordal-Christensen (2003) ve svých pracích uvádějí rozdělení na nehostitelskou a hostitelskou rezistenci podle toho, zda je rostlina pro daný virus přirozeným hostitelem či nikoliv.

3.1.1 Nehostitelská rezistence

Nehostitelská rezistence je nejběžnější forma rezistence rostlin. Jedná se o rezistenci vůči širokému spektru potenciálních patogenů včetně virů, která se vyskytuje u všech rostlin (Heath, 2000). Charakteristické pro ni je, že nedochází k vytvoření vztahu mezi hostitelem a patogenem. Primárně může být zabráněno vniknutí viru do rostliny například kutikulou. Jedná se o primární bariéru (Soosaar a kol., 2005; Gururani a kol., 2012). I když virus do rostliny pronikne, nedojde k jeho pomnožení, protože rostlina není přirozeným hostitelem pro virus. Například tabák nebo hrách nejsou hostitelskými rostlinami pro virus mozaiky jabloní (*Apple mosaic virus*, ApMV). Běžnými hostiteli jsou jabloně, broskvoně nebo švestka domácí a ApMV hrách ani tabák nenapadá. Fraser (1985) uvádí další příklad nehostitelské rezistence. Virus mozaiky tabáku (*Tobacco mosaic virus*, TMV) vyžaduje pH 8 a nízkou koncentraci Ca^{2+} iontů v místě, kde dochází k uvolnění RNA z virionu. Takovéto prostředí je mu poskytnuto v rostlině tabáku nebo v ostatních rostlinách z čeledi lilkovitých, které jsou pro virus přirozenými hostiteli. Pokud cytoplazma nemá hodnotu pH 8 a nízkou

koncentrací Ca^{2+} iontů, nemůže se genetická informace TMV v rostlině šířit. Toto prostředí je inkompatibilní s prostředím, které virus k šíření potřebuje.

3.1.2 Hostitelská rezistence

Hostitelská rezistence se na rozdíl od nehostitelské zaměřuje na navození rezistence vůči konkrétním virům. Výše zmíněný tabák je typickým hostitelem pro TMV. Pokud do rostliny tabáku virus pronikne, hostitelská rostlina (tabák) se začne bránit. Jedním z obranných mechanismů je navození rezistence dominantně či recesivně řízenými geny. Produkty dominantních genů rezistence rozpoznávají virus, a jako následek obrany mohou například vyvolat hypersenzitivní odpověď (Soosar a kol., 2005). U zmiňovaného tabáku se konkrétně jedná o gen *N* zajišťující rezistenci vůči TMV (Whitman a kol., 1994).

Geny podmíněné recesivně pak nejčastěji kódují některý z faktorů, který je nezbytný pro pomnožení viru v rostlině (Diaz-Pendon a kol., 2004). U tabáku se jedná o gen *va*, který kóduje eukaryotní iniciační translační faktor 4E (eIF4E). V přítomnosti aminokyselinových substitucí v polypeptidovém řetězci eIF4E dokáže být potlačena iniciace translace +RNA virů uvnitř hostitelské buňky tabáku, což je spojováno se zabráněním replikace viru v rostlině (Julio a kol., 2015).

3.2 Hostitelská rezistence podmíněná geny

Geny zajišťující hostitelskou rezistenci se mohou vyskytovat v dominantní či recesivní formě (Rodrigues a kol., 2009). Tyto geny poskytují vysoce účinnou ochranu a je možné pěstováním odolných rostlinných kultivarů redukovat hospodářské ztráty způsobené viry. Rostliny vykazující rezistenci založenou na recesivních genech jsou považovány za více odolné vůči virům než rostliny s rezistencí podmíněnou dominantními geny. Jako důvod je uváděno, že pro viry je těžší překonat recesivní geny rezistence. Tyto geny totiž zabraňují rozšíření viru na základě absence faktorů nezbytně nutných k dokončení virového pomnožení ve srovnání s dominantními geny, které může virus překonat snadněji. Například na základě špatných rozeznávacích mechanismů, kdy virus nerozezná produkty *R*-genů a nemusí být zabráněno šíření viru v rostlině (Cavatorta a kol., 2008). Ovšem trvalost hostitelské rezistence se odvíjí hlavně od toho, zda se vyvine nový virulentní kmen, který překoná mechanismy působící proti šíření viru v rostlině (Lecoq a kol., 2004).

3.2.1 Dominantní geny rezistence

Většina dominantně rezistentních genů (*R*-gene) kóduje proteiny, které patří do třídy 'nucleotide binding site-leucine-rich repeat' (NBS-LRR). Tyto proteiny mohou být dále rozděleny na základě přítomnosti homologní domény TIR (Toll-interleukin-1 receptor) nebo CC domény (coiled-coil) na N' konci proteinu (Hammond-Kosak a Parker, 2003; Maule a kol., 2007).

Úkolem těchto proteinů je specificky rozeznávat virový avirulentní faktor (*avr*), což je například plášťový protein nebo pohybový protein (Hammond-Kosak a Jones, 1997; Dangl a kol., 2001). Interakce mezi proteiny kódovanými *R*-geny a proteiny *avr* genů mohou být dle Keena (1990) přímé, kdy se produkty *R*-genů chovají jako receptory a interagují s produkty *avr* genů. Nicméně, tento receptor–ligand model se ve vztahu virů a produktů *R*-genů nevyskytuje často (Martin a kol., 2003). Následně Van der Biezen a Jones (1998) navrhli tzv. guard hypotézu (model strážce), která je v současnosti stále více akceptovaná. Zjistili, že rostlinné *R*-proteiny (guards) asociují s endogenním proteinem hostitele, který je cílem pro patogenní proteiny. Patogen způsobuje změnu v kvartérní struktuře hostitelského proteinu, což je rozpoznáno *R*-proteiny (guards), a to vede k aktivaci signální kaskády způsobující rezistentní odpověď (Soosar a kol., 2005; Gurarani a kol., 2012). Tato oblast je stále předmětem výzkumů, proto byl navržen další model. Jedná se o tzv. decoy model (model návnady), kdy jsou rostlinou kódovány proteiny, které slouží jako „návnada“ pro patogenní proteiny - fungují jako mediátor při interakci s *R*-proteiny (van der Hoorn a Kamoun, 2008).

Poté, co dojde k interakci mezi produkty *R*-genů a *avr* genů na základě některého z výše popsaných modelů, jsou aktivovány obranné mechanismy rostlin. Příkladem obranného mechanismu zprostředkovaného dominantními *R*-geny je hypersenzitivní odpověď. Při ní dochází k programované buněčné smrti infikovaných buněk (PCD) a v místě infekce se vytvářejí nekrózy, ve kterých je vysoký obsah PR-proteinů (pathogenesis-related proteins) (Pontier a kol., 1988; Soosar a kol., 2005). V průběhu hypersenzitivní reakce dochází také ke změnám v iontových kanálech, k aktivaci signálních drah (převážně kinazové kaskády), k produkci reaktivních forem kyslíku (ROS), peroxidu vodíku a hydroxylových radikálů nebo oxidu dusičného (Delledone a kol., 1998; Grant a Loake, 2000). V obraně proti virovým patogenům hrají také důležitou roli fytohormony. Jedná se především o kyselinu salicylovou, která například určuje hranici vytvořené nekrotické léze, dále ethylén či kyselinu jasmonovou (Soosar a kol., 2005).

Maule (2007) uvádí, že do roku 2007 bylo klonováno a blíže popsáno 12 dominantních genů, de Ronde jich v roce 2014 zmiňuje již 22 (viz Tabulka 1).

Tabulka 1: Dominantní geny rezistence
(upraveno dle de Ronde, 2014)

Rostlinný druh	Dominantní gen (R-gen)	Virus	Avr (avirulentní faktor)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>HRT</i>	<i>Turnip crinkle virus</i>	Plášťový protein
	<i>RCY1</i>	<i>Cucumber mosaic virus</i>	Plášťový protein
<i>Brassica campestris</i>	<i>BcTuR3</i>	<i>Turnip mosaic virus</i>	Neznámý
<i>Capsicum annuum</i> <i>frutescens</i> <i>chinense</i> <i>chacoense</i>	$L^1 - L^4$	<i>Tobacco mosaic virus</i> <i>Tomato mosaic virus</i> <i>Tobacco mild green mosaic virus</i> <i>Paprika mild mottle virus</i> <i>Obuda pepper mottle virus</i> <i>Pepper mild mottle virus</i>	Plášťový protein
<i>Glycine max</i>	<i>Rsv1</i>	<i>Soybean mosaic virus</i>	
<i>Cucumis melo</i>	<i>Pvr1</i> <i>Pvr2</i>	<i>Papaya ringspot virus</i>	Neznámý
<i>Nicotiana glutinosa</i>	<i>N</i>	<i>Tobacco mosaic virus</i>	Helikáza
<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>I</i>	<i>Bean common mosaic virus</i> <i>Bean necrotic mosaic virus</i> <i>Blackeye cowpea mosaic virus</i> <i>Azuki mosaic virus</i> <i>Cowpea aphid-borne mosaic virus</i> <i>Passionfruit woodiness virus</i> <i>Soybean mosaic virus</i> <i>Thailand passiflora virus</i> <i>Watermelon mosaic virus</i> <i>Zuchinni yellow virus</i>	Neznámý
	<i>PvVTT1</i>	<i>Bean dwarf mosaic virus</i>	Protein BV1
	<i>PvCMR1</i>	<i>Cucumber mosaic virus</i>	Gen 2a
<i>Poncirus trifoliata</i>	<i>Ctv</i>	<i>Citrus tristeza virus</i>	Neznámý

Tabulka 1: Dominantní geny rezistence (pokračování)
(upraveno dle de Ronde, 2014)

Rostlinný druh	Dominantní gen (<i>R</i> -gen)	Virus	Avr (avirulentní faktor)
<i>Solanum peruvianum</i>	<i>Sw5b</i>	<i>Tomato spotted wilt virus</i>	Pohybový protein
	<i>Tm-2</i>	<i>Tobacco mosaic virus</i> <i>Tomato mosaic virus</i>	Pohybový protein
	<i>Tm-2²</i>	<i>Tomato mosaic virus</i> <i>Tobacco mosaic virus</i>	Pohybový protein
<i>Solanum tuberosum</i>	<i>Rx1</i>	<i>Potato virus X</i>	Plášťový protein
	<i>Rx2</i>	<i>Potato virus X</i>	Plášťový protein
	<i>Rx2</i>	<i>Potato virus X</i>	Plášťový protein
	<i>Y-1</i>	<i>Potato virus Y</i>	Neznámý
<i>Solanum hirsutum</i>	<i>CYR1</i>	<i>Mungbean yellow mosaic virus</i>	Plášťový protein

Tabulka 2: Dominantní geny rezistence nepatřící do skupiny NB-LRR
(upraveno dle de Ronde, 2014)

Rostlinný druh	Dominantní gen (<i>R</i> -gen)	Virus	Avr (avirulentní faktor)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>JAX1</i>	Zajišťuje rezistenci vůči potexvirům	Neznámý
	<i>RTM1</i> <i>RTM2</i> <i>RTM3</i>	<i>Tobacco ech virus</i> <i>Plum pox virus</i> <i>Lettuce mosaic virus</i>	Plášťový protein
	<i>Ty-1</i> <i>Ty-2</i>	<i>Tomato yellow leaf curl virus</i>	
<i>Solanum hirsutum</i>	<i>Tm-1</i>	<i>Tomato mosaic virus</i>	Helikázová doména

3.2.2 Recessivní geny rezistence

Rezistence kromě dominantních genů může být vyvolána i geny, které jsou děděny recesivně. Obecný mechanismus, kterým fungují recesivní geny rezistence, vysvětlují dvě hypotézy. První poukazuje na to, že se může jednat o pasivní mechanismus. Pasivní proto, že přímo nedochází k interakci mezi proteiny kodovanými virem a proteiny recesivních genů rezistence. Tyto recesivní geny rezistence ale na rozdíl od těch dominantních kódují v hostitelské rostlině proteiny, které jsou nutné pro

dokončení replikace viru. Následná rezistence pak bývá zapříčiněna mutacemi v tomto proteinu nebo samotnou absencí tohoto proteinu. Příkladem jsou eukaryotní translační faktory skupiny 4E a 4G, u kterých bylo možné identifikovat mutantní alely, které mohou poskytovat recesivní rezistenci vůči RNA virům (Maule a kol., 2007). Wang a Krishnaswamy (2012) uvádějí, že z celkového počtu 14 recesivních rezistentních genů proti virovým patogenům, které byly v poslední době identifikovány, 12 z nich kóduje iniciační translační faktor 4E (eIF4E) nebo jeho isoformu eIF(iso)4E (viz Tabulka 3).

Druhá hypotéza zprostředkovává rezistenci pomocí aktivních mechanismů. Rezistentní rostlina produkuje inhibitory znemožňující následnou replikaci viru v rostlině. Tyto inhibitory rozeznávají virem kódované molekuly a následně je spuštěna rezistentní odpověď (Diaz–Pendon a kol., 2004). V současné době je v interakci virus-rostlina preferována první hypotéza (Lellis a kol., 2002).

Tabulka 3: Recesivní geny rezistence kódující eIF4E
(převzato z Truniger a Aranda, 2009; doplněno z Julio a kol., 2014)

Rostlinný druh	Recesivní gen	Virus
<i>Capsicum annuum</i> *	<i>prv2²</i> + <i>prv6</i>	<i>Pepper vein mottle virus</i> <i>Tobacco etch virus</i>
<i>Cucumis mělo</i>	<i>Nsv</i>	<i>Melon necrotic spot virus</i>
<i>Horgeum vulgare</i>	<i>rym</i> , <i>rym 5</i>	<i>Barley mild mosaic virus</i> <i>Barley yellow mosaic virus</i>
<i>Lettuce sativa</i> **	<i>mol¹</i> <i>mol²</i>	<i>Lettuce mosaic virus</i>
<i>Oryza sativa</i>	<i>rymv-1</i>	<i>Rice yellow mottle virus</i>
<i>Pisum sativum</i>	<i>sbm-1</i>	<i>Pea seed borne mosaic virus</i> <i>Bean yellow mosaic virus</i>
<i>Solanum hirsutum</i>	<i>pot-1</i>	<i>Potato virus Y</i> <i>Tobacco etch virus</i>
<i>Nicotiana glukotinososa</i>	<i>Va</i>	<i>Potato virus Y</i>

* Geny *pvr2²* a *pvr6* působí pouze dohromady, samostatně rezistenci vůči PVMV nevyvolávají (Caranta a kol., 1996).

** Gen *mol¹* byl dříve nazýván g, je spojován s rezistencí, *mol²* s tolerancí proti LMV, která se projevuje nedostatkem symptomů (Nicaise a kol., 2003).

3.2.2.1 Recesivní rezistence u *Pisum sativum*

Rezistenci k viru semenem přenosné mozaiky hrachu (*Pea seed-borne mosaic virus*, PSbMV) u *Pisum sativum* zajišťují čtyři recesivní geny, jedná se o geny *sbm-1*, *sbm-2*, *sbm-3* a *sbm-4*. Tyto geny jsou lokalizovány na chromozomech II a VI, tedy ve dvou vazebných skupinách (Provvidenti a Alconero, 1988b; Provvidenti a Alconero, 1988c).

Vazebná skupina II leží na chromozomu II a obsahuje gen *sbm-2* (Provvidenti a Alconero, 1988a). Gao a kolektiv (2004b) zjistili, že tento gen je homologní s genem pro eukaryotní translační faktor eIF(iso)4E. Determinantou virulence je P3-6K1 protein, který se nachází v N' terminální oblasti u PSbMV. Právě tento protein interaguje s eIF(iso)4E (Johansen a kol, 2001). V této vazebné skupině se nacházejí další recesivní geny, a to *bcm*, *cyv-1*, *mo*, *pmv*, které navozují rezistenci vůči *Bean common mosaic virus* (BCMV), *Clover yellow vein virus* (CIYVV), *Watermelon mosaic virus* (WMV) a *Pea mosaic virus* (PMV) (Provvidenti a Hampton, 1991; Gao a kol., 2004a)

Další skupina recesivních genů se nachází ve vazebné skupině VI ležící na chromozomu VI a zahrnuje *sbm-1*, *sbm-3* a *sbm-4*. Tyto recesivně děděné geny jsou zodpovědné za rezistenci proti *Pea seed-borne mosaic virus* (Provvidenti a Alconero, 1988a; Johansen a kol, 1996; Hjulsager a kol., 2002). Gao a kolektiv (2004a) uvádějí, že recesivní gen *sbm-1* je homologní s genem kódujícím iniciační translační faktor 4E (eIF4E). Tato vazebná skupina obsahuje také geny *cyv-2* a *wlv*, které zprostředkovávají rezistenci vůči *White lupin mosaic virus* (WLV) a *Clover yellow vein virus* (CIYVV) (Provvidenti a Hampton, 1991; Gao a kol., 2004a; Gao a kol., 2004b).

Výše zmíněné recesivní geny u *Pisum sativum* (*sbm-1*, *sbm-2*, *sbm-3* a *sbm-4*) jsou zaměřené na zajištění rezistence proti jednotlivým patotypům PSbMV. Rozlišujeme čtyři patotypy PSbMV, a to P-1, P-2, P-3 a P-4, které jsou rozlišovány na základě neschopnosti infikovat indikátorové genotypy hrachu. Izoláty patotypu P-1, nejsou schopny infikovat hrách nesoucí gen *sbm-1*. Izoláty náležící k patotypům P-2 a P-3 nejsou schopny vyvolat infekci u hrachu nesoucí recesivní geny *sbm-2* a *sbm-3*. Rezistence k patotypu P-4 je navozena přítomností genu *sbm-4* (Alconero a Provvidenti, 1986; Johansen a kol., 1996; Hjulsager a kol., 2002; Hjulsager a kol., 2006).

