

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Virus žluté zakrslosti cibule (OYDV) a jeho
hostitelský okruh**

Bakalářská práce

Denisa Šimoníková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2015

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

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

V Olomouci

podpis:.....

Souhrn

Virus žluté zakrslosti cibule (OYDV) patří do rodu *Potyvirus*, čeledi *Potyviridae*. Jeho genetickou informaci představuje lineární, jednovláknová RNA s pozitivní polaritou a funkcí messenger RNA, na 5' konci má připojen VPg protein namísto čepičky, a na 3' konci poly(A)-sekvenci. Virový genom kóduje polyprotein, který je následně štěpen na 10 proteinů.

OYDV je nejrozšířenějším virem řazeným do komplexu virů česneku, napadá zástupce rodu *Allium* po celém světě. Mezi typické příznaky infekce OYDV patří žluté pruhy a chlorotické léze na listech. U infikovaných plodin se často nachází ve směsné infekci s dalšími viry, což vede k zesílení symptomů a větším ztrátám v zemědělských výnosech.

Práce se zabývá charakterizací 3 izolátů OYDV původem z České republiky, které byly získány z hostitelských rostlin cibule a česneku, dva izoláty původem z cibule a jeden izolát původem z česneku. U izolátu 1172 získaného z česneku byla stanovena hostitelská specifita, kdy bylo zjištěno, že je tento izolát přenosný pouze na česnek, nikoliv na cibuli. Tento izolát je tak vůbec prvním popsáním izolátem, jehož hostitelská specifita je omezena pouze na česnek.

Pomocí RT-PCR a sekvencování byla získána kompletní genomová sekvence u izolátů OYDV Křivský a Puchala původem z cibule, o délce 10 461 bp bez poly(A)-konce a parciální sekvence izolátu OYDV 1172 původem z česneku, o délce 4 590 bp bez poly(A)-konce.

Genomové sekvence izolátů Křivský a Puchala mezi sebou vykazují 99% identitu, naopak jejich identita s izolátem 1172 je jen 77%. Izoláty Křivský a Puchala vykazují největší, 93% podobnost s německým izolátem OYDV-At (Acc. No. JX433020.1) a s argentinským izolátem OYDV-Se (Acc. No. JX433019.1), jejichž původním hostitelem byla také cibule. Izolát 1172 vykazuje největší, 88% identitu s izolátem OYDV-SW9-Arg3 původem z česneku z Argentiny (Acc. No. KF632715.1).

Fylogenetická analýza potvrdila odlišnost studovaných izolátů OYDV v souladu s jejich známou hostitelskou specifikou. Izoláty původem z cibule, nepřenositelné na česnek, vytvořily samostatnou fylogenetickou větev, druhou větev vytvořil izolát 1172 společně s izolátem OYDV-SW9-Arg3, a třetí samostatnou větev vytvořily izoláty původem z česneku, přenosné jak na česnek, tak na cibuli.

Summary

Onion yellow dwarf virus (OYDV) is a member of genus *Potyvirus*, family *Potyviridae*. Genetic information is carried by linear, single-stranded, positive-sense RNA. RNA has 5' terminal genome-linked protein (VPg) and 3' poly(A) tail. The viral genome encodes polyprotein that is cleaved into ten proteins.

OYDV is the most widespread virus classified into the garlic virus complex which infects the members of genus *Allium* throughout the world. Typical symptoms of OYDV infection are yellow striping and chlorotic lesions on the leaves. OYDV usually occurs in mixed infection with other viruses in infected plants causing stronger symptoms and greater losses in crop yields.

Three OYDV isolates from the Czech Republic were characterized in this work. These isolates were obtained from host plants onion and garlic, two isolates originating from onion and one isolate originating from garlic. Host specificity of isolate 1172 obtained from garlic was determined. It was found out that this isolate infects only garlic, not onion. This isolate is characterized as the first isolate which host specificity is limited to garlic.

Using RT-PCR and sequencing the complete genomic sequence of isolates Křivský and Puchala originating from onion with the length of 10 461 bp with no poly (A) tail and partial sequence of the isolate OYDV 1172 originating from garlic with the length of 4 590 bp without the poly (A) tail was obtained.

Genomic sequences of isolates Křivský and Puchala show 99% identity, similarity of these sequences with isolate 1172 was 77 %. Isolates Křivský and Puchala show the largest 93% similarity with German isolate OYDV-At (Acc. No. JX433020.1) and with Argentine isolate OYDV-Se (Acc. No. JX433019.1) whose original host was also onion. Isolate 1172 has the highest 88% identity with isolate OYDV-SW9-Arg3 origin of garlic from Argentina (Acc. No. KF632715.1).

Phylogenetic analysis confirmed the difference of the OYDV isolates characterized in this work consistent with their known host specificity. Isolates originating from onion, which do not infect garlic, created separate phylogenetic group. The isolate 1172 along with isolate OYDV-SW9-Arg3 belong to the second group. The third group is consisted of isolates originating from garlic which infect garlic and onion.

Tímto bych chtěla poděkovat Mgr. Daně Šafařové, Ph.D. za odborné vedení a pomoc při psaní mé bakalářské práce a získávání výsledků v rámci experimentální části. Dále děkuji všem, kteří mi pomáhali při práci v laboratoři, především paní laborantce Janě Veselské.

Tato práce byla zpracována s podporou Interní grantové agentury Univerzity Palackého (IGA_PrF_2014004).

Obsah

1 Úvod	8
2 Cíl práce.....	9
3 Současný stav řešené problematiky	10
3.1 Charakteristika čeledi <i>Potyviriidae</i> a rodu <i>Potyvirus</i>	10
3.1.1 Význam čeledi a její zástupci	10
3.1.2 Virová částice	11
3.1.2.1 Genom.....	12
3.1.2.2 Proteiny a jejich funkce	13
3.2 Charakteristika zástupců rodu <i>Potyvirus</i> infikujících česnek a cibuli	14
3.2.1 Význam OYDV a LYSV	14
3.2.2 Struktura genomu OYDV	15
3.2.3 Biologické vlastnosti OYDV a LYSV	17
3.2.3.1 Příznaky infekce	17
3.2.3.2 Ekonomický význam	18
3.2.3.3 Okruh hostitelů	18
3.2.3.4 Přenos viru	19
3.2.3.5 Geografické rozšíření.....	19
3.3 Hostitelská specifita potyvirů	21
3.3.1 Genetická variabilita a hostitelská specifita OYDV	24
3.4 Detekce OYDV	25
4 Materiál a metody	28
4.1 Rostlinný materiál.....	28
4.2 DAS-ELISA.....	28
4.3 Mechanická inokulace	30
4.4 Testování hostitelské specifity.....	30

4.5 Izolace RNA	30
4.6 Reverzní transkripce	31
4.7 Polymerázová řetězová reakce.....	32
4.8 Elektroforéza v agarózovém gelu	35
4.9 Izolace PCR produktu z gelu	36
4.10 Sekvencování DNA fragmentů.....	37
4.11 Bioinformatická analýza	37
5 Výsledky	39
5.1 Hostitelská specifita izolátu 1172	39
5.2 Genom izolátů OYDV pocházejících z cibule.....	40
5.3 Genom izolátu OYDV pocházejícího z česneku	41
5.4 Genetická a fylogenetická analýza	47
6 Diskuze	50
7 Závěr	52
8 Literatura.....	53
9 Seznam použitých zkratk a symbolů.....	61

1 Úvod

Zástupci rodu *Allium* jsou hospodářsky významnými plodinami pěstovanými po celém světě. Viry napadající tyto plodiny způsobují značné ztráty ve výnosech, dochází hlavně k úbytku na váze u cibulí a jejich celkovému znehodnocení. Takových virů je celá škála, infekce se objevuje u kulturních plodin, převážně u česneků a cibulí.

U rodu *Allium* se viry velmi často vyskytují ve směsné infekci, která je nazývána komplexem virů česneku. Virus žluté zakrslosti cibule (*Onion yellow dwarf virus*, OYDV), patřící do čeledi *Potyviriidae*, je nejrozšířenějším virem řazeným do komplexu virů česneku.

Práce je rozdělena na dvě části, přičemž první část se zabývá literární rešerší týkající se charakteristiky OYDV, pozornost je věnována problematice hostitelské specifity viru žluté zakrslosti cibule a dalších virů rodu *Potyvirus*. Experimentální část je zaměřena na genetickou charakteristiku tří izolátů viru žluté zakrslosti cibule pocházejících z různých hostitelských rostlin česneku a cibule, a analýzu jejich hostitelské specifity.

2 Cíl práce

Cílem této práce bylo vypracování literární rešerše týkající se variability potyvirů a jejich hostitelské specifity s důrazem na OYDV, dále zjištění hostitelské specifity a genetická analýza vybraných izolátů viru žluté zakrslosti cibule (OYDV).

3 Současný stav řešené problematiky

Česnek kuchyňský (*Allium sativum* L.) je jedním z hospodářsky nejdůležitějších zástupců rodu *Allium*, pěstuje se po celém světě. Je to zelenina, která je oblíbená při přípravě pokrmů, a je široce využívána nejen v tradičním léčitelství, ale její význam roste i v klasické medicíně. Vyznačuje se antibiotickou, antidiabetickou, protirakovinnou, antioxidační aktivitou, byl prokázán jeho účinek na snižování krevního tlaku a hladiny cholesterolu (Keusgen, 2002; Baghalian *et al.*, 2010).

Globální produkce česneku neustále stoupá, v roce 2003 byla zaznamenána produkce více než 13 milionů tun (Alves *et al.*, 2008), v roce 2013 už přesáhla 24 milionů tun (FAOSTAT, 2013).

V současné době je vážným hospodářským problémem značná redukce výnosů a kvality způsobená virovou infekcí rostlin, viry napadající česnek by proto měly být více studovány.

Česnek je obvykle infikován směsí virů označovanou jako komplex virů česneku, jedná se o *Onion yellow dwarf virus*, *Leek yellow stripe virus* (oba z rodu *Potyvirus*), *Garlic common latent virus*, *Shallot latent virus* (oba z rodu *Carlavirus*) a různé alexiviry (rod *Allexivirus*), tj. *Garlic virus A, B, D, E, X*, *Garlic mite-borne filamentous virus* a *Shallot virus X* (Walkey *et Antill*, 1989; Van Dijk, 1994; Majumder *et Baranwal*, 2014).

Také cibule kuchyňská (*Allium cepa* L.), patřící rovněž do rodu *Allium*, je náchylná k řadě chorob způsobených houbami, bakteriemi a viry. Mezi viry infikující cibuli jsou obecně řazeny potyviry, carlaviry, allexiviry a tospoviry (Mohan *et Schwartz*, 2005).