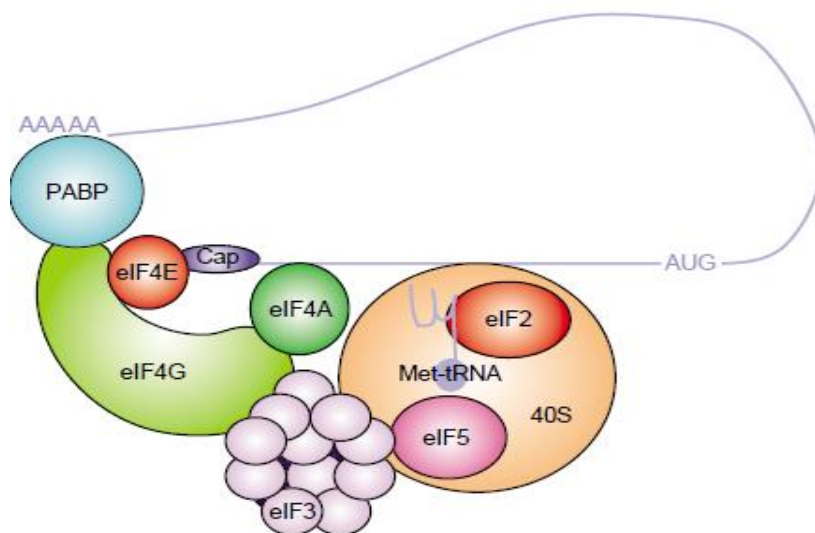
Na základě rezistence či vnímavosti k jednotlivým patotypům lze hrách rozdělit do 4 kategorií (A, B, C a D). Kategorie A je vnímavá vůči všem patotypům, zatímco kategorie B je rezistentní vůči všem patotypům, tedy P-1, P-2, P-3 a P-4. Kategorie C je rezistentní pouze vůči P-2 a P-3. Kategorie D se pak vyznačuje rezistencí k P-1 a P-2 a

vnímavosti k patotypům P-3 a P-4 (Olsen a kol., 2001; Hjulsager a kol., 2002; Hjulsager a kol., 2006).

3.3 Funkce translačních iniciačních faktorů eIF v eukaryotní buňce

Zhang (2006) shrnuje hlavní funkce eIF4E. První je, že eIF4E dokáže stabilizovat mRNA tím, že ji chrání proti působení endonukleáz DCP1p či XRN1p, které mohou způsobit její degradaci (Schwartz a Parker, 2000; Vilela a kol., 2000). Další funkcí eIF4E je usnadnění intracelulárního transportu RNA potyvirů tím, že dokáže vázat mikrotubuly (Bokros a kol., 1995). Hlavní role eIF4E je ovšem zprostředkovat iniciaci translace, následně rozpoznat a interagovat s oblastí vážící čepičku na 5' konci mRNA. Celého procesu iniciace translace se zúčastní velký počet iniciačních faktorů, kterých je u eukaryotních organismů nejméně dvanáct. Hlavní úloha těchto proteinů je umožnit vazbu ribozomu na mRNA (Aitken a Lorsch, 2012).

Iniciace translace začíná navázáním komplexu, který se skládá z Met-tRNA_i^{Met}, GTP a eIF2, na malou podjednotku ribozomu. Na podjednotku se dále váží faktory eIF1, eIF1A, eIF3 a eIF5 a vytváří se 43S preiniciační komplex. Pro nasednutí malé podjednotky na 5' konec mRNA slouží další iniciační faktory. Jedná se o eIF4F komplex, který se skládá ze dvou podjednotek - eIF4E a eIF4G. Protein eIF4E rozeznává a váže 7-methylguanidinovou čepičku na 5' konci mRNA. eIF4G interaguje s dalšími iniciačními faktory, jako jsou PABPs (polyA binding proteins). PABPs se váží na polyA úsek na 3' konci mRNA a umožňují cirkularizaci mRNA. eIF4G také interaguje s dvěma faktory eIF4A a eIF3 (Wells a kol., 1998). eIF4A slouží k rozvolňování mRNA za účasti ATP. Faktor eIF3 se váže na 40S ribozomu a u rostlin se tento faktor skládá z 12 podjednotek (Browning, 2004). eIF3 má důležitou roli v signálních drahách, dokáže regulovat translaci. Je schopen interagovat s dalšími iniciačními faktory a ribozomy (Pestova a kol., 1996; Browning, 2004; Caranta a Robaglia, 2006). Vazba ribozomu na mRNA a skenování vlákna ve směru 5' → 3' probíhá až do doby nalezení startovacího kodonu AUG. Jakmile je nalezen startovací kodon, faktor eIF5 zprostředkuje hydrolýzu GTP, kterou nese eIF2 faktor. Následně se všechny iniciační faktory uvolní a eIF5 faktor umožní vazbu velké podjednotky ribozomu (60S) a začíná syntéza polypeptidového řetězce (Pestova a kol., 1996).



Obrázek 1: Eukaryotický translační iniciační komplex (převzato z Robaglia a Caranta, 2006). Na schématu je znázorněna vazba eIF4E na 7-methylguanidinovou čepičku na 5' konci mRNA. Společně s eIF4G je součástí komplexu eIF4F. Dále jsou na schématu zobrazeny další faktory, například eIF3, eIF4A, PABP, eIF5 nebo eIF2. Na mRNA je připojena malá podjednotka ribozomu 40 S.

3.3.1 Interakce eIF4E a VPg proteinu

Virová +RNA potřebuje ke své replikaci hostitelský translační aparát buňky. U potyvirů eIF4E rozeznává místo čepičky virový VPg protein. Tento protein je kovalentně připojen pomocí fosfodiesterové vazby k virové RNA a velikost tohoto proteinu se pohybuje v rozmezí od 20-22 kDa (Murphy a kol., 1991; Jiang a Lalibrté, 2011). Právě VPg protein byl identifikován jako determinanta virulence u PSbMV a je rozeznáván eIF4E při iniciaci translace (Keller a kol., 1998; Borgstrom a Johansen, 2001; Moury a kol., 2004; Kang a kol., 2005).

Právě zahájení translace je klíčový proces pro navození rezistence vůči potyvirům. Rezistence vůči potyvirům bývá způsobena mutacemi v genu kódujícím eIF4E, který je nezbytný pro rozeznání virového VPg proteinu a následné nasednutí ribozomální podjednotky (Kang a kol., 2005; Caranta a Robaglia, 2006). Pokud dojde k aminokyselinovým substitucím (mutacím) u eIF4E, zpravidla v oblastech, které rozeznávají VPg protein, může být zabráněno iniciaci translace virové +RNA. V tomto případě nedojde k vytvoření vazby mezi VPg proteinem u potyvirů a eIF4E, čímž není umožněna vazba podjednotky ribozomu a dalších iniciačních faktorů a je navozena rezistence rostliny (Robaglia a Caranta, 2006). Michon a kol. (2006) však

uvádějí, že i přes nevytvoření vazby mezi eIF4E a VPg proteinem je stále možná translace virové RNA. Umožnění poskytuje iniciační translační faktor 4G (eIF4G).

U virů může také docházet k mutacím v genu kódujícím VPg protein, které následně mohou vést k tomu, že rovněž nedojde k iniciaci translace a virus není schopen infikovat rostlinu (Nicaise a kol., 2003).

3.4 Eukaryotní iniciační translační faktor 4E u *Pisum sativum*

Protein eIF4E je kódován genem, který je umístěn na chromozomu VI a je homologní s genem *sbm-1*, zatímco gen kódující eIF(iso)4E je homologní s genem *sbm-2* a je umístěn na chromozomu II (Smýkal a kol., 2010). Jedná se o isoformu, která se nenachází u žádných dalších eukaryotních organismů, pouze u rostlin. Proteiny eIF(iso)4E a eIF4E vykazují zhruba 50% podobnost v aminokyselinové sekvenci a jejich molekulová hmotnost je kolem 24 kDa (Browning, 1996). Oba tyto faktory, buď každý zvlášť nebo dohromady, hrají důležitou roli při pomnožení viru v rostlinách. Jsou součástí iniciačního komplexu, který zahajuje translaci virové RNA po napadení hostitelské rostliny (Robaglia a Caranta, 2006). Mutace v genech pro eIF4E nebo eIF(iso)4E dokážou zabránit iniciaci translace virové +RNA a tím navodit rezistenci rostliny (Robaglia a Caranta, 2006; Yeam a kol., 2007; Charron a kol., 2008; Truniger a Aranda, 2009).

3.4.1 Struktura a variabilita genu eIF4E

Gen *eIF4E* u *Pisum sativum* je tvořen pěti exony přerušnými čtyřmi sekvencemi intronů v celkové délce 2 152 bp u vnímavých a 2 102 bp u rezistentních linií hrachu. Po vystřížení intronů je gen dlouhý 723 bp, jak u vnímavých, tak u rezistentních rostlin (Smýkal a kol., 2010). U vnímavých rostlin hrachu se ve třetím intronu vyskytuje inserce o délce 50 bp (u některých 56 bp), kterou tvoří repetitivní sekvence podobné mikrosatelitům. Rozdílná délka třetího intronu slouží jako marker pro zjištění přítomnosti vnímavé či rezistentní alely genu *eIF4E*. Na základě toho byl navržen rychlý systém na rozlišení těchto alel, který může vést k rychlejšímu šlechtitelskému procesu a pěstování pouze rezistentních odrůd (Smýkal a kol., 2010).

Tabulka 4: Velikost intronů a exonů genu *eIF4E* u rodu *Pisum*

Exon	Velikost	Intron	Velikost
Exon 1	278 bp	Intron 1	91 bp
Exon 2	166 bp	Intron 2	89 bp
Exon 3	128 bp	Intron 3	u rezistentních 1151 bp u vnímavých 1 201 bp
Exon 4	65 bp	Intron 4	84 bp
Exon 5	50 bp		

Konečná a kol. (2014) analyzovali 2803 genotypů hrachu a na základě rozdílné délky třetího intronu identifikovali čtyři varianty genu *eIF4E*. Jedná se o *eIF4E^A*, *eIF4E^B*, *eIF4E^C* a *eIF4E^S*. Alela *eIF4E^S* se vyskytuje u vnímavých rostlin, kde délka intronu 3 je 1201 bp. Rezistentní rostliny nesou alelu *eIF4E^A* a intron 3 je dlouhý 1151 bp, což je o 50 bp méně než v případě *eIF4E^S*. Dále byly popsány alely *eIF4E^B* a *eIF4E^C*. Velikost intronu 3 je v případě alely *eIF4E^B* 1131 bp a u alely *eIF4E^C* je to pak 1257 bp. Ve vztahu ke geografickému rozšíření je nejvíce rozšířená alela *eIF4E^S*, jejíž četnost činila v Austrálii 100 %, v Evropě 96 % či Turecku 94 %. Alela *eIF4E^B* byla identifikována v liniích z Etiopie, z Afghánistánu, Indie a Číny. Četnost této alely se pohybovala do 36 %. V liniích pocházejících z Austrálie identifikována nebyla. Alela *eIF4E^C* se vyskytovala nejvíce v liniích z Indie a Pyrenejského poloostrova s četností do 25 %. Alela *eIF4E^A* byla identifikována v liniích z Indie, Jižní a Severní Ameriky. Alela *eIF4E^A* se u analyzovaných hrachů vyskytovala s četností do 8 %.

K dalším analýzám bylo použito 73 sekvencí linií hrachu, které mimo rozdílů v délce intronu 3 vykazovaly 156 jednonukleotidových záměn. Na základě pozorovaných záměn bylo identifikováno 34 dalších variant alel, které zahrnují změny v intronech a exonech (Konečná a kol., 2014).

Tyto záměny po vystřížení intronů a přepisu do aminokyselinových sekvencí vedly k popsání proteinových variant eIF4E. Konkrétně u alely *eIF4E^S* bylo popsáno sedm variant, u alely *eIF4E^A* rovněž sedm, u alely *eIF4E^B* tři varianty a u alely *eIF4E^C* se jednalo o dvě varianty. Dohromady tedy devatenáct proteinových variant (Konečná a kol., 2014).

Mezi rezistentní *eIF4E^{A-1}* a vnímavou variantou proteinu *eIF4E^{S-1}* byly identifikovány záměny pěti aminokyselin. U vnímavých linií hrachu se v pozici 62 nachází tryptofan, který byl u rezistentních linií nahrazen leucinem. V pozici 73 a 74

byla kyselina aspargová vyměněna za alanin. Arginin na pozici 107 u rezistentních linií byl substituován glycinem a lysin v pozici 169 byl nahrazen asparaginem (Gao a kol., 2004a; Smýkal a kol., 2010). Všechny tyto substituce nejsou konzervativní, protože vyměněné aminokyseliny nemají podobné vlastnosti, a projevují se na struktuře a funkci proteinu (Gao a kol., 2004a).

Kdybychom porovnali například eIF4E^{A-3} a eIF4E^{A-5}, zjistíme, že 34. aminokyselinou je u eIF4E^{A-3} kyselina glutamová, zatímco u eIF4E^{A-5} byl zjištěn alanin. Další změnou je 108. aminokyselina, kdy u eIF4E^{A-3} najdeme alanin, ale u eIF4E^{A-5} prolin, 105. aminokyselina v řetězci je u eIF4E^{A-3} histidin a u eIF4E^{A-5} arginin. Dále je pak změněna v pořadí 169. aminokyselina. U eIF4E^{A-3} se nachází asparagin, zatímco u eIF4E^{A-5} byl identifikován lysin (Konečná a kol., 2014).

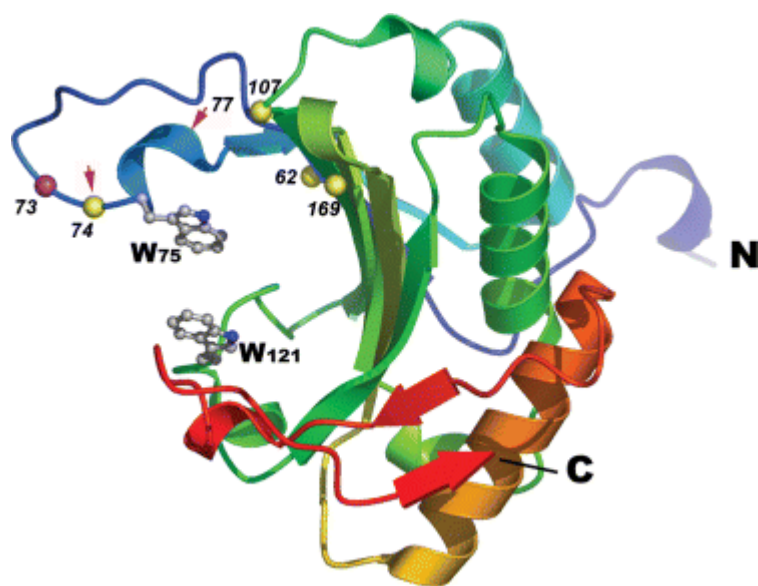
eIF4E^{B-1} se liší od eIF4E^{S-1} třemi aminokyselinami. 207. aminokyselina je u eIF4E^{S-1} methionin, zatímco u eIF4E^{B-1} se nachází izoleucin. Další substituované aminokyseliny jsou pak ty, které jsou v pořadí 218. a 219. U eIF4E^{S-1} najdeme na těchto místech leucin a kyselinu aspargovou, zatímco u eIF4E^{B-1} byl identifikován glutamin a kyselina glutamová. U eIF4E^{B-2} a eIF4E^{B-3} je dále substituována aminokyselina na 23. pozici, a to valin za kyselinu aspargovou.

Pokud bychom porovnali aminokyselinové řetězce u eIF4E^{C-1} a eIF4E^{C-2}, liší se od sebe ve dvou nukleotidech - jedna změna v exonu 1 vedla ke změně aminokyseliny. Jedná se o záměnu asparaginu za izoleucin. Druhá změna je v intronu 3, která ale nehraje ve struktuře proteinu žádnou roli.

3.4.2 Sekundární a terciální struktura proteinu eIF4E

Sekundární strukturu eIF4E u hrachu popsal Ashby a kol. (2011). Zjistili, že se jedná o monomer, který je složen z 8 antiparalelních β -skládaných listů obklopený čtyřmi α -helixy.

V terciální struktuře jsou β -skládanými listy obklopené α -helixy, které se nevyskytují pouze v oblasti vázící čepičku (Ashby a kol., 2011). Tato oblast odpovídá místu mezi dvěma tryptofanovými zbytky (W75 –W121) a je nezbytná pro první krok iniciace translace mRNA (Ashby a kol., 2011). Záměny aminokyselin, kterými se odlišují jednotlivé proteinové varianty eIF4E, jsou na základě strukturních modelů terciální struktury eIF4E soustředěny na povrchu proteinu a jsou rozděleny do dvou klastrů, jeden v blízkosti tzv. cap binding pocket a druhý je otočen o 90° od 'cap binding protein' (Monzingo a kol., 2007; Charron a kol., 2008).



Obrázek 2: Terciální struktura proteinu eIF4E u *Pisum sativum* (převzato z Gao a kol., 2004). Bledě modrá barva odpovídá N-konci a postupně přechází do červené, která odpovídá C-konci. W75 až W121 značí oblast vážící čepičku, která se váže na čepičku na 5'konci mRNA. Čísla 62, 73, 74, 77 a 107 odpovídají pozicím aminokyselinových substitucí, kterými se od sebe liší vnímavá a rezistentní forma eIF4E u *Pisum sativum*.

4 Materiál a metody

4.1 Biologický materiál

4.1.1 Hrách setý (*Pisum sativum* L.)

Pro experimentální část bakalářské práce bylo použito 19 linií převážně primitivních kultivarů hrachu, vždy po 20 rostlinách. Pro pěstování v plastových kontejnerech o rozměru 8 x 8 cm byl použit substrát Klassman 4 a rostliny byly kultivovány v podmínkách fytotronu, který byl nastaven na režim 22 °C/18 °C a 16/8 hodin den/noc.