3.1 Charakteristika čeledi *Potyviridae* a rodu *Potyvirus*

3.1.1 Význam čeledi a její zástupci

Čeď *Potyviridae* zahrnuje více než 30 % známých virů napadajících rostliny, z nichž mnohé mají význam v zemědělství (Chung *et al.*, 2008). Odhady počtu virových druhů této čeledi se liší, Chen *et al.* v roce 2001 uvedli, že je do této čeledi řazeno více než 200 druhů virů, avšak podle nejnovějších dat z ICTV (2014) se jedná pouze o 190 druhů.

Zástupci *Potyviridae* jsou rozděleni do 8 rodů: *Brambyvirus*, *Bymovirus*, *Ipomovirus*, *Macluravirus*, *Poacevirus*, *Potyvirus*, *Rymovirus* a *Tritimovirus* (ICTV, 2014).

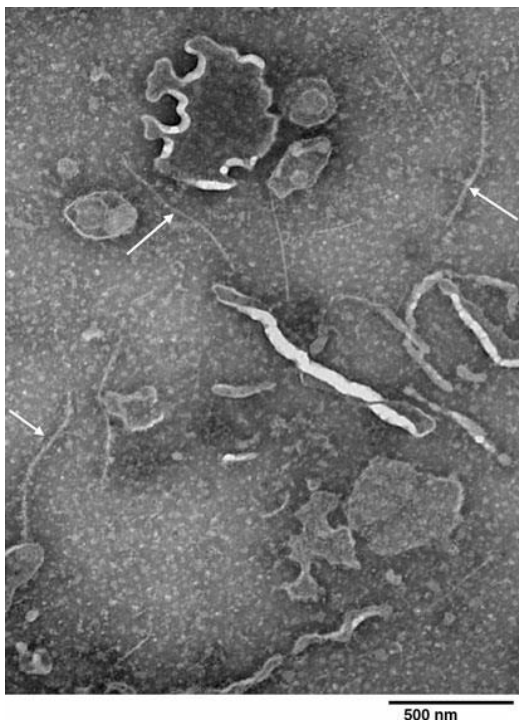
Nejpočetnějším rodem je r. *Potyvirus*, do kterého řadíme celkem 158 druhů virů. Rod *Potyvirus* je pojmenován podle svého typového zástupce *Potato virus Y* (Ward *et Shukla*, 1991). Mezi další významné zástupce, napadající odlišné hostitele, patří například *Plum pox virus* (PPV), *Onion yellow dwarf virus* (OYDV).

3.1.2 Virová částice

Virion zástupců čeledi *Potyviridae* představuje neobalená kapsida vyznačující se helikální symetrií, uvnitř které se nachází molekula ssRNA. Virová částice je vláknité struktury, délka odpovídá 680-900 nm a šířka 12-15 nm. Velikost virionu viru žluté zakrslosti cibule patřící do rodu *Potyvirus* je odhadována na 725-750 nm (Mahmoud *et al.*, 2007; Baghalian *et al.*, 2010, viz fotografie 1).

Molekula RNA odpovídá 5 % hmotnosti virionu, 95 % hmotnosti částice je tvořeno proteiny (ICTVdB Management, 2006).

Fotografie 1: Purifikované virové částice rodu *Potyvirus* (bílé šipky) vizualizované pomocí elektronového mikroskopu (Baghalian *et al.*, 2010).



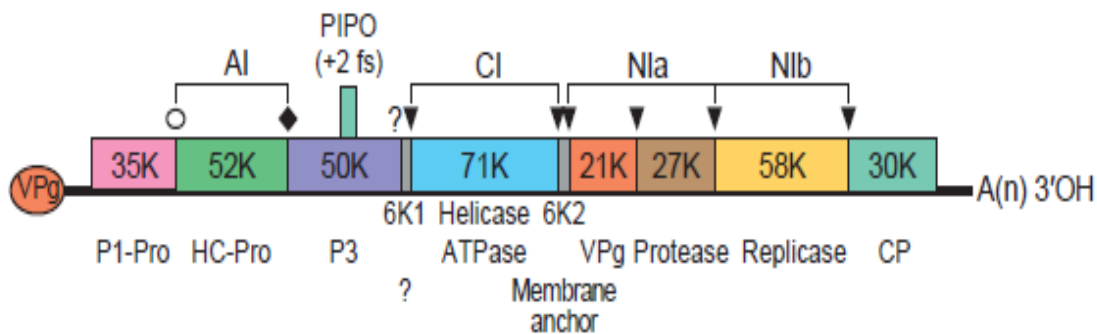
3.1.2.1 Genom

Genetickou informaci čeledi *Potyviriidae* představuje lineární, jednovláknová RNA s pozitivní polaritou (ssRNA) a funkcí messenger RNA (Dougherty *et* Carrington, 1988), na 5' konci má připojen VPg protein namísto čepičky, a na 3' konci poly(A)-sekvenci (ICTVdb Management, 2006). Genom r. *Potyvirus* je tvořen dvěma čtecími rámci (ORF, open reading frame). Dlouhý čtecí rámec kóduje strukturní a nestrukturní proteiny, je přeložen do polyproteinu o velikosti 3 000-3 100 aminokyselin (viz obrázek 1), které jsou následně štěpeny na 10 proteinů (Riechman *et al.*, 1992, King *et al.*, 2012).

Krátký otevřený čtecí rámec, nazývaný také jako PIPO, je vložen do P3 cistronu kódujícího fúzní P3-PIPO protein. Tento ORF je velmi konzervativní (Chung *et al.*, 2008). Zástupci rodu *Potyvirus* mají striktně konzervativní organizaci genomu, i když jeho délka se může lišit. Genomy různých druhů potyvirů jsou průměrně 9,1-10,5 kb dlouhé, variabilita se vyskytuje v délce UTR na 3' konci genomu, největší rozdíly se vyskytují v délce pláštěvého proteinu (CP) a proteinu P1 (Chen *et al.*, 2003).