Tabulka 5: Seznam vzorků a jejich charakteristika

Označení linie	Místo původu	Typ kultivaru
J199	Afghánistán	Primitivní kultivar
J1212	Neuvedeno	Primitivní kultivar
J1268	Kréta	Planě rostoucí
J1289	Řecko	Planě rostoucí
J11705	Neuvedeno	Planě rostoucí
J11585	Etiopie	Primitivní kultivar
J1157	Súdán	Primitivní kultivar
J11260	Indie	Primitivní kultivar
J11546	Etiopie	Primitivní kultivar
J1290	Etiopie	Planě rostoucí
J1691	Neuvedeno	Primitivní kultivar
J11346	Mongolsko	Primitivní kultivar
J11543	Mongolsko	Primitivní kultivar
J12265	Neuvedeno	Primitivní kultivar
J13112	Neuvedeno	Planě rostoucí
J1252	Etiopie	Primitivní kultivar
J1967	Etiopie	Primitivní kultivar
J11357	Afghánistán	Primitivní kultivar
J1186	Neuvedeno	Primitivní kultivar

4.1.2 Virové izoláty

Pro inokulaci byl použit izolát PSbMV117CZ viru semenem přenosné mozaiky hrachu (*Pea seed-borne mosaic virus*, PSbMV), patřící k patotypu P-1 a izolát L1 (patotyp P-2), který byl poskytnut prof. Elisabeth Johansen (Danish Institute of Plant

and Soil Science, 2800 Lyngby, Dánsko). Tyto izoláty jsou udržovány na vnímavém hrachu 'Bohatýr' na Katedře buněčné biologie a genetiky, PřF UP v Olomouci.

4.2 Mechanická inokulace

Rostliny hrachu byly mechanicky inokulovány 14 dní po výsevu. Jako inokulum sloužily listy rostlin infikovaných PSbMV, izoláty PSbMV117CZ a L1. Prvních deset rostlin v linii bylo infikováno izolátem PSbMV117CZ, dalších deset rostlin pak izolátem L1. Sterilní pinzetou byly odebrány svinuté listy, které jsou typickým příznakem infekce. K 1 g infikovaných listů byly přidány 2 ml 10 mmol/l fosfátového pufru (pH 8) s přídavkem 1 % celitu a 1 % aktivní uhlí (w/w). Vše bylo homogenizováno a molitanovou houbičkou namočenou v inokulu byly listy v prvním a druhém patře hrachu asi 6x potírány. Po 5 minutách bylo inokulum spláchnuto vodou a rostliny byly dále udržovány ve vlhkém prostředí ve skleníku. Vývoj příznaků byl sledován týdně v intervalech (minimálně 4 týdny) a 14 dní po inokulaci byly vzorky testovány na přítomnost PSbMV pomocí DAS-ELISA testu.

4.3 Izolace DNA

DNA z listů hrachu byla izolována pomocí NaOH/TRIS metody (Collard a kol., 2007; Smýkal a kol., 2010). Z testovaných rostlin hrachu setého byl odebrán cca 20 mg listový segment. K listovému segmentu v mikrozkumavce bylo přidáno 100 µl 0,5 mol/l NaOH a po mechanické homogenizaci bylo ke směsi přidáno 1,4 ml 0,1 mol/l TRIS o pH 8,0. Vzniklý homogenát byl centrifugován 10 minut při 14 000 otáčkách. Vzorky byly naředěny v poměru 1:1 deionizovanou vodou a uchovány v -20 °C.

4.4 DAS-ELISA test

K detekci izolátu PSbMV117CZ byly použity reagenty od společnosti Prime Diagnostics. Do mikrotitrační destičky bylo napipetováno 200 µl specifických protilátek (Anti-PSbMV-IgG) ředěných 1000x v potahovacím pufru. Destička byla inkubována při 4 °C přes noc. Následující den byla destička 3x promyta promývacím pufrem a do jamek bylo přidáno 200 µl listového extraktu, který byl předtím homogenizován v extrakčním pufru v poměru 1:10. Destička byla inkubována přes noc při 4 °C. Po inkubaci byla destička 3x promyta promývacím pufrem a následně bylo napipetováno 200 µl konjugátu (IgG-AP) ředěného 1000x v konjugačním pufru. Destička byla

inkubována opět přes noc při 4 °C a byla 3x promyta. Poslední krok bylo přidání 200 µl substrátu (0,75 mg sodné soli p-nitrofenylfosfátu na 1 ml substrátového pufru) a destička se nechala 30 minut inkubovat při pokojové teplotě ve tmě. Pomocí ELISA readeru (BioTek) byla hodnocena hodnota absorbance při 405 nm, která u pozitivních vzorků byla vyšší než 0,1.

Detekce izolátu L1 byla prováděna pomocí soupravy LOEWE pro detekci PSbMV dle pokynů výrobce. Do jamek ELISA destičky bylo napipetováno 100 µl specifických protilátek (Anti-PSbMV-IgG, LOEWE) ředěných 200x v potahovacím pufru a destička byla inkubována při 35 °C po dobu 3 hodin. Po uplynutí inkubační doby byla destička 3x promyta promývacím pufrům a bylo přidáno 200 µl listového extraktu připraveného homogenizací listů v extrakčním pufru v poměru 1:10. Destička byla inkubována přes noc ve 4 °C. Po noční inkubaci byla destička 3x promyta promývacím pufrům a ihned poté bylo napipetováno 100 µl konjugátu (Anti-PSbMV-AP-conjugate, LOEWE), který byl ředěn 200x v konjugačním pufru. Inkubace s konjugačním pufrům probíhala 3 hodiny při 35 °C a poté byla destička 3x promyta. Poté bylo přidáno 100 µl substrátu (0,75 mg sodné soli p-nitrofenylfosfátu na 1 ml substrátového pufru) a destička byla inkubována 1 hodinu ve tmě. Byly vyhodnoceny hodnoty absorbancí pomocí ELISA readeru (BioTek) při 405 nm, které u pozitivních vzorků byly vyšší než 0,1.

4.5 Genotypizace hrachu pomocí polymerázové řetězové reakce

Typ alely *eIF4E* byl určen PCR amplifikací s primery intron3-750F/intron3-1335R a intron3-750F/586gR (viz Tabulka 7) (Smýkal a kol., 2010). Pomocí primerů intron3-750F/1335 dostáváme po elektroforetické separaci (podkapitola 5.4) produkty o velikosti 586 bp, 536 bp, 528 bp a 642 bp. Po PCR amplifikaci s primery intron3-750/586gR dochází ke vzniku produktů o velikosti 243 bp a 293 bp. Na základě zjištění velikosti PCR produktů byl určen typ alely (viz Tabulka 6).

PCR reakční směs pro genotypizaci byla připravena podle rozpisu uvedeného v Tabulce 8. Reakční směs byla rozpipetována po 18 µl do 0,2 ml mikrozkušavek. Poté byly přidány 2 µl vzorku. PCR probíhala za podmínek uvedených v Tabulce 9.

Tabulka 6: Identifikace alely eIF4E na základě velikostí PCR produktů
(Konečná a kol., 2014)

Alela	Intron3-750F/586gR	Intron3-750F/intron3-1335R
<i>eIF4E^S</i>	293 bp	586 bp
<i>eIF4E^A</i>	243 bp	536 bp
<i>eIF4E^B</i>	293 bp	528 bp
<i>eIF4E^C</i>	293 bp	642 bp

Tabulka 7: Sekvence primerů použitých pro genotypizaci hrachu
(Smýkal a kol., 2010)

Název primeru	Sekvence primeru (5' -3')
586g-R	GAATCATTTAAGAAGCTCGTGTGAAGTG
Intron3-1335R	TCAATGAACTACCAAGTGGTCTCAG
Intron3-750F	GGACTAAGAATGCTTCAAATGAAGCTGC

Tabulka 8: Složení PCR reakční směsi pro genotypizaci

Reagencie	Koncentrace pracovního roztoku	Konečná koncentrace	Objem pro 1 test
Puf	5x	1x	4 µl
Deionizovaná voda			13,4 µl
Reverse primer 586gR / intron3-1335R	20 pmol/µl	0,2 pmol/ µl	0,2 µl
Forward primer intron3-750F	20 pmol/µl	0,2 pmol/ µl	0,2 µl
MyTaq DNA polymeráza	5 U/µl	1 U/reakce	0,2 µl
Vzorek			2 µl

Tabulka 9: Podmínky PCR genotypizační reakce
(Smýkal a kol., 2010)

Krok	Teplota	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95 °C	4 min	1
Denaturace	95 °C	30 s	40
Hybridizace	55 °C	30 s	
Elongace	72 °C	30 s	
Konečná elongace	72 °C	7 min	1

Pro stanovení sekvence genu *eIF4E* byly použity primery ATG-F, intron3-750F, intron3-1335R a end-R (viz Tabulka 10). Celý fragment genu byl rozdělen na dvě překrývající části, kdy první část byla ohraničena primery ATG-F a intron3-1335R a druhá část byla určena primery intron3-750F a end-R. PCR reakční směs byla připravena z reagentů uvedených v Tabulce 11 a rozpipetována po 23 μl do 0,2 ml mikrozkušavek. PCR reakce proběhla podle podmínek uvedených v Tabulce 12.

Tabulka 10: Sekvence primerů použitých pro amplifikaci genu *eIF4E* (Smýkal a kol., 2010)

Název primeru	Sekvence primeru (5' - 3')
ATG-F	ATGGTTGTAGAAGACACCCCAAATC
end-R	TTGCTAGTTTGCTACCATGTAAGAACG
Intron3-750F	GGACTAAGAATGCTTCAAATGAAGCTGC
Intron3-1335R	TCAATGAAACTACCAAGTGGTCTCAG

Tabulka 11: Složení PCR reakční směsi pro amplifikaci genu *eIF4E*

Reagencie	Koncentrace pracovního roztoku	Konečná koncentrace	Objem pro 1 test
Pufr	5 x	1 x	5 μl
Deionizovaná voda			16,75 μl
Reverse primer end-R / intron3-1335R	20 pmol/ μl	0,4 pmol/ μl	0,5 μl
Forward primer ATG-F / intron3-750F	20 pmol/ μl	0,4 pmol/ μl	0,5 μl
MyTaq DNA polymeráza	5 U/ μl	1 U/reakce	0,25 μl
Vzorek			2 μl

Tabulka 12: Podmínky PCR reakce pro amplifikaci genu *eIF4E*

Krok	Teplota	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95 °C	3 min	1
Denaturace	95 °C	30 s	40
Hybridizace	56 °C	30 s	
Elongace	72 °C	2 min	
Konečná elongace	72 °C	5 min	1

4.6 Elektroforetická separace PCR produktů

PCR produkty byly detekovány pomocí elektroforetické separace na 1,5 % agarosovém gelu v prostředí TAE pufru (0,75 g agarosy a 50 ml TAE pufru). K rozvařenému gelu byly přidány 2 μ l fluorescenčního barviva GoodView (SBS Genetech) a směs byla nalita do elektroforetické vaničky s přidanými hřebínky pro vytvoření jamek. Gel se nechal tuhnout cca 40 minut. Po ztuhnutí byl po rysku nad povrch gelu nalit 1x TAE pufr a hřebínky byly vyjmuty. Do první jamky byl napipetován standard molekulové hmotnosti GeneRuler 100 bp Plus (Fermentas) a bylo nanášeno 5 μ l vzorku s 2 μ l nanášecího pufru (0,1 % bromfenolová modř v 30 % roztoku glycerínu). Elektroforetická komůrka byla připojena ke zdroji stejnosměrného napětí a separace PCR produktů probíhala při 80 V po dobu cca 45 minut. PCR produkty byly vizualizovány pomocí UV transluminátoru za použití programu GeneSnap (Syngene).

4.7 Izolace DNA pomocí DNeasy Plant Mini Kit

Izolace DNA u vybraných rostlin hrachu setého byla provedena pomocí kitu DNeasy Plant Mini Kit dle protokolu uvedeného v DNeasy[®] Plant Handbook. Ke 100 mg listového segmentu bylo přidáno 400 μ l pufru AP1 předeštěného na 65 °C a 4 μ l RNázy A. Směs byla důkladně zvortexována a inkubována po dobu 10 minut při 65 °C. V průběhu inkubace byla zkumavka 3x promíchána. Ihned poté bylo přidáno 130 μ l pufru AP2 a lysát byl inkubován 5 minut na ledě. Vzniklý lysát byl napipetován do QIAshredder kolonky a centrifugován 2 minuty při 14000 otáčkách. Supernatant byl přelit do čisté mikrozukavky, bylo k němu přidáno 1,5 dílu pufru AP3 a směs byla promíchána pomocí pipety. Obsah mikrozukavky byl přenesen opět na DNeasy kolonku, která byla centrifugována 1 minutu při 8000 otáčkách. Kolonka byla umístěna do nové mikrozukavky, bylo přidáno 500 μ l pufru AW, následovala centrifugace 1 minutu při 8000 otáčkách a přefiltrovaná frakce byla odstraněna. Po přidání 500 μ l pufru AW byla kolonka centrifugována 2 minuty při maximálních otáčkách až do vysušení membrány. DNeasy kolonka byla přenesena do 1,5 ml mikrozukavky a bylo na ni napipetováno 100 μ l deionizované vody. Po 5 minutové inkubaci při pokojové teplotě následovala centrifugace při 8000 otáčkách 60 sekund. Kvalita a koncentrace izolované DNA byla stanovena spektrofotometricky (NanoDrop 1000) a byla uchovávána v -70 °C.

4.8 Sekvenování

4.8.1 Izolace PCR produktů z gelu

Před sekvenačním značením bylo nutné PCR produkty přechistit pomocí QIAquick Gel Extraction Kitu (QIAGEN) dle pokynů výrobce. Před samotnou izolací proběhla elektroforetická separace v 1 % agarosovém gelu (0,75 g agarosu, 75 ml TAE pufru a 5 µl ethidium bromidu). Ztuhnutý gel byl zalit 1x TAE puftrem a do jamek byly pipetovány veškeré PCR produkty po smíchání s 5 µl 0,1 % bromfenolové modři v 30 % glycerinu. Elektroforetická separace byla provedena při 80 V po dobu 45 minut. PCR produkty byly vyřezávány pod UV transluminátorem a umístěny do označených 1,5 ml eppendorf zkumavek. K vyříznutým PCR produktům byl přidán QG pufr v poměru 1:3 (w/v) a zkumavky byly inkubovány 10 minut při 50 °C v dry-bloku. Po rozpuštění gelu byl přidán 1 objem isopropanolu a směs byla napipetována na kolonku pro izolaci DNA a centrifugována 1 minutu při 13000 otáčkách. Obsah sběrné zkumavky byl vylit, na kolonku bylo přidáno nejprve 500 µl QG pufru a opět proběhla centrifugace. Bylo přidáno 750 µl PE pufru, po kterém byla kolonka centrifugována při 13 000 otáčkách a následně umístěna do nové 1,5 ml zkumavky. Navázaná DNA byla eluována 30 µl destilované vody. Opět proběhla centrifugace 1 minutu a 13000 otáčkách. Koncentrace izolované DNA byl zjištěn pomocí fluorimetricky a vyizolovaná DNA byla uchována v -20 °C.

4.8.2 Sekvenační značení

Na sekvenační značení byl použit Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit. Reakční směs na 1 reakci obsahovala 1 µl pufru, 1 µl Big Dye, 2 µl naředěného primeru (1,6 pmol) a 6 µl naředěného vzorku DNA. Vzhledem k velikosti PCR produktů, která byla přibližně 1200 bp, byly vzorky naředěny tak, aby obsahovaly v 6 µl 35 ng DNA. Na označení fragmentu byly použity tyto primery ATG-F, intron3-750F, 586gR, intron3-1335R a end-R.

PCR zkumavky s označenými vzorky byly umístěny do termocykléru za podmínek uvedených v Tabulce 13.

Sekvenační analýza byla provedena na Ústavu experimentální botaniky, AV ČR, v Olomouci genetickým analyzátozem ABI PRISM 3730.

Tabulka 13: PCR podmínky pro sekvenační značení

Krok	Teplota	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	96 °C	1 min	1
Denaturace	96 °C	10 s	35
Hybridizace	50 °C	5 s	
Elongace	60 °C	4 min	

4.8.3 Analýza sekvencí

Výstupy z genetického analyzátoru byly sestaveny do výsledných kontigů pomocí programu SeqMan, Lasergene (DNASTAR). Pro další analýzu byl použit program MEGA 6.0. Bylo provedeno mnohočetné přiřazení mnou analyzovaných sekvencí genu *eIF4E* a sekvencí genu, které byly získány z databáze GenBank. Sekvence byly zarovnány do bloku o velikosti 2075 bp a jednotlivé alely *eIF4E* byly detekovány na základě delecí a inzercí v intronu 3.

Pro analýzu byly použity následující sekvence genu *eIF4E* z rostlin linií:

- JI 157/1, JI 157/2, JI 157/6, JI 157/10, JI 157/3, JI 268/11, JI 1260/18, JI 1260/19, JI 1546/1.

Sekvence genů z rostlin, které mi byly poskytnuty od pracovníků Laboratoře molekulární biologie mikroorganismů:

- JI 1546/20, JI 212/1, JI 99/1, JI 99/2, JI 1585/4, JI 289/8, JI 1260/1, JI 157/9.

Pro porovnání delecí a inzercí v intronu 3 byly z databáze GenBank staženy sekvence genu *eIF4E*:

- alela *eIF4E^S* (KF981414.1), alela *eIF4E^A* (KF053449.1), alela *eIF4E^B* (KF053433.1), alela *eIF4E^C* (KF053444.1).

Pro zjištění jednonukleotidových záměn byly analyzované sekvence porovnány se sekvencemi reprezentující jednotlivé varianty genu *eIF4E* dostupnými v databázi GenBank.

Pro zjištění nových variabilních pozic u potenciálně nových alel byly použity sekvence:

- alela *eIF4E^{S1}* (KF981414.1), alela *eIF4E^{S2}* (KF981397.1), *eIF4E^{S3}* (KF981390.1), alela *eIF4E^{S4}* (KF981425.1), alela *eIF4E^{S5}* (KF981421.1), alela *eIF4E^{S6}* (KF981422.1), alela *eIF4E^{S7}* (KF981419.1), alela *eIF4E^{A1}*

(KF053449.1), alela *eIF4E^{A2}* (KF981416.1), alela *eIF4E^{A3}* (KF981393.1), alela *eIF4E^{A4}* (KF981395.1), alela *eIF4E^{A5}* (KF981394.1), alela *eIF4E^{A6}* (KF053455.1), alela *eIF4E^{A7}* (KF053454.1), alela *eIF4E^{B1}* (KF053433.1), alela *eIF4E^{B2}* (KF053433.1), alela *eIF4E^{B3}* (KF053434.1), alela *eIF4E^{C1}* (KF053444.1), alela *eIF4E^{C2}* (KF981433.1).

4.9 Použité chemikálie

Agarosa (Ambresco)

Aktivní uhlí (Fichema)

Bromfenolová modř: 0,1% roztok v 30% glycerínu (Promega)

Deionizovaná voda

Ethidium bromid: 1% roztok ve vodě (Sigma-Aldrich)

Celit (Sigma-Aldrich)

GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas)

GoodView™ Nucleid Acid Stain (SBS Genetech)

Isopropanol (Lach-ner)

NaOH (Lach-ner)

TRIS (Serva)

4.10 Použité kity

BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies)

DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Cat.No. 69106)

QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Cat. No. 28706)

MyTaq™ DNA Polymerase (Bioline, Cat. No. BIO-21106)

4.11 Použité roztoky a jejich složení

PBS pufr (pH 7,4; 1000 ml)

NaCl	8,18 g
KCl	0,15 g
KH ₂ PO ₄	0,27 g
Na ₂ HPO ₄ + 12 H ₂ O	2,86 g

Potahovací pufr (pH 9,6; 1000 ml)

Na ₂ CO ₃	1,59 g
NaHCO ₃	2,94 g

Extrakční pufr (pH 7,4; 1000 ml)

PBS	1000 ml
PVP K-25	20,0 g
Tween 20	0,50 ml
odtučněné sušené mléko	10,0 g

Konjugační pufr (pH 7,4; 1000 ml)

PBS	1000 ml
PVP K-25	20,0 g
Tween 20	0,50 ml
odtučněné sušené mléko	2,0 g

Promývací pufr

1/5 PBS	1000 ml
Tween 20	0,50 ml

Substrátový pufr (pH 9,8; 1000 ml)

diethanolamin	97 ml
---------------	-------

dále upravit pomocí HCl

Fosfátový pufr (pH 8; 250 ml)

Na ₂ HPO ₄ ·12 H ₂ O	0,895 g
KH ₂ PO ₄	0,34 g

5x TAE pufr (pH 8; 1000 ml)

Tris	24,2 g
ledová kyselina octová	5,71 g
0,5 mol/l EDTA	10 ml

dále pak ředěno na 1x TAE pufr

10x TNE (pH 7,4; 1000 ml)

Tris	12,11 g
EDTA	3,72 g
NaCl	116,89 g

doplnit destilovanou vodou

TRIS (pH 7,4; 100 ml)

TRIS	12,1 g
------	--------

doplnit destilovanou vodou

4.12 Použité přístroje

Analytické váhy 440-33 N (Kern)

Centrifuga Biofuge pico (Heraus)

DNA fluorometr Hoefer DyNA Quant 200 (Amersham Biosciences)

Elektroforetická komůrka HU 10 (Scie-Plas)

ELISA reader ELx800 (BioTek)

Homogenizátor FastPrep-24 (MP Biomedicals)

Mikrovlá troubu (DAEWOO)

Minicentrifuga Spectrafuge™ 16M (Labnet)

NanoDrop 1000 Thermo Scientific Spectrofotometer

Laminární box PV-100 (Telstar)

Přístroj na výrobu ledu Icematic F100, Compact Ice flakem (Gemini BV)

Termoblok DRI-BLOCK® DB-20 (Techne)

Termocycler T100 (BIO-RAD)

Termocycler T-Personal (Biometra)

UV Transluminátor Syngene G: Box, dokumentační systém GeneSnap (Herolab)

UV transluminátor UVT-14L (Herolab)

Vortex TTS 2 Yellowline (Maneko)

Zdroj stejnosměrného napětí Power Station 300 (Labnet)

5 Výsledky

V rámci experimentální části bakalářské práce bylo analyzováno 19 linií hrachu, tj. fenotypizace a genotypizace byla provedena u celkem 380 rostlin, téměř kompletní sekvence *eIF4E* genu byla stanovena u 17 rostlin. Byla určena vnímavost/rezistence jednotlivých rostlin testovaných linií hrachu vůči patotypu P-1 (PSbMV117CZ) a patotypu P-2 (L1). U rostlin, které byly infikovány izolátem PSbMV117CZ, byla provedena PCR genotypizace a určena alela *eIF4E* (*sbm-1*). V analyzovaných liniích byly detekovány alely *eIF4E^S*, *eIF4E^A*, *eIF4E^B* a *eIF4E^C*. Alela *eIF4E^S* podmiňuje senzitivitu, alela *eIF4E^A* zajišťuje rezistenci a alely *eIF4E^B* a *eIF4E^C* mohou u rostlin podmiňovat jak rezistenci, tak vnímavost vůči PSbMV

5.1 Fenotypizace a genotypizace jednotlivých linií hrachu

5.1.1 Linie vnímavé vůči patotypu P-1

Všechny rostliny linií JI 99, JI 268, JI 1585, JI 1705, JI 691, JI 1346, JI 1546, JI 2265, JI 3112, JI 252 a JI 1357 byly vnímavé vůči izolátu PSbMV117CZ, který patří k patotypu P-1. Po 14 dnech od inokulace byly na všech rostlinách testovaných linií pozorovány typické příznaky infekce viru semenem přenosné mozaiky hrachu (PSbMV). Jednalo se zejména o chlorotickou mozaiku a svinutí listů. Fenotypizace byla potvrzena DAS-ELISA testem, kterým byla rovněž prokázána ve všech rostlinách přítomnost PSbMV.

U výše uvedených vnímavých linií byly pomocí PCR genotypizace detekovány alely *eIF4E^S*, *eIF4E^B* a *eIF4E^C*. Výsledky genotypizace u všech rostlin odpovídaly fenotypu.

U rostlin v liniích JI 268, JI 1705 (viz Obrázek 3), JI 1585 a JI 252 byly na základě PCR genotypizace pomocí primerů intron3-750F/586gR identifikovány produkty o velikosti 293 bp. Po amplifikaci s primery intron3-750F/intron3-1335R byla velikost produktů 586 bp. Kombinace těchto velikostí odpovídala senzitivní alele *eIF4E^S*.

U rostlin v liniích JI 99 (viz Obrázek 4) byla pomocí primerů intron3-750F/586gR zjištěna velikost produktů 293 bp a s primery intron3-750F/intron3-1335R byly detekovány produkty, které měly velikost 528 bp, což značilo přítomnost senzitivní alely *eIF4E^B*.

U rostlin v liniích JI 691 (viz Obrázek 5), JI 2265 a JI 3112 byly po amplifikaci primery intron3-750F/586gR zjištěny produkty o velikosti 293 bp a pomocí primerů intron3-750F/intron3-1335R byly identifikovány produkty velké 642 bp, což charakterizuje alelu *eIF4E^C*.

V linii JI 1346 byla u většiny rostlin na základě velikostí PCR ampliconů, které byly 293 bp a 528 bp, detekována alela *eIF4E^B*. Ojedinelým případem byla rostlina JI 1346/4, které byla identifikována jako heterozygotní. Po amplifikaci s primery intron3-750F/intron3-1335R byl detekován produkt o velikosti 586 bp a 528 bp, poukazující na přítomnost alel *eIF4E^S* a *eIF4E^B*.

U sedmi rostlin z linie JI 1357 byla podle délek PCR produktů (293 bp a 592 bp) detekována alela *eIF4E^C*. U rostliny JI1357/10 byla dle velikostí ampliconů, které byly 243 bp a 586 bp, zjištěna senzitivní alela *eIF4E^S*. Rostliny JI 1357/3 a JI 1357/4 byly identifikovány jako heterozygotní. Tato rostlina podle velikostí, které byly 642 bp a 586 bp, vykazovala přítomnost alel *eIF4E^S* a *eIF4E^C*.

Podobná situace nastala u rostlin z linie JI 289, kde byla u většiny rostlina dle velikostí PCR ampliconů detekována alela *eIF4E^C* (293 bp a 642 bp) (viz Obrázek 6). Osmá rostlina JI 289/8 byla určena jako heterozygot, byla nositelkou alel *eIF4E^S* a *eIF4E^C*.

U osmi rostlin z linie JI 1543 byla na základě velikostí PCR produktů 293 bp a 528 bp alela *eIF4E^B*. U dvou rostlin JI 1543/2 a JI 1543/10 byla identifikována alela *eIF4E^S* odpovídající podle velikostí PCR produktů, které byly 293 bp a 586 bp.

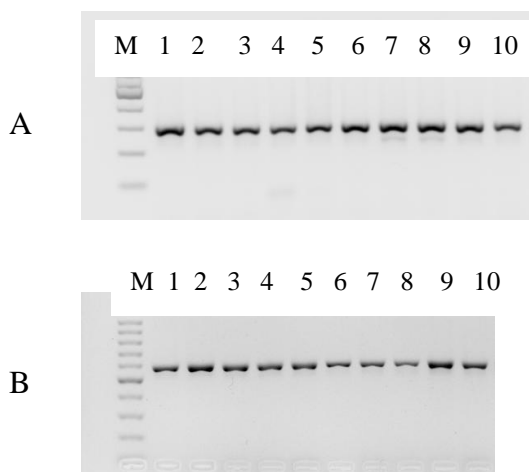
Genotypizace na základě stanovení délky delecí a inzerce v intronu 3 genu *eIF4E* u vybraných rostlin vnímavých vůči *P-1*. Pro sekvenační analýzu *eIF4E* genu byly z uvedených linií vybrány k PSbMV vnímavé rostliny JI 1585/4, JI 268/11, JI 99/1, JI 99/2 a JI 289/8. Získaná sekvence genu *eIF4E* izolovaného z rostliny z JI 1585/4 byla dlouhá 2123 bp, z rostliny JI 268/11: 2133 bp, z rostliny JI 99/1: 2052 bp, z rostliny JI 99/2: 2062 bp a z rostliny JI 289/8: 2171 bp. V jednotlivých sekvencích byly detekovány typické delece a inzerce pro přiřazení k alelám *eIF4E^S*, *eIF4E^B* a *eIF4E^C*.

U sekvencí získaných z JI 1585/4 a JI 268/11 nebyla po mnohočetném přiřazení a zarovnání do bloku (viz Materiál a metody) detekována žádná delece ani inzerce, což odpovídá alele *eIF4E^S*.

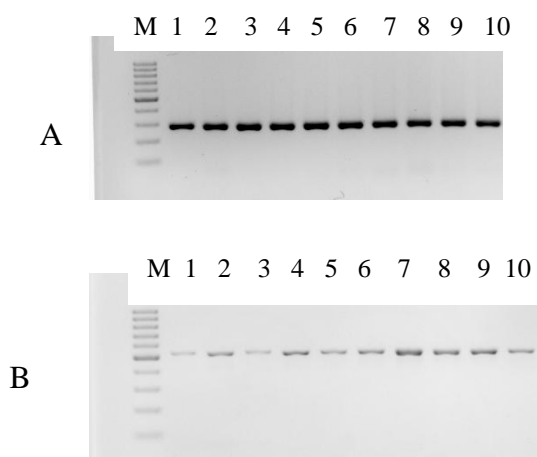
Sekvence získané z rostlin JI 99/1 a JI 99/2 vykazovaly v intronu 3 v pozici 1127 až 1182 delecí dlouhou 56 bp a v pozici 1343 až 1356 delecí 14 bp. Takto dlouhé delece odpovídají alele *eIF4E^B*.

U sekvencí získaných z rostlin JI 289/11 byla zjištěna inserce dlouhá 56 bp v pozici 1186 až 1241, což odpovídá alele *eIF4E^C*.

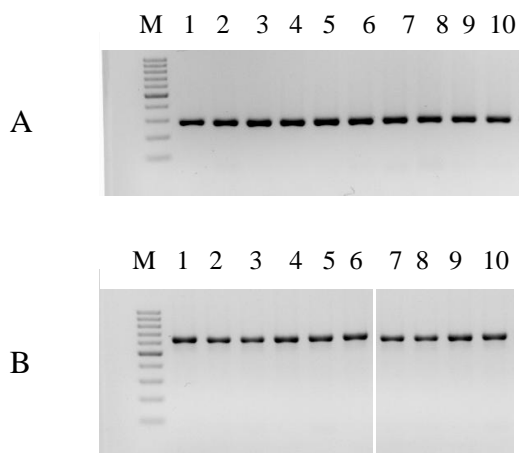
Ve všech uvedených případech analýza sekvencí genu *eIF4E* u vybraných rostlin odpovídala PCR genotypizaci (viz Tabulka 16). Přehled delecí a insercí v intronu 3 je k nahlédnutí v příloze.



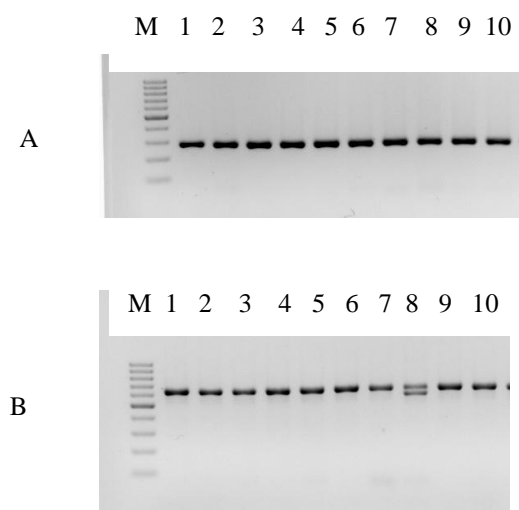
Obrázek 3: Detekce alely *eIF4E^S* u rostlin linie JI 1705 pomocí PCR genotypizace
A: PCR produkty intron3-750F/586gR o velikosti 293 bp; B: PCR produkty intron3-750R/intron3-1335R o velikosti 586 bp; M: GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder; 1-10: JI1705/1-10.



Obrázek 4: Detekce alely *eIF4E^B* u rostlin linie JI 99 pomocí PCR genotypizace
A: PCR produkty intron3-750F/586gR o velikosti 293 bp; B: PCR produkty intron3-750R/intron3-1335R o velikosti 528 bp; M: GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder; 1-10: JI 99/1-10.



Obrázek 5: Detekce alely *eIF4E^C* u rostlin linie JI 261 pomocí PCR genotypizace
 A: PCR produkty intron3-750F/586gR o velikosti 293 bp; B: PCR produkty intron3-750R/intron3-1335R o velikosti 642 bp; M: GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder; 1-10: JI 261/1-10.



Obrázek 6: Detekce heterozygotní rostliny v linii JI 289
 A: PCR produkty intron3-750F/586gR o velikosti 293 bp; B: PCR produkty intron3-750R/intron3-1335R o velikosti 586 bp; M: GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder; 1-10: JI 289/1-10; 8: heterozygotní rostlina JI 289/8 (528 bp, 642 bp).

5.1.2 Linie rezistentní vůči patotypu P-1

U rostlin v liniích JI 212, JI 1260, JI 1546, JI 697 a JI 186 nebyly přítomny žádné příznaky infekce PSbMV. Fenotypizace byla potvrzena DAS-ELISA testem, tj. ani jedna z testovaných rostlin nebyla pozitivní na přítomnost PSbMV.

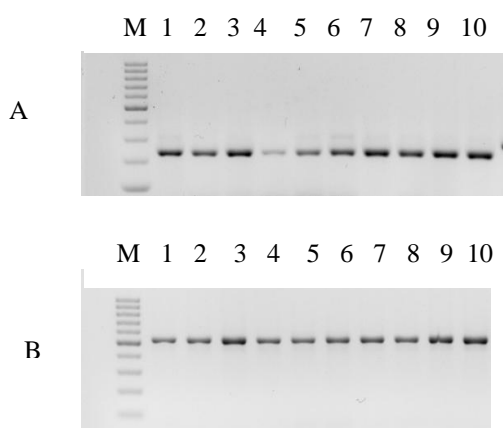
U těchto rostlin byly na základě PCR genotypizace identifikovány alely *eIF4E^A*, *eIF4E^B*, *eIF4E^C* podmiňující rezistenci.

U rostlin v liniích JI 212, JI 1260 (viz Obrázek 6) a JI 1546 byly po PCR amplifikaci s primery intron3-750F/586gR identifikovány produkty o velikosti 243 bp a pomocí primerů intron3-750F/intron3-1335R byly detekovány produkty velké 536 bp. Na základě těchto velikostí bylo určeno, že se jedná o alelu *eIF4E^A*, tedy alelu rezistentní.

U rostlin v linii JI 697 byla dle velikostí ampliconů, které byly 293 bp a 642 bp, detekována alela *eIF4E^C*.

U linie JI 186 byla detekována alela *eIF4E^S*. Velikosti produktů byly po amplifikaci primery intron3-750/586gR a elektroforetické separaci 293 bp a po amplifikaci primery intron3-750/intron3-1335 pak 586 bp. Určená alela nesouhlasí s fenotypem rostliny.

Genotypizace na základě stanovení délky delecí a inzercí v intronu 3 genu *eIF4E* u vybraných rostlin rezistentních vůči *P-1*. Pro sekvenační analýzu bylo vybráno 6 rostlin, a to JI 1260/1, JI 1260/18, JI 1260/19, JI 1546/1, JI 1546/20 a JI 212/1, ze kterých byl vyizolován a osekvenován gen *eIF4E*. Z rostliny JI 1260/1 byla získána sekvence dlouhá 2073 bp, z rostliny JI 1260/18: 2067 bp, z rostliny JI 1260/19: 2081 bp, z rostliny JI 1546/1: 2085 bp, z rostliny JI 1546/20: 2080 bp a z rostliny JI 212/2: 2083 bp. Sekvence genu získané z výše uvedených rostlin nesly delecí, dlouhou 50 pb v pozici 818 až 867, typickou alelu *eIF4E^A* (viz Příloha). Tento výsledek potvrdil výskyt alely *eIF4E^A* zjištěný PCR genotypizací (viz Tabulka 16).