Gen kódující pláštěvý protein představuje méně než 10 % virového genomu, avšak podobnost v této oblasti je mezi jednotlivými druhy potyvirů významným taxonomickým kritériem (Adams *et al.*, 2005; Gibbs *et al.*, 2010). Dostupnost celých kompletních sekvencí virových izolátů by však mohla poskytnout snadnější klasifikaci těchto virů.

Obrázek 1: Schéma organizace genomu rodu *Potyvirus* (King *et al.*, 2012)



Použité symboly:

?: funkce proteinu 6K1 je zatím nejasná, rovněž proteáza štěpící proteiny P3/6K1

K: kilodaltony (kDa)

○: proteolytické štěpné místo štěpené proteázou P1

◆: proteolytické štěpné místo štěpené protázou HC-Pro

▼: proteolytická štěpná místa štěpená proteázou NIa

(+2 fs): 2. čtecí rámec posunu

membrane anchor: protein 6K2 představuje membránovou kotvu

AI: protein HC-Pro je součástí amorfních inkluzí

3.1.2.2 *Proteiny a jejich funkce*

Polyprotein potyvirů je štěpen směrem od N k C-konci, prvním proteinem je P1 protein, dalšími jsou HC-Pro (Helper Component-Protease), P3 protein, 6K1 protein, CI (Cylindrical Inclusion protein), 6K2 protein, NIa, NIb a CP (Coat Protein) (Riechmann *et al.*, 1992). Významným proteinem potyvirů je i VPg (Viral Protein genome-linked).

P1 protein vykazuje největší variabilitu v délce a sekvenci aminokyselin mezi jednotlivými druhy potyvirů. P1 je charakteristický proteázovou aktivitou, GxSG motiv, který je aktivním místem této serinové proteázy, se u OYDV objevuje v pozici 406-409 aminokyselin. Proteolytická štěpná místa se nachází v rámci motivu GxSG mezi aminokyselinami Y/F-S (Chen *et al.*, 2003; King *et al.*, 2012).

P1 je dále zodpovědný za přenos viru mezi jednotlivými buňkami v rámci rostliny a také mezi rostlinami navzájem (Riechmann *et al.*, 1992). P1 pravděpodobně ovlivňuje rozvinutí symptomů u napadené rostliny (Lee et Wong, 1998; Shi *et al.*, 2007) a může také souviset se vznikem rozdílných symptomů u různých druhů rostlin (Celli *et al.*, 2013).

HC-Pro protein se vyznačuje proteázovou aktivitou, štěpí dipeptid G-G v charakteristickém štěpném místě YxVG/G u zástupců rodu *Potyvirus* (konkrétně u viru OYDV se jedná o YNVG/G). HC-Pro má u různých potyvirů podobnou délku sekvence, tato oblast zahrnuje dva motivy CCC (u OYDV v pozici 752-754 aminokyselina) a PTK (u OYDV v pozici 770-772 aminokyselina) související s přenosem viru pomocí mšic. Obsahuje také motiv GYCY, který je štěpen cysteinovou proteázou a nachází se v pozici 802-805 aminokyselina (Chen *et al.*, 2003). HC-Pro má význam v přenosu viru hmyzem (Carrington *et al.*, 1989; King *et al.*, 2012). Jedná se především o mšice, kdy HC-Pro zajišťuje kumulaci viru v jejich bodavě sacím ústním ústrojí, pomocí něhož mšice přenáší virus na další rostliny (Berger et Pirone, 1986).

Funkce P3 proteinu není moc dobře známá. P3 může být pravděpodobně zapojen do replikace RNA a souvisí také s rozvinutím symptomů u infikovaných rostlin (Rodriguez-Cezero *et al.*, 1993; Langenberg et Zang, 1997; King *et al.*, 2012). P3 má v rámci zástupců čeledi *Potyviriidae* nejdelší aminokyselinovou sekvenci u viru OYDV. (Chen *et al.*, 2003).

Funkce malého proteinu 6K1 je doposud nejasná, pravděpodobně hraje roli při šíření viru z buňky do buňky (Hong *et al.*, 2007; King *et al.*, 2012).

CI protein je součástí cytoplazmatických inkluzí (Edwardson, 1974; King *et al.*, 2012), může být zapojen do transportu viru z buňky do buňky pomocí plazmodezmat (Lawson *et al.*, 1971). CI se vyznačuje helikázovou aktivitou (Gorbalenya *et al.*, 1988, King *et al.*, 2012) a ATP-ázovou aktivitou, je schopen rozvolnit RNA duplex (Lain *et al.*, 1990).

6K2 je malým transmembránovým proteinem, který hraje významnou roli v RNA replikaci, kdy ukotvuje replikační komplex k endoplazmatickému retikulu (Riechmann *et al.*, 1992; King *et al.*, 2012).

VPg protein, který je připojen k 5' konci genomu, má význam při RNA replikaci a translaci, interaguje s eIF4E translačním iniciačním faktorem. Je také zapojen do procesu RNA interference (Riechmann *et al.*, 1992; King *et al.*, 2012).

NIa je hlavní proteázou štěpící polyprotein potyvirů v 6 štěpných místech (značeny A-F), která jsou definována aminokyselinami Q/E-(S/G/A). Tato proteáza byla nalezena v jaderných inkluzích, je zapojena do RNA replikace (Riechmann *et al.*, 1992, King *et al.*, 2012).

NIb je RNA dependentní RNA polymeráza, která byla nalezena v jaderných inkluzích, hraje také důležitou roli při RNA replikaci (Riechmann *et al.*, 1992, King *et al.*, 2012).

Plášťový protein (CP) je zodpovědný za sbalení virové RNA do kapsidy, pomáhá rozvinutí symptomů a šíření viru v rostlině, jeho součástí je konzervovaný DAG motiv související s přenosem viru pomocí mšic (Maiss *et al.*, 1989; Shukla *et al.*, 1989; King *et al.*, 2012). CP je nejrozsáhleji charakterizovaným genovým produktem potyvirů, kromě využití v taxonomii je používán také v diagnostice a při studiu evoluce (Ward *et al.*, 1991).

N-konec polyproteinu je v rámci čeledi *Potyviridae* velmi variabilní částí, konzervovaná je pouze oblast C-konce u této čeledi, čehož lze využít k taxonomii jednotlivých druhů virů.

3.2 Charakteristika zástupců rodu *Potyvirus* infikujících česnek a cibuli

3.2.1 Význam OYDV a LYSV

OYDV a LYSV jsou typickými zástupci rodu *Potyvirus* infikující r. *Allium*, byly vůbec prvními identifikovanými a popsány viry napadající česnek (Bos, 1976, 1981). OYDV je hlavním virem infikujícím rod *Allium*, druhým nejvýznamnějším je virus LYSV

působící často ve směsné infekci spolu s virem OYDV (Lot *et al.*, 1998). Infekce komplexem dvou a více virů česneku je problémem, neboť dochází k zesílení symptomů u napadených rostlin. Je také obtížné od sebe separovat viry působící ve směsné infekci, jelikož mají vyhrazenou hostitelskou specifitu. Tento problém se týká virů infikujících plodiny množící se vegetativně, jakými jsou česnek a šalotka (Van Dijk 1993a, Tsuneyoshi *et al.*, 1997).

Van Dijk (1993a) rozlišil na základě rozdílné hostitelské specifity a sérologie čtyři potyviry infikující zástupce rodu *Allium*, jednalo se o již známé viry OYDV, LYSV a nově objevené SYSV (*Shallot yellow stripe virus*) a WoYSV (*Welsh onion yellow stripe virus*).

Fylogenetickou analýzou aminokyselinové sekvence polyproteinu bylo zjištěno, že je virus OYDV vzdáleně příbuzný k *Pea seed-borne mosaic virus* (obsahuje 45 % identických aminokyselin) a také k virům napadajícím trávy a obilniny (Chen *et al.*, 2003).

3.2.2 Struktura genomu OYDV

Struktura genomu viru OYDV, typického zástupce rodu *Potyvirus*, odpovídá obecné struktuře genomu potyvirů. Izoláty OYDV původem z česneku a cibule mají podobnou délku sekvence, jedná se přibližně o 10,5 kb. Tyto izoláty také reagují stejně proti protilátkám proti OYDV z cibule a vykazují vysokou podobnost v sekvenci genu kódující plášťový protein, jsou proto považovány za stejný druh (Chen *et al.*, 2001).

Kompletní nukleotidová sekvence viru OYDV byla poprvé určena v roce 2003, jedná se o izolát Yuhang z česneku pocházejícího z Číny (provincie Zhejiang). Genom je dlouhý 10 538 nukleotidů a kóduje hlavní polyprotein složený z 3 403 aminokyselin, o molekulární hmotnosti 385,1 kDa (Chen *et al.*, 2003).

Další dvě kompletní nukleotidové sekvence izolátů viru OYDV původem z česneku byly zjištěny v Japonsku (Takaki *et al.*, 2006). Genom běžně se vyskytujícího izolátu OYDV (G5h) má velikost 10 459 nukleotidů a kóduje 3 403 aminokyselin, izolát OYDV vyvolávající slabé příznaky infekce (G79) má genom o velikosti 10 183 nukleotidů, jenž kóduje 3 311 aminokyselin. Rozdíly v sekvenci nukleotidů i aminokyselin mezi izoláty G5h a G79 odpovídají 7 %, přičemž izolát G79 má kratší nukleotidovou sekvenci, nese totiž delecii v oblasti kódující HC-Pro. Tato delecce má za následek snížení intenzity infekce u infikované rostliny. Česnek, který volně roste na polích, může být přitom infikován oběma formami těchto izolátů OYDV (Takaki *et al.*, 2006).

První kompletní nukleotidová sekvence viru OYDV původem z cibule byla zjištěna u dvou izolátů v Argentině (Celli *et al.*, 2013). Genom je dlouhý 10 459 a 10 461 nukleotidů

bez poly(A)-sekvence, izoláty vykazují 92,2% podobnost. Čtecí rámec obou izolátů má velikost 10 143 nukleotidů, genom kóduje hlavní polyprotein o velikosti 3 381 aminokyselin. Izolát OYDV pocházející z Německa vykazuje mírné příznaky infekce (OYDV-Mi), druhý izolát původem z Argentiny má za následek závažnou formu infekce (OYDV-Se) (Celli *et al.*, 2013).

U izolátu Yuhang byl objeven rozdíl v délce aminokyselinové sekvence P3 proteinu (obsahující 530 AK), než jak je tomu v případě jiných druhů potyvírů, u kterých má P3 obvykle délku 344-378 AK. Bylo potvrzeno, že se tato sekvence na N-konci polyproteinu nevyskytuje v žádné jiné části genomu a neshoduje také s žádnými sekvencemi v databázi. Otestováním dalších izolátů OYDV z česneku z Číny byla u 4 z nich potvrzena přítomnost totožné sekvence (Chen *et al.*, 2003).