Obrázek 6: Detekce alely *eIF4E^A* u rostlin linie JI 1260 pomocí PCR genotypizace
A: PCR produkty intron3-750F/586gR o velikosti 243 bp; B: PCR produkty intron3-750R/intron3-1335R o velikosti 536 bp; M: GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder; 1-10: JI 1260/1-10.

5.1.4 Linie kompletně vnímavé vůči patotypu P-2

U následujících linií JI 99, JI 268, JI 289, JI 1705, JI 1585, JI 157, JI 691, JI 1346, JI 1543, JI 2265, JI 3112, JI 252 a JI 1357 byla na základě kontroly fenotypu po 14 dnech od mechanické inokulace zjištěna infekce semenem přenosné mozaiky viru. Listy u hrachu byly svinuté a vyskytovala se na nich typická mozaika. Vnímavost rostlin hrachu byla potvrzena DAS-ELISA testem.

5.1.5 Linie kompletně rezistentní vůči patotypu P-2

Rostliny z linií JI 212, JI 1260, JI 1546, JI 290 a JI 697 se po 14 dnech od inokulace jeví jako bezpříznakové vůči infekci PSbMV patotypu P-2. Fenotypový projev byl potvrzen i DAS-ELISA testem.

5.1.6 Linie s vnímavými i rezistentními rostlinami vůči patotypu P-2

V linii JI 186 se dle fenotypu objevovaly rostliny, které byly vnímavé i rezistentní vůči patotypu P-2. Na základě DAS-ELISA testu bylo v linii JI 186 5 rostlin rezistentních a 5 rostlin vnímavých vůči izolátu L1.

Tabulka 15: Fenotypizace a genotypizace 19 linií hrachu *P. sativum*

Linie	Rostliny inokulované izolátem PSbMV117CZ Patotyp P-1			Rostliny inokulované izolátem L1 Patotyp P-2	
	Σ	Genotypizace	Fenotypizace	Σ	Fenotypizace
JI 99	10	10 B	10 S	10	10 S
JI 212	10	10 A	10 R	10	10 R
JI 268	10	10 S	10 S	10	10 S
JI 289	10	7 C, 1 H, 2 C	10 S	10	10 S
JI 1705	10	20 S	10 S	10	10 S
JI 1585	10	10 S	10 S	10	10 S
JI 157	8	8 S	1 R, 7 S	8	8 S
JI 1260	10	10 A	10 R	10	10 R
JI 1546	10	10 A	10 R	10	10 R
JI 290	10	10 C	2 R, 2 S, 6 R	10	10 R
JI 691	10	10 C	10 S	10	10 S
JI 1346	10	4 B, 1H, 5 B	10 S	10	10 S
JI 1543	10	1 B, 1 S, 7 B, 1 S	10 S	10	10 S
JI 2265	10	10 C	10 S	10	10 S
JI 3112	10	10 C	10 S	10	10 S
JI 252	10	10 S	10 S	10	10 S
JI 697	10	10 C	10 R	10	10 R
JI 1357	10	2 C, 2 H, 5 C, 1S	10 S	10	10 S
JI 186	10	10 S	10 R	10	5 S, 5 R

Legenda: A-rezistentní alela *eIF4E^A*, B-alela *eIF4E^B*, C-alela *eIF4E^C*, S-senzitivní alela *eIF4E^S*, H- heterozygot, R-rezistentní fenotyp, S-senzitivní fenotyp.

Tabulka 16: Srovnání fenotypu a genotypu zjištěného pomocí markerů a pomocí sekvenační analýzy

Linie	Genotypizace	Fenotypizace	Alela zjištěná sekvenováním	Rozdíly v intronu 3
JI 157/1	<i>eIF4E^S</i>	+	Potenciálně nová alela	Žádná inzerce ani delece
JI 157/2	<i>eIF4E^S</i>	-	Potenciálně nová alela	
JI 157/3	<i>eIF4E^S</i>	-	Potenciálně nová alela	
JI 157/6	<i>eIF4E^S</i>	-	Potenciálně nová alela	
JI 157/9	<i>eIF4E^S</i>	-	Potenciálně nová alela	
JI 157/10	<i>eIF4E^S</i>	-	Potenciálně nová alela	
JI 1585/4	<i>eIF4E^S</i>	+	<i>eIF4E^S</i>	
JI 268/11	<i>eIF4E^S</i>	+	<i>eIF4E^S</i>	50 bp delece
JI 1260/1	<i>eIF4E^A</i>	-	<i>eIF4E^A</i>	
JI 1260/18	<i>eIF4E^A</i>	-	<i>eIF4E^A</i>	
JI 1260/19	<i>eIF4E^A</i>	-	<i>eIF4E^A</i>	
JI 1546/1	<i>eIF4E^A</i>	-	<i>eIF4E^A</i>	
JI 1546/20	<i>eIF4E^A</i>	-	<i>eIF4E^A</i>	
JI 212/1	<i>eIF4E^A</i>	-	<i>eIF4E^A</i>	
JI 99/1	<i>eIF4E^B</i>	-	<i>eIF4E^B</i>	56 bp + 14 bp delece
JI 99/2	<i>eIF4E^B</i>	+	<i>eIF4E^B</i>	
JI 289/8	<i>eIF4E^C</i>	+	<i>eIF4E^C</i>	56 bp inzerce

6 Diskuze

Virus semenem přenosné mozaiky hrachu (PSbMV) obsahuje genetickou informaci ve formě +ssRNA, na jejíž 5' konci je kovalentní vazbou připojen VPg protein. Tento protein v případě translace virové RNA interaguje s eukaryotním iniciačním translačním faktorem (eIF4E). Poté, co se utvoří specifická vazba mezi VPg proteinem a eIF4E, je zahájen reprodukční cyklus viru. U genu, který kóduje eIF4E u vnímavých rostlin hrachu a umožňuje pomnožení viru, nebyly detekovány v intronu 3 žádné delece a inserce. Délka intronu 3 je 1201 bp. Zatímco intron 3 u rezistentních rostlin hrachu vykazoval délku 1151 bp. Rezistentní rostliny obsahovaly 50 bp delecí. Na základě různých délek intronu 3 byly dle Smýkala a kol. (2010) vyvinuty primery sloužící jako markery, které napomáhají rozlišení rezistentních a senzitivních genotypů rostlin a tímto způsobem je možné urychlit šlechtitelský proces. Smýkal a kol. (2010) uvádí 100 % spolehlivost těchto markerů. Jedná se o primery intron3-750F/586gR a intron3-750F/intron3-1335R, které jsou založené na amplifikaci v intronu 3. Tyto markery použila i Konečná a kol. (2014), která navázala na Smýkala a kol. (2010). Konečná a kol. (2014) ale nově identifikovanými alelami 100 % spolehlivost těchto markerů vyvrátila. Mimo rezistentní a senzitivní alely byly dále popsány alely *eIF4E^B* a *eIF4E^C*. Tyto alely mohou podmiňovat rezistenci i senzitivitu vůči PSbMV, ale nebylo u nich zjištěno, ve kterém případě se projevují jako rezistentní a ve kterém jako senzitivní. Alely *eIF4E^B* a *eIF4E^C* po amplifikaci primery intron3-750F/intron3-1335R vykazovaly jinou velikost PCR produktů ve srovnání alelami *eIF4E^A* a *eIF4E^S*. Po sekvenční analýze bylo zjištěno, že alela *eIF4E^B* obsahuje v intronu 3 dvě delece dlouhé 56 bp a 14 bp a alela *eIF4E^C* inserci dlouhou 56 bp. Pro detekci alel v mnou analyzovaných liniích jsem použila primery intron3-750F/586gR a intron3-750F/intron3-1335R, které využili Smýkal a kol. (2010) i Konečná a kol. (2014). Výsledky prezentované v této práci jsou ve shodě s výsledky uváděné Konečnou a kol. (2014), která detekovala všechny tyto čtyři alely *eIF4E^A*, *eIF4E^B*, *eIF4E^C* i *eIF4E^S* právě na základě různých délek intronu 3. Z 19 analyzovaných linií v této práci byla u 3 linií identifikována rezistenci podmiňující alela *eIF4E^A*, u 5 linií senzitivní alela *eIF4E^S* a u 6 linií byla zjištěna alela *eIF4E^C*, z toho 3 linie byly vnímavé a 3 linie rezistentní vůči PSbMV. V jedné linii byla také detekována alela *eIF4E^B*, v tomto případě byla linie vnímavá.

Ne všechny linie poskytnuté genovou bankou však byly ve znaku vnímavosti nebo rezistence vůči PSbMV homogenní. U 2 linií byly mimo standardních alel zjištěny heterozygotní rostliny ($eIF4E^{B/S}$, $eIF4E^{A/S}$). Smýkal a kol. (2010) uvádějí u 126 testovaných rostlin 27 heterozygotních, kdy semena analyzovaných rostlin pocházela jednak z genových bank, ale také ze šlechtitelských programů prováděné firmou Agritec v Šumperku. Právě v těchto šlechtitelských programech se heterozygotní rostliny vyskytují poměrně často. Smýkal vždy uvádí heterozygotní položku, u které se vyskytovaly alela $eIF4E^{S/A}$. Konečná a kol. (2014) se ve své práci zaměřuje zejména na geografické rozšíření jednotlivých alel, a pravděpodobně proto ve výsledcích heterozygotní rostliny nezmiňuje.

U jedné byl zjištěn výskyt dvou alel v jedné linii ($eIF4E^S$ a $eIF4E^C$). To může být zapříčiněno tím, že na rezistenci podmíněnou recesivními geny nejsou v genové bance rostliny testovány, proto je možné, že v jedné linii se nachází semena téhož kultivaru, ale nesoucí různé alely $eIF4E$. Při vyšetí bylo možné si všimnout, že semena z jedné linie se od sebe lišila barvou, což by mohlo tuto hypotézu potvrdit. Smýkal a kol. (2010) ani Konečná a kol. (2014) výskyt dvou alel v rámci jedné linie neuvádějí. U linie JI 1357, která byla fenotypově vnímavá, byly identifikovány jak 2 heterozygotní rostliny ($eIF4E^{S/C}$), tak výskyt alel $eIF4E^S$ a $eIF4E^C$. Z výše uvedených skutečností opět vyplývá, že položky z genové banky, co se týče rezistence vůči PSbMV, nejsou homogenní.

U většiny rostlin se genotyp i fenotyp shodoval, ovšem v linii JI 186 byla alela zjištěná pomocí PCR genotypizace a výsledek fenotypu v rozporu. Jednalo se o rostliny v linii JI 186, které přestože byly nositelkami alely $eIF4E^S$, nebyly senzitivní k PSbMV. Rozdíly, jak uvádí Smýkal a kolektiv (2010), mohly být způsobeny například chybnou inokulací a nebo dále uvádí zhruba jen 75 % spolehlivost DAS-ELISA testu. Pokud se ale tento nesoulad objevuje u většiny rostlin v linii, je možné, že se jedná o novou alelu genu $eIF4E$.

Mimo různé délky intronu 3 se v genu $eIF4E$ vyskytují také jednonukleotidové polymorfismy (SNP). Konečná a kol. (2014) identifikovali v celém genu $eIF4E$ u hrachu celkem 156 SNP. Na základě zjištěných 156 SNP Konečná a kol. (2014) dále popsala 7 variant alely $eIF4E^S$, rovněž 7 variant alely $eIF4E^A$, 3 varianty alely $eIF4E^B$ a 2 varianty alely $eIF4E^C$. V analyzované linii JI 157 nesoucí senzitivní alelu $eIF4E^S$ bylo neočekávaně sedm z osmi testovaných rostlin rezistentních. Fenotyp (rezistentní) tedy v sedmi případech (JI 157/2-8) nebyl v souladu s genotypem (senzitivní), u rostliny

Jl 157/1 v souladu byl. Při detailní analýze získaných sekvencí *eIF4E* genu rostlin Jl 157/1, Jl 157/3, Jl 157/6, Jl 157/9 a Jl 157/10 nebyla zjištěna žádná delece ani inserce ve srovnání se vzorovými alelami *eIF4E^A*, *eIF4E^B* a *eIF4E^C*, což je charakteristické pro alelu *eIF4E^S*. U všech výše uvedených sekvencí byl ale navíc zjištěn jednonukleotidový polymorfismus v pozici 197 vůči standardní alele *eIF4E^S*, a to bez ohledu na to, zda byla rostlina dle fenotypu rezistentní nebo senzitivní. Tento detekovaný SNP Konečná a kol. (2014) nepopisují. Po překladu do aminokyselinové sekvence byla na základě tohoto SNP detekována jako 66. aminokyselina arginin namísto prolinu. Tuto aminokyselinovou substituci Konečná a kol. (2014) také neuvádějí. V našem případě by se mohlo jednat o novou alelu *eIF4E^S*. Konečná a kol. (2014) uvádí, že všech 7 variant *eIF4E^S* podmiňuje senzitivitu hrachu vůči PSbMV, ale v námi analyzované linii Jl 157 daná alela pouze v jednom z osmi případů zajišťovala senzitivitu a v sedmi dalších případech pak rezistenci hrachu vůči PSbMV. To, že některé alely mohou podmiňovat rezistenci i senzitivitu může být zdůvodněno tím, že *eIF4E* nemusí být jediný gen, který interaguje s VPg proteinem u potyvirů. Vysvětlení přináší například Michon a kol. (2006), který zmiňuje mimojiné fakt, že VPg protein u *Lettuce mosaic virus* (LMV) může interagovat místo eIF4E s faktorem eIF4G, který je schopný zajistit zahájení translace virové RNA, rovněž jako eIF4E. To stejné uvádí i Nicaise a kol. (2007), který se zaměřil na interakci eIF4G a potyvirů u *Arabidopsis thaliana*.

Jestli právě změna argininu za prolin hraje roli v interakci mezi eIF4E a VPg proteinem u PSbMV by se dalo studovat pomocí kvasinkového dvouhybridního systému. Tato metoda byla například použita Wittmanem a kol. (1997) pro studium interakce mezi VPg proteinem u TuMV a eIF4E, dále tuto metodu použil Kang a kol. (2005) pro popis interakce eIF4E u papriky a VPg proteinu u *Tobacco etch virus* (TEV). Táborská (2014) pro studium eIF4E u hrachu a VPg proteinu u PSbMV taktéž použila kvasinkový dvouhybridní systém. Při testování rezistentních linií hrachu VPg proteinem k interakci dle očekávání nedošlo. K té ovšem nedošlo ani při užití vnímavých linií hrachu. Chyba, jak uvádí Táborská (2014), mohla být způsobena například nízkou expresí fúzních proteinů v kvasinkách. Pokud bychom chtěli dále studovat vzájemnou interakci těchto dvou proteinů, jeví se metoda dvouhybridního systému jako dostatečná a cenově přijatelná. Bylo by vhodné studovat i úlohu faktoru eIF4G v interakci s PSbMV, ale sekvence genu *eIF4G* nebyla u hrachu dosud zveřejněna, proto by bylo možné vycházet ze sekvence genu *eIF4G* u *Lathyrus sativus* (GBSS01005016), která je dostupná v databázi GenBank.

Kvasinkový dvouhybridní systém využil i Yeam a kol. (2011), který se zaměřil na studium eIF4E u papriky a VPg proteinu u *Tobacco etch virus* (TEV). U rezistentních a vnímavých rostlin papriky byly již dříve u eIF4E zjištěny zaměny 51., 66., 67., 68., 73., 74., 79., 107., 109. aminokyseliny. Yeam a kol. (2007) se snažili identifikovat, která z těchto aminokyselinových substitucí má klíčovou roli v potlačení interakce mezi VPg proteinem a eIF4E. Vytvořili konstrukty, které obsahovaly vždy jen jednu z těchto mutací a zjistili, že klíčová je záměna 107. aminokyseliny, kdy je glycin nahrazen argininem. Právě tato změna neumožnila interakci mezi VPg proteinu u TEV a eIF4E u papriky. Ostatní aminokyselinové substituce na interakci neměly vliv.

Substituce 107. aminokyseliny byla zjištěna u více rostlin, například u salátu, rajčete nebo i hrachu. Yeam a kol. (2011) se domnívají, že by tato záměna mohla mít také klíčovou roli v navození rezistence vůči potyvírům u výše uvedených rostlin. Která z aminokyselinových substitucí je klíčová v potlačení iniciace translace virové RNA u potyvírů je u hrachu stále nejasné.

7 Závěr

V teoretické části bakalářské práce byla vypracována rešerše zaměřená na geny zprostředkující rezistenci vůči virům se zaměřením na gen *eIF4E* u hrachu setého, jeho variabilitu, proteinovou strukturu a úlohu při navození rezistence.

V praktické části bylo analyzováno 19 linií kulturních a primitivních kultivarů hrachu. Byla zjišťována rezistence těchto linií vůči PSbMV patotypům P-1 a P-2 na základě (ne)úspěšnosti inokulace a výsledků DAS-ELISA testu. Na základě PCR genotypizace byly identifikovány a charakterizovány přítomné alely *eIF4E*, genu odpovědného za rezistenci hrachu vůči PSbMV.

Vůči oběma patotypům P1 a P2 byly vnímavé rostliny z linií JI 99, JI 268, JI 289, JI 1705, JI 1585, JI 1357, JI 961, JI 1346, JI 252, JI 3112, JI 2265, JI 1543. Rezistentní k oběma patotypům byly rostliny z linií JI 212, JI 1260, JI 1546, JI 697. Linie JI 186 byla rezistentní pouze vůči patotypu P-1, rostliny z linie JI 290 byly naopak rezistentní vůči patotypu P-2.

U rostlin z linie JI 157 byla většina rostlin rezistentních vůči patotypu P-1 a u většiny rostlin se fenotyp neshodoval s předpokládanou alelou *eIF4E^S*, která byla určena na základě PCR genotypizace. Pomocí sekvenační analýzy byla u všech rostlin linie JI 157 identifikována potenciálně nová alela obsahující jednonukleotidový polymorfismus ve 197. pozici, kde byl cytosin zaměněn za guanin. Po překladačném do sekvence aminokyselin byl na základě této záměny nahrazen arginin prolinem. Mechanismus působení této alely však nebyl dosud objasněn.

8 Seznam použité literatury

- AITKEN, C.E., LORSCH, J.R. (2012): The mechanistic overview of translation initiation in eukaryotes. *Nature Structural and Molecular Biology*, 19(6):568-576.
- ALCONERO, R., PROVVIDENTI, R., GONSALVES, D. (1986): Three *Pea Seed-borne Mosaic Virus* Pathotypes from Pea and Lentil Germ Plasm. *Plant Disease*, 70: 783-786.
- ASHBY, J.A., STEVENSON, C.E.M., JARVIS, G.E., LAWSON, D.M., MAULE, A.J. (2011): Structure-based mutational analysis of eIF4E in relation to sbm1 resistance to *Pea seed-borne mosaic virus* in pea. *PloS One*, 6(1): e15873.
- BOKROS, C.L., HUGDAHL, J.D., KIM, H.H., HANESWORTH, V.R., VAN HEERDEN, A., BROWNING, K.S., MOREJOHN, L.C. (1995): Function of the p86 subunits of eukaryotic initiation factor (iso)4F as a microtubule-associated protein in plant cells. *Proceeding of the National Academy of the Sciences of the United States of America*, 92: 7120-7124.
- BORGSTROM, B., JOHANSEN, I.E. (2001): Mutations in *Pea Seed-borne Mosaic Virus* Genome-Linked Protein VPg Alter Pathotype-Specific Virulence in *Pisum sativum*. *The American Phytopathological Society*, 6: 707-714.
- BROWNING, K.S. (1996): The Plant Translation Apparatus, *Plant Molecular Biology*, 32: 107-144.
- BROWNING, K.S. (2004): Plant translation initiation factors: it is not easy to be green. *Biochemical Society Transactions*, 32:589-591.
- CARANTA, C., PALLOIX, A., GEBRE-SELASSIE, G., LEFEBVRE, V., MOURY, B., DAUBEZE, A.M. (1996): A complementation of two genes originating from susceptible *Capsicum annuum* line confers a new and complete resistance to pepper veinal mottle virus. *Phytopathology*, 86:739-743
- CARANTA, C., ROBAGLIA, C. (2006): Translation initiation factors: a weak link in plant RNA virus infection. *Trends in Plant Science*, 11: 40-45..
- CAVATORTA, J.R., SAVAGE, A. E., YEAM, I., GRAY, S.M., JAHN, M.M. (2008): Postitive Darwinian selection at single amino acid sites conferring plant virus resistance. *Journal of Evolutionary Biology*, 67: 551-559.
- COOPER, J.I, JONES, A.T. (1983): Responses of plants to viruses: Proposal for the use of terms. *Phytopathology*, 73:127-128.

- DANGL, J.L., JONES, J.D.G. (2001): Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*, 411: 826-833.
- DIAZ-PENDON, J.A., TRUNIGER, V., NIETO, C., GARCIA-MAS, J., BENDAHMANE, A., ARANDA, M.A. (2004): Advances in understanding recessive resistance to plant viruses. *Molecular Plant Pathology*, 5: 223-233.
- DELLEDONNE, M., XIA, Y., DIXON, R.A., LAMB, C. (1998): Nitric oxide function as a signal in plant disease resistance. *Nature*, 394: 585-588.
- DE RONDE, D., BUTTERBACH, P., KORMELINK, R. (2014): Dominant resistance against viruses. *Frontiers in Plant Science*, 5(307): doi: 10.3389/fpls.2014.00307.
- FRASER, R.S.S. (1985): Genetics of Host Resistance to Viruses of Virulence. In: FRASER, R.S.S. (ed). *Mechanisms of Resistance to Plant Diseases*. Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publishers, Dordrecht, 62-79.
- FRASER, R.S.S. (1990): The genetics of resistance to plant viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 28:179–200.
- GAO, Z., JOHANSEN, I.E., EYERS, S., THOMAS, C.L., NOEL ELLIS, T.H., ANDREW, J.M. (2004a): The potyvirus recessive resistance gene, *sbm-1*, identifies a novel role for translation initiation factor eIF4E in cell-to-cell trafficking. *Plant Journal*, 40: 376-385.
- GAO, Z., EYERS, S., THOMAS, C., ELLIS, N., MAULE, A. (2004b): Identification of markers tightly linked to *sbm* recessive genes for resistance to Pea Seed-borne mosaic virus. *Theoretical and Applied Genetics*, 109: 488-494.
- GURURANI, M.A., VENKATESCH, J., UPADHYAYA, C.P., NOOKARAJU, A., PANDEY, S.K., PARK, S.W. (2012): Plant disease resistance genes: Current status and future directions. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 78: 51-65.
- GRANT, J.J., LOAKE, G.J. (2000): Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signalling in disease resistance. *Plant Physiology*, 124: 21-29.
- HAMMOND-KOSACK, K.E., PARKER, J.E. (2003): Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. *Current Opinion in Biotechnology*, 14: 177-193.
- HEATH, M.C. (2000): Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Current Opinion in Plant Biology*, 3: 315-319.

- HJULSAGER, C.K., LUND, O.S., JOHANSEN, I.E. (2002): A New Pathotype of Pea Seed borne Mosaic Virus Explained by Properties of the P3-6k1 and Viral Genome-Linked Protein (VpG)- Coding Regions. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 15: 169-171.
- HJULSAGER, C.K., OLSEN, B.S., JENSEN, D.M.K., CORDEA, M.I., KRATH, B.N., JOHANSEN, I.E., LUND, O.S. (2006): Multiple determinants in the coding region of Pea Seed-borne Mosaic Virus P3 are involved in virulence against sbm-2 resistance. *Virology*, 355: 52-61.
- CHARRON, C., NICOLAI, M. GALLOIS, J.L., ROBAGLIA, C., MOURY, B., PALLOIS, A., CARANTA, C. (2008): Natural variation and functional analyses provide evidence for co-evolution between plant eIF4E and potyviral VPg protein. *Plant Journal*, 54: 56-58.
- JIANG, J., LALIBERTÉ, J.F. (2011): The genome-linked protein VPg of plant viruses- a protein with many partners. *Current Opinion in Virology*, 5: 347-354.
- JOHANSEN, I.E., KELLER, K.E., DOUGHERTY, W.G., HAMPTON, R.O. (1996): Biological and molecular properties of pathotype P-1 and a pathotype P-4 isolate of *Pea Seed-borne Mosaic Virus*. *Journal of general Virology*, 77: 1329-1333.
- JOHANSEN, I.E., LUND, O.S., HJULSAGER, C.K., LAURSEN, J. (2001): Recessive Resistance in *Pisum sativum* and Potyvirus Pathotype Resolved in Gene-for-Cistron Correspondence between Host and Virus. *Journal of Virology*, 14: 6609-6614.
- JULIO, E., COTUCHEAU, J., DECORPS, C., VOLPATTI, R., SENTENAC, C., CANDRESSE, T., DORLHAC DE BORNE, F. (2015): A eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) is responsible for the va Tobacco recessive resistance to Potyviruses. *Plant Molecular Biology Reporter*, 33: 609-623.
- KANG, B.C., YEAM, I. FRANTZ, J.D., MURPHY, J.F., JAHN, M.M. (2005): The *pvr1* locus in *Capsicum* encodes a translation initiation factor eIF4E that interacts with *Tobacco etch virus* VPg. *Plant Journal*, 42: 392-405.
- KEEN, N.T. (1990): Gene-for-gene komplementarity in Plant-Patgogen interactions. *Annual reviews in Genetics*, 24: 447-463.
- KELLER, K.E., JOHANSEN, E.I, MARTIN, R. R., HAMPTON, R.O. (1998): Potyvirus Genome-Linked Protein (VPg) Determines *Pea Seed-borne Mosaic*

Virus Pathotype- Specific Virulence in Pisum Sativum. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 11: 124-130.

- KONEČNÁ, E., ŠAFÁŘOVÁ, D., NAVRÁTIL, M., HANÁČEK, P., COYNE, C., FLAVELL, A., VISHNYAKOVA, M., AMBROSE, M., REDDEN, R., SMÝKAL, P. (2014): Geographical Gradient of *eIF4E* Alleles Conferring Resistance to Potyviruses in Pea (*Pisum*) Germplasm. *PLoS ONE*, 9(3): e090394.
- LECOQ, H., MOURY, B., DESBIEZ, C., PALLOIX, A., PITRAT, M. (2004): Durable viral resistance in plants through conventional approaches a challenge. *Virus Research*, 100: 31-39.
- LELLIS, A.D., CARRINGTON, J.C., KASSCHAU, K.D., WHITHAM, S.A. (2002): Loss-of-susceptibility mutants of *Arabidopsis thaliana* reveal an essential role for eIF4E during potyvirus infection. *Current Biology*, 12: 1046-1051.
- MAULE, J.A., CARANTA, C., BOULTON, M.I. (2007): Sources of natural resistance to plant viruses: status and prospects. *Molecular Plant Pathology*, 8: 223-231.
- MARTIN, G.B., BOGDANOVA, A.J., SESSA, G. (2003): Understanding the fiction of plant disease resistance proteins. *Annual Reviews of Plant Biology*, 54: 23-61.
- MICHON, T., ESTEVEZ, Y., WALTER, J., GERMAN-RENATA, S., LE GALL, O. (2006): The potyviral virus genome-linked protein VPg forms a ternary complex with the eukaryotic initiation factors eIF4E and eIF4G and reduces eIF4E affinity for a mRNA cap analogue. *FEBS Journal* 273: 1312-1322.
- MOURY, B., MOREL, C., JOHANSEN, I.E., GUILBAUD, L., SOUCHE, S., AYME, V., CARANTA, C., PALLOIX A., JACQUEMOND, M. (2004): Mutations in Potato virus Y genome-linked protein determine virulence toward recessive resistance in *Capsicum Annuum* and *Lycopersicon hirsutum*. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 17: 322-329.
- MURPHY, J., RYCHLIK, W., RHOADS, R., HUNT, A., SHAW, J. (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.
- NICAISE, V., GERMAN-RENATA, S., SANJUAN, R., DUBRANA, M.P., MAZIER, M., MAISONNEUVE, B., CANDRESSE, T., CARANTA, C., LEGALL, O. (2003): The eukaryotic translation initiation factor 4E controls lettuce

- susceptibility to the Potyvirus *Lettuce mosaic virus*. *Plant Physiology*, 132: 1272-1282.
- NICAISE, V., GALLOIS, J.L., CHAFIAI, G., ALLEN, L.M., SCHURDI-LEVRAUD, V., BROWNING, K.S., CANDRESSE, T., CARANTA, C., LE GALL, O. GERMAN-RENATA, S. (2007): Coordinated and selective recruitment of eIF4E and eIF4G factors for potyvirus infection in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters*, 581: 1041-1046.
- OLSEN, B.S., JOHANSEN, I.E. (2001): Nucleotide sequence and infectious cDNA clone of the L1 isolate of *Pea seed-borne mosaic potyvirus*. *Archives of Virology*, 146: 15-25.
- PONTIER, D., BALAGUE, C., ROBY, D. (1988): The hypersensitive response. A programmed cell death associated with plant resistance. *Molecular Biology and Genetics*, 321: 721-734.
- PESTOVA, T.V., HELLEN, C. U.T., SHATSKY, I.N. (1996): Canonical Eukaryotic Initiation Factors Determine Initiation of Translation by Internal Ribosomal Entry, 16: 6859-6869.
- PROVVIDENTI, R., ALCONERO, R. (1988a): Inheritance of resistance to the linetil strain of pea seed borne mosaic virus in *Pisum sativum*. *Journal of Heredity*, 79: 45-47.
- PROVVIDENTI, R., ALCONERO, R. (1988b): Inheritance of resistance to a third pathotype of Pea Seed-borne mosaic virus in *Pisum Sativum*. *Journal of Heredity*, 79: 76-77.
- PROVVIDENTI, R., ALCONERO, R. (1988c): Sources of resistance to pathotypes of pea-seed borne mosaic virus in the U.S. plant introductions of *Pisum sativum*. *Pisum Nswl*, 20:30-31.
- PROVVIDENTI, R., HAMPTON, R.O. (1991): Chromosomal distribution of genes for resistance to seven potyviruses in *Pisum sativum*. *Pisum Genetics*, 23: 26-28.
- RODRIGUES, S.P., LINDSEY, G.G., FERNANDES, P.M.B. (2009): Biotechnological Approaches for Plants Viruses Resistance: From General to the Modern RNA Silencing Pathway. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52: 795-808.
- SCHWARTZ, D.C., PARKER, R. (2000): mRNA decapping in yeast requires dissociation of the cap binding protein, eukaryotic translation initiation factor 4E. *Molecular and Cellular Biology*, 20: 7933-7942.

- SMÝKAL, P., ŠAFÁŘOVÁ, D., NAVRÁTIL, M., DOSTÁLOVÁ, R. (2010): Marked assisted pea breeding: eIF4E allele specific markers to Pea Seed-borne Mosaic virus (PSbMV) resistance. *Molecular Breeding*, 26: 425-438.
- SOOSAAR, J.L, BURCH-SMITH, T.M, DINESH, S.P. (2005): Mechanisms of plant resistance to viruses. *Nature Reviews Microbiology*, 3: 789-798.
- TÁBORSKÁ, N. (2014): Protein-protein interakce v průběhu virové patogeneze rostlin. Diplomová práce, Olomouc, Univerzita Palackého v Olomouci.
- THORDAL-CHRISTENSEN, H. (2003): Fresh insight into processes of nonhost resistance. *Current Opinion in Plant Biology*, 6: 351-357.
- TRUNINGER, V., ARANDA, M. R. (2009): Recessive resistance to plant viruses. *Advances Virus Research*, 75: 119-159.
- VAN DER BIEZEN, E.A, JONES, J.D.G. (1998): Plant disease resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends in Plant Science*, 23: 454-456.
- VAN DER HOORN, R.A.L., KAMOUN, S. (2008): From Guard to Decoy: A new Model for Perception of Plant Pathogen Effectors. *The Plant Cell*, 20:2009-2017.
- VILELA, C., VELASCO, C., PTUSHKINA, M., MCCARTHY, J.E. (2000): The eukaryotic mRNA decapping protein Dcp1 interacts physically and functionally with the eIF4F translation initiation complex. *EMBO Journal*, 19: 4372-4382.
- WANG, A., KRISHNASWAMY, S. (2012): Eukaryotic translation initiation factor 4E mediated recessive resistance to plant viruses and its utility in crop improvement. *Molecular Plant Pathology*, 13: 795-803.
- WELLS, S. E., HILLNER, P.E., VALE, R.D., SACHS, A. B. (1998): Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors. *Molecular Cell*, 2(1): 135-140.
- WHITHAN, S., DINESH-KUMAR, S.P., CHOI, D., HEHL, R., CORR, C., BAKER, B. (1994): The product of the Tobacco mosaic virus resistance gene N: Similarity to Toll and the interleukin-1 receptor. *Cell*, 78: 1101-1115.
- WITTMAN, S., CHATEL, H., FORTIN, M.G., LALIBERTÉ, J.F. (1997): Interaction of viral protein genome linked of turné mosaic potyvirus with the translation eukaryotic initiation factor (iso)4E of *Arabidopsis thaliana* using the yeast two-hybrid system. *Virology*, 234: 84-92.

- YEAM, I., CAVATORTA, J.R, RIPOLL, D.R., KANG, B.C., JAHN, M.M. (2007): Functional dissection of naturely occuring amino acid substitutions in eIF4E that confers recessive potyvirus resistance in plants. *Plants Cell*, 19. 2913-2928.
- ZHANG, Y. Y., LI, H. X., OUYANG, B., YE, Z. B. (2006): Regulation of eukaryotic initiation factor 4E and its isoform: Implications for antiviral strategy in plants. *Journal of intergrative plant biology*, 48: 1129-1139.

9 Příloha

9.1 Část mnohočetného alignmentu genu *eIF4E* u vybraných rostlin s typickými inzercemi a delecemi v intronu 3

Sekvence genu *eIF4E* byly vloženy do programu MEGA 6.0, bylo provedeno mnohočetné přiřazení a následně byly sekvence zarovnány do bloku. Dané sekvence byly porovnávány se standardními alelami dostupnými v databázi GenBank (alela *eIF4E^S*-KF981414.1, alela *eIF4E^A*-KF053449.1, alela *eIF4E^B*-KF053433.1, alela *eIF4E^C*-KF053444.1).

Výskyt delecí a inzercí v intronu 3 je typický pro jednotlivé alely *eIF4E*. Zelenou barvou je vyznačena 50 bp dlouhá delece vyskytující se u alely *eIF4E^A* v intronu 3. Delece se vyskytuje v pozici 818 až 867. Byla detekována u genu *eIF4E* izolovaných z rostlin JI 1260/19, 212/1, JI 1546/1, JI 1260/18, JI 1260/1.

Modrou barvou jsou znázorněny delece u alely *eIF4E^B*. První delece je dlouhá 50 bp a vyskytuje se v pozici 1127 až 1182. Druhá delece dlouhá 14 bp se byla detekována v pozici 1343 až 1356. Delece se vyskytovaly i u sekvencí genu *eIF4E* z rostlin JI 99/1 a JI 99/2.

Žlutou barvou je znázorněna inserce u alely *eIF4E^C*, která se nachází v pozici 1186 až 1241 a je dlouhá 56 bp. Inserce byla detekována u genu *eIF4E* z rostlin JI 289/8.