U izolátu G79 byla zjištěna mezi 1 521 a 1 797 nukleotidy delece o délce 276 nukleotidů (odpovídající 92 aminokyselinám), jedná se o část genomu kódující protein HC-Pro. Tato delece byla objevena i u dalších izolátů OYDV pocházejících z česneku. Mutace byly obecně rozptýleny po celém genomu, C-konec polyproteinu zahrnující proteiny NIa, NIb a CP byl vysoce konzervativní. Bylo potvrzeno, že delece v oblasti genomu kódující protein HC-Pro na N-konci polyproteinu, jenž souvisí s přenosem viru mšicemi, snižovala symptomy u napadených rostlin. Následně byly porovnány oblasti kódující jednotlivé proteiny a také sekvence proteinů mezi 3 izoláty OYDV (G79, G5h a Yuhang). Izoláty G5h a Yuhang obsahovaly neporušenou oblast nukleotidů kódující HC-Pro na rozdíl od izolátu G79, v rámci všech 3 izolátů OYDV tak gen pro HC-Pro vykazoval největší variabilitu (pouze 80,4 % identických nukleotidů a 82,9% podobnost odpovídajících aminokyselin). U genu kódujícího protein P1 byla mezi izoláty podobnost pouze 81,7 % nukleotidů a 76,4 % odpovídajících aminokyselin. Nejvíce konzervativní byl gen pro 6K1 (100 %), rovněž proteolytická místa polyproteinu byla u všech izolátů identická. Jelikož je virus OYDV přenášen v případě česneku pomocí vegetativního rozmnožování, delece v oblasti kódující HC-Pro související s přenosem viru pomocí mšic, tak neohroží infekčnost viru OYDV u této plodiny (Takaki *et al.*, 2006).

U izolátů OYDV-Mi a OYDV-Se pocházejících z cibule byl objeven rozdíl v proteolytickém místě štěpícím proteiny 6K1/CI, jedná se o motiv VQYQ/A u izolátu OYDV-Mi a motiv VHYQ/A u izolátu OYDV-Se. Další 8 z 9 proteolytických štěpných míst polyproteinu se již u obou izolátů shodovalo. Polyprotein obou izolátů vykazoval 94,5% identitu v sekvenci aminokyselin, byl typicky štěpen na 10 proteinů. Jednotlivé proteiny obou izolátů OYDV také vykazovaly stejnou molekulovou hmotnost. Plášťový protein vykazoval

největší shodu v sekvenci aminokyselin mezi oběma izoláty, a to 97,7 %, P1 protein byl zase nejvíce variabilní (80,8 % aminokyselin bylo identických). V sekvenci plášťového proteinu bylo mezi oběma izoláty OYDV objeveno 6 rozdílných aminokyselin, z nichž se 4 vyskytovaly na C-konci polyproteinu. Dále bylo v sekvenci P1 proteinu objeveno 84 rozdílných aminokyselin, které mají za následek 45 % všech změn v aminokyselinové sekvenci v rámci celého polyproteinu mezi oběma izoláty OYDV (Celli *et al.*, 2013).

3.2.3 Biologické vlastnosti OYDV a LYSV

3.2.3.1 Příznaky infekce

Typickými příznaky infekce virem OYDV jsou žluté pruhy, chlorotické a nekrotické léze na listech, žluté skvrny u báze listů, dále zvrásnění, deformace a uvadání celých rostlin (Van Dijk, 1993a; Mahmoud *et al.*, 2007). U česneků se OYDV projevuje především mírnými chlorotickými až jasně žlutými pruhy na listech, rozvinutí symptomů ale závisí na daném virovém izolátu a kultivaru česneku, objevuje se také redukce růstu (Arya *et al.*, 2006).

Infekce OYDV snižuje produkci semen cibule, na infikovaných listech cibule se objevují nepravidelné žluté pruhy přecházející až k celkovému zežloutnutí, doprovázené zploštěním, stáčením listů a následným zakrněním celé rostliny. Následkem toho dochází ke zhoršení vzhledu cibulí při skladování, které mohou začít také předčasně pučet (Arya *et al.*, 2006).

Infekce zástupců rodu *Allium* dalšími viry může tyto příznaky ještě zhoršit, jedná se např. o LYSV, carlaviry (GarCLV a SLV) a allexiviry. LYSV způsobuje mírnější symptomy oproti OYDV, míra závažnosti infekce viry OYDV a LYSV se stupňuje s dobou od propuknutí infekce, rozvinutí symptomů závisí na daném měsíci v průběhu roku (Lot *et al.*, 1998). Carlaviry nevyvolávají žádné závažné příznaky infekce, jestliže se na rostlině vyskytují samostatně (Van Dijk, 1993b).

V mezofylu listů infikovaných rostlin byly objeveny cytoplazmatické cylindrické inkluze, potvrzující zařazení viru OYDV do rodu *Potyvirus* podle Edwardsonovy klasifikace (Edwardson, 1974; Riechmann *et al.*, 1992). Koncentrace viru v rostlinné tkáni pozitivně koreluje s vizuální detekcí intenzity choroby, avšak negativně s výškou rostliny, hmotností cibulí a stroužků (Bagi *et al.*, 2012).