Alela *eIF4E^S* nevykazuje žádné inserce ani delece ve srovnání s alelami *eIF4E^A*, *eIF4E^B* a *eIF4E^C*. Stejný stav byl zjištěn u genu *eIF4E* z rostlin JI 157/1, JI 157/2, JI 157/3, JI 157/6, JI 157/9, JI 157/9 a JI 157/10, JI 268/11 a JI 1585/4 (viz šedá barva).

Tato analýza inzercí a delecí vyskytující se v intronu 3 u všech sekvencí genu *eIF4E* potvrdila genotyp zjištěný PCR amplifikací.

801

850

1260/19	GGTTGTTATG	ATGTTAA
212/1	GGTTGTTATG	ATGTTAA
alelaA	GGTTGTTATG	ATGTTAA
1546/1	GGTTGTTATG	ATGTTAA
1546/20	GGTTGTTATG	ATGTTAA
1260/18	GGTTGTTATG	ATGTTAA
1260/1	GGTTGTTATG	ATGTTAA
157/1	GGTTGTTATG	ATGTTAATAA	GTAATTTTCT	AACTTCTTGA	AACTTCTTTT
157/6	GGTTGTTATG	ATGTTAATAA	GTAATTTTCT	AACTTCTTGA	AACTTCTTTT
157/10	GGTTGTTATG	ATGTTAATAA	GTAATTTTCT	AACTTCTTGA	AACTTCTTTT
153/3	GGTTGTTATG	ATGTTAATAA	GTAATTTTCT	AACTTCTTGA	AACTTCTTTT
157/9	GGTTGTTATG	ATGTTAATAA	GTAATTTTCT	AACTTCTTGA	AACTTCTTTT
157/2	GGTTGTTATG	ATGTTAATAA	GTAATTTTCT	AACTTCTTGA	AACTTCTTTT
1585/4	GGTTGTTATG	ATGTTAATAA	GTAATTTTCT	AACTTCTTGA	AACTTCTTTT
alelaS	GGTTGTTATG	ATGTTAATAA	GTAATTTTCT	AACTTCTTGA	AACTTCTTTT
268/11	GGTTGTTATG	ATGTTAATAA	GTAATTTTCT	AACTTCTTGA	AACTTCTTTT
alelaC	GGTTGTTATG	ATGTTAATAA	GTAATTTTCT	AACTTCTTGA	AACTTCTTTT
289/8	GGTTGTTATG	ATGTTAATAA	GTAATTTTCT	AACTTCTTGA	AACTTCTTTT
99/1	GGTTGTTATG	ATGTTAATAA	GTAATTTTCT	AACTTCTTGA	AACTTCTTTT
99/2	GGTTGTTATG	ATGTTAATAA	GTAATTTTCT	AACTTCTTGA	AACTTCTTTT
alelaB	GGTTGTTATG	ATGTTAATAA	GTAATTTTCT	AACTTCTTGA	AACTTCTTTT

851

900

1260/19	GCA	TGAAATGTGC	ATTTGTTATG	TGAATCTGAG
212/1	GCA	TGAAATGTGC	ATTTGTTATG	TGAATCTGAG
alelaA	GCA	TGAAATGTGC	ATTTGTTATG	TGAATCTGAG
1546/1	GCA	TGAAATGTGC	ATTTGTTATG	TGAATCTGAG
1546/20	GCA	TGAAATGTGC	ATTTGTTATG	TGAATCTGAG
1260/18	GCA	TGAAATGTGC	ATTTGTTATG	TGAATCTGAG
1260/1	GCA	TGAAATGTGC	ATTTGTTATG	TGAATCTGAG
157/1	GGTTGTTATG	ATGTTAAGCA	TGAAATGTGC	ATTTGTTATG	TGAATCTGAG
157/6	GGTTGTTATG	ATGTTAAGCA	TGAAATGTGC	ATTTGTTATG	TGAATCTGAG
157/10	GGTTGTTATG	ATGTTAAGCA	TGAAATGTGC	ATTTGTTATG	TGAATCTGAG
153/3	GGTTGTTATG	ATGTTAAGCA	TGAAATGTGC	ATTTGTTATG	TGAATCTGAG
157/9	GGTTGTTATG	ATGTTAAGCA	TGAAATGTGC	ATTTGTTATG	TGAATCTGAG
157/2	GGTTGTTATG	ATGTTAAGCA	TGAAATGTGC	ATTTGTTATG	TGAATCTGAG
1585/4	GGTTGTTATG	ATGTTAAGCA	TGAAATGTGC	ATTTGTTATG	TGAATCTGAG
alelaS	GGTTGTTATG	ATGTTAAGCA	TGAAATGTGC	ATTTGTTATG	TGAATCTGAG
268/11	GGTTGTTATG	ATGTTAAGCA	TGAAATGTGC	ATTTGTTATG	TGAATCTGAG
alelaC	GGTTGTTATG	ATGTTAAGCA	TGAAATGTGC	ATTTGTTATG	TGAATCTGAG
289/8	GGTTGTTATG	ATGTTAAGCA	TGAAATGTGC	ATTTGTTATG	TGAATCTGAG
99/1	GGTTGTTATG	ATGTTAAGCA	TGAAATGTGC	ATTTGTTATG	TGAATCTGAG
99/2	GGTTGTTATG	ATGTTAAGCA	TGAAATGTGC	ATTTGTTATG	TGAATCTGAG
alelaB	GGTTGTTATG	ATGTTAAGCA	TGAAATGTGC	ATTTGTTATG	TGAATCTGAG

	901		950
1260/19	TGTCACCCAA	ATGAAAGACC	TATAGGAGCA TATATTTACA CTTACGAGC
212/1	TGTCACCCAA	ATGAAAGACC	TATAGGAGCA TATATTTACA CTTACGAGC
alelaA	TGTCACCCAA	ATGAAAGACC	TATAGGAGCA TATATTTACA CTTACGAGC
1546/1	TGTCACCCAA	ATGAAAGACC	TATAGGAGCA TATATTTACA CTTACGAGC
1546/20	TGTCACCCAA	ATGAAAGACC	TATAGGAGCA TATATTTACA CTTACGAGC
1260/18	TGTCACCCAA	ATGAAAGACC	TATAGGAGCA TATATTTACA CTTACGAGC
1260/1	TGTCACCCAA	ATGAAAGACC	TATAGGAGCA TATATTTACA CTTACGAGC
157/1	TGTCACCCAA	ATGAAAGACC	TATAGGAGCA TATATTTACA CTTACGAGC
157/6	TGTCACCCAA	ATGAAAGACC	TATAGGAGCA TATATTTACA CTTACGAGC
157/10	TGTCACCCAA	ATGAAAGACC	TATAGGAGCA TATATTTACA CTTACGAGC
153/3	TGTCACCCAA	ATGAAAGACC	TATAGGAGCA TATATTTACA CTTACGAGC
157/9	TGTCACCCAA	ATGAAAGACC	TATAGGAGCA TATATTTACA CTTACGAGC
157/2	TGTCACCCAA	ATGAAAGACC	TATAGGAGCA TATATTTACA CTTACGAGC
1585/4	TGTCACCCAA	ATGAAAGACC	TATAGGAGCA TATATTTACA CTTACGAGC
alelaS	TGTCACCCAA	ATGAAAGACC	TATAGGAGCA TATATTTACA CTTACGAGC
268/11	TGTCACCCAA	ATGAAAGACC	TATAGGAGCA TATATTTACA CTTACGAGC
alelaC	TGTCACCCAA	ATGAAAGACC	TATAGGAGCA TATATTTACA CTTACGAGC
289/8	TGTCACCCAA	ATGAAAGACC	TATAGGAGCA TATATTTACA CTTACGAGC
99/1	TGTCACCCCA	ATGAAAGACC	TATAGGAGCA TATATTTACA CTTACGAGC
99/2	TGTCACCCCA	ATGAAAGACC	TATAGGAGCA TATATTTACA CTTACGAGC
alelaB	TGTCACCCCA	ATGAAAGACC	TATAGGAGCA TATATTTACA CTTACGAGC

	951		1000
1260/19	TTCTTAAATG	ATTCACATTT	TTTGTGTTT CAATGACTGT ATTTCTTGTT
212/1	TTCTTAAATG	ATTCACATTT	TTTGTGTTT CAATGACTGT ATTTCTTGTT
A	TTCTTAAATG	ATTCACATTT	TTTGTGTTT CAATGACTGT ATTTCTTGTT
1546/1	TTCTTAAATG	ATTCACATTT	TTTGTGTTT CAATGACTGT ATTTCTTGTT
1546/20	TTCTTAAATG	ATTCACATTT	TTTGTGTTT CAATGACTGT ATTTCTTGTT
1260/18	TTCTTAAATG	ATTCACATTT	TTTGTGTTT CAATGACTGT ATTTCTTGTT
1260/1	TTCTTAAATG	ATTCACATTT	TTTGTGTTT CAATGACTGT ATTTCTTGTT
157/1	TTCTTAAATG	ATTCACATTT	TTTGTGTTT CAATGACTGT ATTTCTTGTT
157/6	TTCTTAAATG	ATTCACATTT	TTTGTGTTT CAATGACTGT ATTTCTTGTT
157/10	TTCTTAAATG	ATTCACATTT	TTTGTGTTT CAATGACTGT ATTTCTTGTT
153/3	TTCTTAAATG	ATTCACATTT	TTTGTGTTT CAATGACTGT ATTTCTTGTT
157/9	TTCTTAAATG	ATTCACATTT	TTTGTGTTT CAATGACTGT ATTTCTTGTT
157/2	TTCTTAAATG	ATTCACATTT	TTTGTGTTT CAATGACTGT ATTTCTTGTT
1585/4	TTCTTAAATG	ATTCACATTT	TTTGTGTTT CAATGACTGT ATTTCTTGTT
alelaS	TTCTTAAATG	ATTCACATTT	TTTGTGTTT CAATGACTGT ATTTCTTGTT
268/11	TTCTTAAATG	ATTCACATTT	TTTGTGTTT CAATGACTGT ATTTCTTGTT
alelaC	TTCTTAAATG	ATTCACATTT	TTTGTGTTT CAATGACTGT ATTTCTTGTT
289/8	TTCTTAAATG	ATTCACATTT	TTTGTGTTT CAATGACTGT ATTTCTTGTT
99/1	TTCTTAAATG	ATTCACATTT	TTTGTGTTT CAATGACT.. ATTTCTTGTT
99/2	TTCTTAAATG	ATTCACATTT	TTTGTGTTT CAATGACT.. ATTTCTTGTT
alelaB	TTCTTAAATG	ATTCACATTT	TTTGTGTTT CAATGACT.. ATTTCTTGTT

	1001				1050
1260/19	TTCATGTAAT	ATTAATGAAT	TTTACCATGT	TGGGCAATTT	GGTCCCGGTA
212/1	TTCATGTAAT	ATTAATGAAT	TTTACCATGT	TGGGCAATTT	GGTCCCGGTA
alelaA	TTCATGTAAT	ATTAATGAAT	TTTACCATGT	TGGGCAATTT	GGTCCCGGTA
1546/1	TTCATGTAAT	ATTAATGAAT	TTTACCATGT	TGGGCAATTT	GGTCCCGGTA
1546/20	TTCATGTAAT	ATTAATGAAT	TTTACCATGT	TGGGCAATTT	GGTCCCGGTA
1260/18	TTCATGTAAT	ATTAATGAAT	TTTACCATGT	TGGGCAATTT	GGTCCCGGTA
1260/1	TTCATGTAAT	ATTAATGAAT	TTTACCATGT	TGGGCAATTT	GGTCCCGGTA
157/1	TTCATGTAAT	ATTAATGAAT	TTTACCATGT	TGGGCAATTT	GGTCCCGGTA
157/6	TTCATGTAAT	ATTAATGAAT	TTTACCATGT	TGGGCAATTT	GGTCCCGGTA
157/10	TTCATGTAAT	ATTAATGAAT	TTTACCATGT	TGGGCAATTT	GGTCCCGGTA
153/3	TTCATGTAAT	ATTAATGAAT	TTTACCATGT	TGGGCAATTT	GGTCCCGGTA
157/9	TTCATGTAAT	ATTAATGAAT	TTTACCATGT	TGGGCAATTT	GGTCCCGGTA
157/2	TTCATGTAAT	ATTAATGAAT	TTTACCATGT	TGGGCAATTT	GGTCCCGGTA
1585/4	TTCATGTAAT	ATTAATGAAT	TTTACCATGT	TGGGCAATTT	GGTCCCGGTA
alelaS	TTCATGTAAT	ATTAATGAAT	TTTACCATGT	TGGGCAATTT	GGTCCCGGTA
268/11	TTCATGTAAT	ATTAATGAAT	TTTACCATGT	TGGGCAATTT	GGTCCCGGTA
alelaC	TTCATGTAAT	ATTAATGAAT	TTTACCATGT	TGGGCAATTT	GGTCCCGGTA
289/8	TTCATGTAAT	ATTAATGAAT	TTTACCATGT	TGGGCAATTT	GGTCCCGGTA
99/1	TTCATGTAAT	ATTAGTGAAT	TTTACCATGT	TGGGCAATTT	GGTCCCGGTA
99/2	TTCATGTAAT	ATTAGTGAAT	TTTACCATGT	TGGGCAATTT	GGTCCCGGTA
alelaB	TTCATGTAAT	ATTAGTGAAT	TTTACCATGT	TGGGCAATTT	GGTCCCGGTA

	1051				1100
1260/19	ACTCACTATA	TTTCCTAGTG	ATCTCTGATA	TTGAAAATTG	TCGAGAACAT
212/1	ACTCACTATA	TTTCCTAGTG	ATCTCTGATA	TTGAAAATTG	TCGAGAACAT
alelaA	ACTCACTATA	TTTCCTAGTG	ATCTCTGATA	TTGAAAATTG	TCGAGAACAT
1546/1	ACTCACTATA	TTTCCTAGTG	ATCTCTGATA	TTGAAAATTG	TCGAGAACAT
1546/20	ACTCACTATA	TTTCCTAGTG	ATCTCTGATA	TTGAAAATTG	TCGAGAACAT
1260/18	ACTCACTATA	TTTCCTAGTG	ATCTCTGATA	TTGAAAATTG	TCGAGAACAT
1260/1	ACTCACTATA	TTTCCTAGTG	ATCTCTGATA	TTGAAAATTG	TCGAGAACAT
157/1	ACTCACTATA	TTTCCTAGTG	ATCTCTGATA	TTGAAAATTG	TCGAGAACAT
157/6	ACTCACTATA	TTTCCTAGTG	ATCTCTGATA	TTGAAAATTG	TCGAGAACAT
157/10	ACTCACTATA	TTTCCTAGTG	ATCTCTGATA	TTGAAAATTG	TCGAGAACAT
153/3	ACTCACTATA	TTTCCTAGTG	ATCTCTGATA	TTGAAAATTG	TCGAGAACAT
157/9	ACTCACTATA	TTTCCTAGTG	ATCTCTGATA	TTGAAAATTG	TCGAGAACAT
157/2	ACTCACTATA	TTTCCTAGTG	ATCTCTGATA	TTGAAAATTG	TCGAGAACAT
1585/4	ACTCACTATA	TTTCCTAGTG	ATCTCTGATA	TTGAAAATTG	TCGAGAACAT
alelaS	ACTCACTATA	TTTCCTAGTG	ATCTCTGATA	TTGAAAATTG	TCGAGAACAT
268/11	ACTCACTATA	TTTCCTAGTG	ATCTCTGATA	TTGAAAATTG	TCGAGAACAT
alelaC	ACTCACTATA	TTTCCTAGTG	ATCTCTGATA	TTGAAAATTG	TCGAGAACAT
289/8	ACTCACTATA	TTTCCTAGTG	ATCTCTGATA	TTGAAAATTG	TCGAGAACAT
99/1	ACTCACTATA	TTTCCTAGTG	ATCTCTGATA	TTGAAAATTG	TCGAGAACAT
99/2	ACTCACTATA	TTTCCTAGTG	ATCTCTGATA	TTGAAAATTG	TCGAGAACAT
alelaB	ACTCACTATA	TTTCCTAGTG	ATCTCTGATA	TTGAAAATTG	TCGAGAACAT

	1101				1150
1260/19	TAGTCCTTTT	GGGTCGACCA	TTTAAGATCT	CTGATATTGA	AAATTGTCTGA
212/1	TAGTCCTTTT	GGGTCGACCA	TTTAAGATCT	CTGATATTGA	AAATTGTCTGA
alelaA	TAGTCCTTTT	GGGTCGACCA	TTTAAGATCT	CTGATATTGA	AAATTGTCTGA
1546/1	TAGTCCTTTT	GGGTCGACCA	TTTAAGATCT	CTGATATTGA	AAATTGTCTGA
1546/20	TAGTCCTTTT	GGGTCGACCA	TTTAAGATCT	CTGATATTGA	AAATTGTCTGA
1260/18	TAGTCCTTTT	GGGTCGACCA	TTTAAGATCT	CTGATATTGA	AAATTGTCTGA
1260/1	TAGTCCTTTT	GGGTCGACCA	TTTAAGATCT	CTGATATTGA	AAATTGTCTGA
157/1	TAGTCCTTTT	GGGTCGACCA	TTTAAGATCT	CTGATATTGA	AAATTGTCTGA
157/6	TAGTCCTTTT	GGGTCGACCA	TTTAAGATCT	CTGATATTGA	AAATTGTCTGA
157/10	TAGTCCTTTT	GGGTCGACCA	TTTAAGATCT	CTGATATTGA	AAATTGTCTGA
153/3	TAGTCCTTTT	GGGTCGACCA	TTTAAGATCT	CTGATATTGA	AAATTGTCTGA
157/9	TAGTCCTTTT	GGGTCGACCA	TTTAAGATCT	CTGATATTGA	AAATTGTCTGA
157/2	TAGTCCTTTT	GGGTCGACCA	TTTAAGATCT	CTGATATTGA	AAATTGTCTGA
1585/4	TAGTCCTTTT	GGGTCGACCA	TTTAAGATCT	CTGATATTGA	AAATTGTCTGA
alelaS	TAGTCCTTTT	GGGTCGACCA	TTTAAGATCT	CTGATATTGA	AAATTGTCTGA
268/11	TAGTCCTTTT	GGGTCGACCA	TTTAAGATCT	CTGATATTGA	AAATTGTCTGA
alelaC	TAGTCCTTTT	GGGTCGACCA	TTTAAGATCT	CTGATATTGA	AAATTGTCTGA
289/8	TAGTCCTTTT	GGGTCGACCA	TTTAAGATCT	CTGATATTGA	AAATTGTCTGA
99/1	TAGTCCTTTT	GGGTCGACCA	TTTAAG
99/2	TAGTCCTTTT	GGGTCGACCA	TTTAAG
alelaB	TAGTCCTTTT	GGGTCGACCA	TTTAAG

	1151				1200
1260/19	GAACATTAGT	CCTTTTGGGT	TGACCATTTA	AGTCC.....
212/1	GAACATTAGT	CCTTTTGGGT	TGACCATTTA	AGTCC.....
alelaA	GAACATTAGT	CCTTTTGGGT	TGACCATTTA	AGTCC.....
1546/1	GAACATTAGT	CCTTTTGGGT	TGACCATTTA	AGTCC.....
1546/20	GAACATTAGT	CCTTTTGGGT	TGACCATTTA	AGTCC.....
1260/18	GAACATTAGT	CCTTTTGGGT	TGACCATTTA	AGTCC.....
1260/1	GAACATTAGT	CCTTTTGGGT	TGACCATTTA	AGTCC.....
157/1	GAACATTAGT	CCTTTTGGGT	TGACCATTTA	AGTCC.....
157/6	GAACATTAGT	CCTTTTGGGT	TGACCATTTA	AGTCC.....
157/10	GAACATTAGT	CCTTTTGGGT	TGACCATTTA	AGTCC.....
153/3	GAACATTAGT	CCTTTTGGGT	TGACCATTTA	AGTCC.....
157/9	GAACATTAGT	CCTTTTGGGT	TGACCATTTA	AGTCC.....
157/2	GAACATTAGT	CCTTTTGGGT	TGACCATTTA	AGTCC.....
1585/4	GAACATTAGT	CCTTTTGGGT	TGACCATTTA	AGTCC.....
alelaS	GAACATTAGT	CCTTTTGGGT	TGACCATTTA	AGTCC.....
268/11	GAACATTAGT	CCTTTTGGGT	TGACCATTTA	AGTCC.....
alelaC	GAACATTAGT	CCTTTTGGGT	CGACCATTTA	AGATCTCTGA	TATTGAAAAT
289/8	GAACATTAGT	CCTTTTGGGT	CGACCATTTA	AGATCTCTGA	TATTGAAAAT
99/1TCC.....
99/2TCC.....
alelaBTCC.....