3.2.3.2 Ekonomický význam

Viry OYDV a LYSV způsobují značný úbytek ve výnosech česneku a cibule po celém světě, OYDV se však vyskytuje častěji než LYSV a způsobuje největší ztráty (Lot *et al.*, 1998; Mahmoud *et al.*, 2007). Odhaduje se, že infekce způsobuje úbytek ve výnosech v rozsahu 25-50 % a až 88% ztráty na váze cibulí (Walkey *et Antill*, 1989; Canavelli *et al.*, 1998, Lot *et al.*, 1998). Virová infekce má za následek také nižší kvalitu stroužků (Chen *et al.*, 2003). Dále bylo prokázáno, že u rostlin česneku vypěstovaných z infikovaných stroužků dochází k větším ztrátám v porovnání s rostlinami původem ze zdravých stroužků, které jsou dodatečně mechanicky inokulovány virem (Lot *et al.*, 1998).

OYDV způsobuje chorobu označovanou jako „mozaikovitost“ u zástupců rodu *Allium* společně ještě s dalšími druhy virů. Směsná infekce viry OYDV a LYSV výrazně zvyšuje rozvinutí symptomů, objevuje se redukce růstu, hmotnosti a poměru hmoty cibulí (Lot *et al.*, 1998; Bagi *et al.*, 2012). OYDV může napadat cibule i česneky také ve směsné infekci s allexiviry. Ve výnosech česneku byly zjištěny značné ztráty způsobené allexiviry, odpovídající 14-32 % (Cafrune *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2010).

3.2.3.3 Okruh hostitelů

Virus OYDV má omezenou hostitelskou specifitu, přirozeně infikuje pouze rostliny čeledi *Alliaceae*. OYDV je významným patogenem cibule a česneku (Arya *et al.*, 2006), původně byl detekován u cibule kychyňské (*Allium cepa* L.), kdy se projevoval svými typickými symptomy (Bos, 1976), dnes je ale za jeho nejvýznamnějšího hostitele pokládán česnek (*Allium sativum* L.). OYDV se také běžně vyskytuje u cibule šalotky (*Allium cepa* var. *aggregatum*) a dalších druhů cibulí, tj. *Allium cepa* var. *perutile*, *Allium cepa* var. *viviparum* a u česneku ořešec (*Allium scorodoprasum* L.) (Van Dijk, 1993a).

Výskyt LYSV byl potvrzen u vegetativně se množící cibule perlovky (*Allium ampeloprasum* var. *sectivum*) a u póru (*Allium ampeloprasum* var. *porrum*). OYDV a LYSV byly detekovány rovněž u druhů *Allium longicuspis* (planě rostoucí česnek) a *Allium ampeloprasum* var. *holmense* (Van Dijk, 1993a). OYDV není mechanicky přenosný na pór a také na zástupce čeledí *Solanaceae*, *Cucurbitaceae* a *Leguminaceae* (Mahmoud *et al.*, 2007).

3.2.3.4 Přenos viru

Virus OYDV je přenášen při vegetativním rozmnožování česneku pomocí stroužků, ve kterých se kumuluje (Chen *et al.*, 2003). Také carlaviry, působící ve směsné infekci s virem OYDV, jsou šířeny na další rostliny tímto způsobem (Dovas *et al.*, 2001). Virus není naopak přenosný prostřednictvím semen, což je výhodou u cibulí a považujeme to za její přirozenou ochranu před virem (Dovas *et al.*, 2001). Infikované cibule však mohou sloužit jako rezervoár virů napadajících další zástupce rodu *Allium* (Kumar *et al.*, 2010).

Šíření virů a s nimi spojených chorob podporují například zemědělci v Srbsku, kteří využívají část své úrody jako sadbový materiál na další rok (Gvozdanović-Varga *et al.*, 2009). U rostlin vypěstovaných z bezvirózních semen dovezených z jiných zemí dochází po určité době k propuknutí infekce, jelikož přichází do styku s již infikovanými rostlinami. Pro udržení zdravého rostlinného materiálu je tak doporučeno množit cibule pomocí semen (Kumar *et al.*, 2010).

OYDV je jako typický zástupce rodu *Potyvirus* přenášen mšicemi neperzistentním způsobem. Mšice broskvoňová (*Myzus persicae* Sulzer), mšice vojtěšková (*Aphis craccivora* Koch), mšice bavlníková (*Aphis gossypii* Glover) a kyjatka hrachová (*Acyrtosiphon pisum* Harris) jsou nejúčinnějšími vektory při přenosu virů OYDV a LYSV. U *M. persicae* byl zaznamenán přenos OYDV z česneku na česnek s největší účinností, a to až 66,7 %, u LYSV se jednalo až o 63,6 %. Bylo však zjištěno, že bezkřídlé formy mšic jsou mnohem účinnější při přenosu těchto virů (Abd El-Wahab, 2009). Ačkoliv jsou křídlaté mšice méně účinné během přenosu viru, hrají však důležitou roli v jeho šíření na další rostliny. Dříve bylo potvrzeno, že je OYDV z česneku na cibuli přenosný prostřednictvím *M. persicae* velmi málo (Bos *et al.*, 1978), což souhlasí s poznatky Abd El-Wahab (2009).

I když jsou některé potyviry přenosné i vlnovníky a mollicemi, přenos mollicemi u OYDV nebyl popsán (Riechmann *et al.*, 1992). Bylo ale potvrzeno, že je OYDV ve směsné infekci s alexiviry přenášen pomocí mšic a vlnovníků (Kumar *et al.*, 2010).