1201					1250
1260/19TTAAATTTA
212/1TTAAATTTA
alelaATTAAATTTA
1546/1TTAAATTTA
1546/20TTAAATTTA
1260/18TTAAATTTA
1260/1TTAAATTTA
157/1TTAAATTTA
157/6TTAAATTTA
157/10TTAAATTTA
153/3TTAAATTTA
157/9TTAAATTTA
157/2TTAAATTTA
1585/4TTAAATTTA
alelaSTTAAATTTA
268/11TTAAATTTA
alelaC	TGTCGAGAAC	ATTAGTCCTT	TTGGGTTGAC	CATTTAAGTC	CTTAAATTTA
289/8	TGTCGAGAAC	ATTAGTCCTT	TTGGGTTGAC	CATTTAAGTC	CTTAAATTTA
99/1TTAAATTTA
99/2TTAAATTTA
alelaBTTAAATTTA

1251					1300
1260/19	TCATGGAGGG	GGCTAGTGTG	ATCGAGAATT	TAAATTACTG	AGACCACTTG
212/1	TCATGGAGGG	GGCTAGTGTG	ATCGAGAATT	TAAATTACTG	AGACCACTTG
alelaA	TCATGGAGGG	GGCTAGTGTG	ATCGAGAATT	TAAATTACTG	AGACCACTTG
1546/1	TCATGGAGGG	GGCTAGTGTG	ATCGAGAATT	TAAATTACTG	AGACCACTTG
1546/20	TCATGGAGGG	GGCTAGTGTG	ATCGAGAATT	TAAATTACTG	AGACCACTTG
1260/18	TCATGGAGGG	GGCTAGTGTG	ATCGAGAATT	TAAATTACTG	AGACCACTTG
1260/1	TCATGGAGGG	GGCTAGTGTG	ATCGAGAATT	TAAATTACTG	AGACCACTTG
157/1	TCATGGAGGG	GGCTAGTGTG	ATCGAGAATT	TAAATTACTG	AGACCACTTG
157/6	TCATGGAGGG	GGCTAGTGTG	ATCGAGAATT	TAAATTACTG	AGACCACTTG
157/10	TCATGGAGGG	GGCTAGTGTG	ATCGAGAATT	TAAATTACTG	AGACCACTTG
153/3	TCATGGAGGG	GGCTAGTGTG	ATCGAGAATT	TAAATTACTG	AGACCACTTG
157/9	TCATGGAGGG	GGCTAGTGTG	ATCGAGAATT	TAAATTACTG	AGACCACTTG
157/2	TCATGGAGGG	GGCTAGTGTG	ATCGAGAATT	TAAATTACTG	AGACCACTTG
1585/4	TCATGGAGGG	GGCTAGTGTG	ATCGAGAATT	TAAATTACTG	AGACCACTTG
alelaS	TCATGGAGGG	GGCTAGTGTG	ATCGAGAATT	TAAATTACTG	AGACCACTTG
268/11	TCATGGAGGG	GGCTAGTGTG	ATCGAGAATT	TAAATTACTG	AGACCACTTG
alelaC	TCATGGAGGG	GGCTAGTGTG	ATCGAGAATT	TAAATTACTG	AGACCACTTG
289/8	TCATGGAGGG	GGCTAGTGTG	ATCGAGAATT	TAAATTACTG	AGACCACTTG
99/1	TCATGGAGGG	GGCTAGTGTG	ATTGAGAATT	TACATTACTG	AGATCACTTG
99/2	TCATGGAGGG	GGCTAGTGTG	ATTGAGAATT	TACATTACTG	AGATCACTTG
alelaB	TCATGGAGGG	GGCTAGTGTG	ATTGAGAATT	TACATTACTG	AGATCACTTG

1301						1350
1260/19	GTAGTTTCAT	TGATTTCAAG	GGCCAAC	TGT	ACCATATGAG	TGGGAGAGGA
212/1	GTAGTTTCAT	TGATTTCAAG	GGCCAAC	TGT	ACCATATGAG	TGGGAGAGGA
alelaA	GTAGTTTCAT	TGATTTCAAG	GGCCAAC	TGT	ACCATATGAG	TGGGAGAGGA
1546/1	GTAGTTTCAT	TGATTTCAAG	GGCCAAC	TGT	ACCATATGAG	TGGGAGAGGA
1546/20	GTAGTTTCAT	TGATTTCAAG	GGCCAAC	TGT	ACCATATGAG	TGGGAGAGGA
1260/18	GTAGTTTCAT	TGATTTCAAG	GGCCAAC	TGT	ACCATATGAG	TGGGAGAGGA
1260/1	GTAGTTTCAT	TGATTTCAAG	GGCCAAC	TGT	ACCATATGAG	TGGGAGAGGA
157/1	GTAGTTTCAT	TGATTTCAAG	GGCCAAC	TGT	ACCATATGAG	TGGGAGAGGA
157/6	GTAGTTTCAT	TGATTTCAAG	GGCCAAC	TGT	ACCATATGAG	TGGGAGAGGA
157/10	GTAGTTTCAT	TGATTTCAAG	GGCCAAC	TGT	ACCATATGAG	TGGGAGAGGA
153/3	GTAGTTTCAT	TGATTTCAAG	GGCCAAC	TGT	ACCATATGAG	TGGGAGAGGA
157/9	GTAGTTTCAT	TGATTTCAAG	GGCCAAC	TGT	ACCATATGAG	TGGGAGAGGA
157/2	GTAGTTTCAT	TGATTTCAAG	GGCCAAC	TGT	ACCATATGAG	TGGGAGAGGA
1585/4	GTAGTTTCAT	TGATTTCAAG	GGCCAAC	TGT	ACCATATGAG	TGGGAGAGGA
alelaS	GTAGTTTCAT	TGATTTCAAG	GGCCAAC	TGT	ACCATATGAG	TGGGAGAGGA
268/11	GTAGTTTCAT	TGATTTCAAG	GGCCAAC	TGT	ACCATATGAG	TGGGAGAGGA
alelaC	GTAGTTTCAT	TGATTTCAAG	GGCCAAC	TGT	ACCATATGAG	TGGGAGAGGA
289/8	GTAGTTTCAT	TGATTTCAAG	GGCCAAC	TGT	ACCATATGAG	TGGGAGAGGA
99/1	GTAGTTTCAT	TGATTTCAAG	GGCCAAC	TGT	ACCATATGAG	TG.....
99/2	GTAGTTTCAT	TGATTTCAAG	GGCCAAC	TGT	ACCATATGAG	TG.....
alelaB	GTAGTTTCAT	TGATTTCAAG	GGCCAAC	TGT	ACCATATGAG	TG.....

1351						1400
1260/19	TGAGTGTGTA	GTCAAGATTG	AGTGCTGGAT	CATAAGATCG	TAAGAACTTA	
212/1	TGAGTGTGTA	GTCAAGATTG	AGTGCTGGAT	CATAAGATCG	TAAGAACTTA	
alelaA	TGAGTGTGTA	GTCAAGATTG	AGTGCTGGAT	CATAAGATCG	TAAGAACTTA	
1546/1	TGAGTGTGTA	GTCAAGATTG	AGTGCTGGAT	CATAAGATCG	TAAGAACTTA	
1546/20	TGAGTGTGTA	GTCAAGATTG	AGTGCTGGAT	CATAAGATCG	TAAGAACTTA	
1260/18	TGAGTGTGTA	GTCAAGATTG	AGTGCTGGAT	CATAAGATCG	TAAGAACTTA	
1260/1	TGAGTGTGTA	GTCAAGATTG	AGTGCTGGAT	CATAAGATCG	TAAGAACTTA	
157/1	TGAGTGTGTA	GTCAAGATTG	AGTGCTGGAT	CATAAGATCG	TAAGAACTTA	
157/6	TGAGTGTGTA	GTCAAGATTG	AGTGCTGGAT	CATAAGATCG	TAAGAACTTA	
157/10	TGAGTGTGTA	GTCAAGATTG	AGTGCTGGAT	CATAAGATCG	TAAGAACTTA	
153/3	TGAGTGTGTA	GTCAAGATTG	AGTGCTGGAT	CATAAGATCG	TAAGAACTTA	
157/9	TGAGTGTGTA	GTCAAGATTG	AGTGCTGGAT	CATAAGATCG	TAAGAACTTA	
157/2	TGAGTGTGTA	GTCAAGATTG	AGTGCTGGAT	CATAAGATCG	TAAGAACTTA	
1585/4	TGAGTGTGTA	GTCAAGATTG	AGTGCTGGAT	CATAAGATCG	TAAGAACTTA	
alelaS	TGAGTGTGTA	GTCAAGATTG	AGTGCTGGAT	CATAAGATCG	TAAGAACTTA	
268/11	TGAGTGTGTA	GTCAAGATTG	AGTGCTGGAT	CATAAGATCG	TAAGAACTTA	
alelaC	TGAGTGTGTA	GTCAAGATTG	AGTGCTGGAT	CATAAGATCG	TAAGAACTTA	
289/8	TGAGTGTGTA	GTCAAGATTG	AGTGCTGGAT	CATAAGATCG	TAAGAACTTA	
99/1TGTA	GTCAAGATTG	AGTGCTGGAT	CGTAAGATCG	TAAGAACTTA	
99/2TGTA	GTCAAGATTG	AGTGCTGGAT	CGTAAGATCG	TAAGAACTTA	
alelaBTGTA	GTCAAGATTG	AGTGCTGGAT	CGTAAGATCG	TAAGAACTTA	

	1401				1450
1260/19	CGTGCCAAGG	GTGCCTGAGA	GTGCTATGAT	ATGAGAAAGA	TTGTTTTTGT
212/1	CGTGCCAAGG	GTGCCTGAGA	GTGCTATGAT	ATGAGAAAGA	TTGTTTTTGT
alelaA	CGTGCCAAGG	GTGCCTGAGA	GTGCTATGAT	ATGAGAAAGA	TTGTTTTTGT
1546/1	CGTGCCAAGG	GTGCCTGAGA	GTGCTATGAT	ATGAGAAAGA	TTGTTTTTGT
1546/20	CGTGCCAAGG	GTGCCTGAGA	GTGCTATGAT	ATGAGAAAGA	TTGTTTTTGT
1260/18	CGTGCCAAGG	GTGCCTGAGA	GTGCTATGAT	ATGAGAAAGA	TTGTTTTTGT
1260/1	CGTGCCAAGG	GTGCCTGAGA	GTGCTATGAT	ATGAGAAAGA	TTGTTTTTGT
157/1	CGTGCCAAGG	GTGCCTGAGA	GTGCTATGAT	ATGAGAAAGA	TTGTTTTTGT
157/6	CGTGCCAAGG	GTGCCTGAGA	GTGCTATGAT	ATGAGAAAGA	TTGTTTTTGT
157/10	CGTGCCAAGG	GTGCCTGAGA	GTGCTATGAT	ATGAGAAAGA	TTGTTTTTGT
153/3	CGTGCCAAGG	GTGCCTGAGA	GTGCTATGAT	ATGAGAAAGA	TTGTTTTTGT
157/9	CGTGCCAAGG	GTGCCTGAGA	GTGCTATGAT	ATGAGAAAGA	TTGTTTTTGT
157/2	CGTGCCAAGG	GTGCCTGAGA	GTGCTATGAT	ATGAGAAAGA	TTGTTTTTGT
1585/4	CGTGCCAAGG	GTGCCTGAGA	GTGCTATGAT	ATGAGAAAGA	TTGTTTTTGT
alelaS	CGTGCCAAGG	GTGCCTGAGA	GTGCTATGAT	ATGAGAAAGA	TTGTTTTTGT
268/11	CGTGCCAAGG	GTGCCTGAGA	GTGCTATGAT	ATGAGAAAGA	TTGTTTTTGT
alelaC	CGTGCCAAGG	GTGCCTGAGA	GTGCTATGAT	ATGAGAAAGA	TTGTTTTTGT
289/8	CGTGCCAAGG	GTGCCTGAGA	GTGCTATGAT	ATGAGAAAGA	TTGTTTTTGT
99/1	CGCGCCAAGG	GTGCCTGAGA	GTGCTATGAT	ATGAGAAAGA	TTGTTTTTGT
99/2	CGCGCCAAGG	GTGCCTGAGA	GTGCTATGAT	ATGAGAAAGA	TTGTTTTTGT
alelaB	CGCGCCAAGG	GTGCCTGAGA	GTGCTATGAT	ATGAGAAAGA	TTGTTTTTGT

	1451				1500
1260/19	TGCTAGTGTG	GTCAAGATTG	AGCTTTTTGA	AGCAAGATCG	TAAAAAAAAAC
212/1	TGCTAGTGTG	GTCAAGATTG	AGCTTTTTGA	AGCAAGATCG	TAAAAAAAAAC
alelaA	TGCTAGTGTG	GTCAAGATTG	AGCTTTTTGA	AGCAAGATCG	TAAAAAAAAAC
1546/1	TGCTAGTGTG	GTCAAGATTG	AGCTTTTTGA	AGCAAGATCG	TAAAAAAAAAC
1546/20	TGCTAGTGTG	GTCAAGATTG	AGCTTTTTGA	AGCAAGATCG	TAAAAAAAAAC
1260/18	TGCTAGTGTG	GTCAAGATTG	AGCTTTTTGA	AGCAAGATCG	TAAAAAAAAAC
1260/1	TGCTAGTGTG	GTCAAGATTG	AGCTTTTTGA	AGCAAGATCG	TAAAAAAAAAC
157/1	TGCTAGTGTG	GTCAAGATTG	AGCTTTTTGA	AGCAAGATCG	TAAAAAAAAAC
157/6	TGCTAGTGTG	GTCAAGATTG	AGCTTTTTGA	AGCAAGATCG	TAAAAAAAAAC
157/10	TGCTAGTGTG	GTCAAGATTG	AGCTTTTTGA	AGCAAGATCG	TAAAAAAAAAC
153/3	TGCTAGTGTG	GTCAAGATTG	AGCTTTTTGA	AGCAAGATCG	TAAAAAAAAAC
157/9	TGCTAGTGTG	GTCAAGATTG	AGCTTTTTGA	AGCAAGATCG	TAAAAAAAAAC
157/2	TGCTAGTGTG	GTCAAGATTG	AGCTTTTTGA	AGCAAGATCG	TAAAAAAAAAC
1585/4	TGCTAGTGTG	GTCAAGATTG	AGCTTTTTGA	AGCAAGATCG	TAAAAAAAAAC
alelaS	TGCTAGTGTG	GTCAAGATTG	AGCTTTTTGA	AGCAAGATCG	TAAAAAAAAAC
268/11	TGCTAGTGTG	GTCAAGATTG	AGCTTTTTGA	AGCAAGATCG	TAAAAAAAAAC
alelaC	TGCTAGTGTG	GTCAAGATTG	AGCTTTTTGA	AGCAAGATCG	TAAAAAAAAAC
289/8	TGCTAGTGTG	GTCAAGATTG	AGCTTTTTGA	AGCAAGATCG	TAAAAAAAAAC
99/1	TGCTAGTGTG	GTCAAGATTG	AGCTTTTTGA	AGCAAGATAG	TAAAAAAA.T
99/2	TGCTAGTGTG	GTCAAGATTG	AGCTTTTTGA	AGCAAGATAG	TAAAAAAA.T
alelaB	TGCTAGTGTG	GTCAAGATTG	AGCTTTTTGA	AGCAAGATAG	TAAAAAAA.T