3.2.3.5 Geografické rozšíření

Virus OYDV je celosvětově rozšířen, OYDV a LYSV byly spolu s carlaviry detekovány na česneku pocházejícím z mnoha zemí (Klukáčková *et al.*, 2007). Výskyt OYDV a LYSV byl potvrzen v Řecku (Dovas *et al.*, 2001), Itálii (Dovas *et Vovlas*, 2003), Brazílii (Daniels, 1999; Fajardo *et al.*, 2001) a Japonsku (Takaichi *et al.*, 1998, 2001), Conci *et al.* (2002) studovali LYSV v Argentině.

Přítomnost OYDV spolu s LYSV, GarCLV a alexiviry byla testována u česneku pocházejícího ze 4 oblastí Brazílie, které pokrývají 76 % pěstitelské plochy této plodiny. Směsná infekce byla detekována u 22 % testovaných rostlin, potyviry byly zjištěny ve všech testovaných oblastech, přičemž výskyt LYSV převládal nad OYDV. GarCLV z rodu *Carlavirus* byl však rozšířen nejméně (Fayad-André *et al.*, 2011).

V Srbsku byl OYDV identifikován u 30,5 % testovaných rostlin česneku, LYSV nebyl potvrzen v žádném vzorku (Bagi *et al.*, 2012).

V Polsku byla u 4 kultivarů česneku pocházejících z různých regionů zjištěna přítomnost OYDV u 20,7 % testovaných rostlin. Virus GarCLV se však vyskytoval nejčastěji, a to v 86,2 % případech, následovaný SLV v 79,3 % vzorcích (Chodorska *et al.*, 2014). U okrasných druhů rodu *Allium* nebyla v Polsku detekována přítomnost virů OYDV, LYSV ani GarCLV, avšak u česneku pěstovaného běžně na polích byla zjištěna přítomnost viru OYDV u 75 % testovaných rostlin, LYSV byl detekován ve 32,1 % vzorcích, GarCLV byl ale potvrzen nejčastěji (88,2 %) (Winiarczyk *et al.*, 2014).

V Izraeli byla u volně rostoucího česneku zaznamenána přítomnost viru OYDV ve směsné infekci spolu s LYSV, GarCLV a alexiviry (Shibolet *et al.*, 2001).

U česneků pocházejících z různých částí Indie byly ve směsné infekci spolu s OYDV identifikovány také viry SLV, GarCLV a alexiviry. OYDV a alexiviry byly potvrzeny u všech testovaných česneků, zatímco SLV a GarCLV pouze v několika částech Indie (Majumder *et Baranwal*, 2014).

V České republice poprvé popsal výskyt skvrn na listech česneku, způsobených virovou infekcí, Novák v roce 1959. V současnosti byl v rámci analýzy českého množitelského materiálu pěti odrůd česneku detekován 75,4% výskyt OYDV, byl však zjištěn vyšší výskyt carlavirů (GarCLV, SLV) ve srovnání s OYDV, infekce virem LYSV byla zaznamenána nejméně (Klukáčková *et al.*, 2007).

Přítomnost OYDV byla potvrzena také v Egyptě, největší přirozený výskyt virové infekce (70,6 %) byl zjištěn u cibule, následované česnekem (61,0 %) (Abd El-Wahab *et al.*, 2009).

V Turecku byla u rostlin cibule kromě virů OYDV a LYSV testována přítomnost také IYSV (*Iris yellow spot virus*), SLV a GarCLV. Infekce byla zjištěna u 17,16 % testovaných rostlin, nejrozsáhlejší infekce byla způsobena virem OYDV (12,33 %), následovaným LYSV (3,60 %). Pouze 1,19 % rostlin bylo infikováno virem SLV, avšak u žádných nebyl potvrzen výskyt GarCLV a IYSV (Sevik *et Akcura*, 2013).

3.3 Hostitelská specifita potyvirů

Rostliny a s nimi spojené patogeny se společně vyvíjely miliony let. U obou se tak vyvinuly rozmanité geny a jejich produkty, proteiny, sloužící jak k úspěšnému napadení a pomnožení se patogena v hostitelské rostlině, determinanty avirulence, tak obranné mechanismy rostlin vůči nim, představované např. geny rezistence. Rezistence rostliny vůči patogenu je zajištěna rozpoznáním determinantu avirulence patogena pomocí produktů R genů, čímž se spustí obranné mechanismy. Produkt jednoho genu rezistence rostliny tak specificky vnímá jen jeden odpovídající protein, který se poté chová u patogena jako genový produkt avirulence, jenž není schopen vyvolat v hostiteli příslušné onemocnění. (Rouxel *et Balesdent*, 2010).

Proteiny avirulence jsou tak efektoři zapojenými do patogenity, u virů se prakticky všechny proteiny chovají jako determinanty avirulence. Vykazují relativně velkou variabilitu, a tím pomáhají patogenům rychle uniknout před rozpoznáním geny rezistence daného hostitele (Rouxel *et Balesdent*, 2010).

Virová infekce je vlastně formou biotického stresu, na který rostliny reagují změnou genové exprese. Bylo zjištěno, že infekce virem *Pea seed-borne mosaic virus* (PSbMV) inhibuje genovou expresi hostitele (Wang *et Maule*, 1995). Infikované rostliny se poté snaží tyto ztráty kompenzovat zvýšenou tvorbou ribozomů potřebných k syntéze vlastních proteinů. Tento proces nebyl ale doposud objasněn, virus může tyto ribozomy využívat k navýšení kapacity buňky a k následné syntéze dalších virových proteinů (Yang *et al.*, 2007).

HC-Pro se účastní potlačení posttranskripčního umlčování genů (PTGS), což je mechanismus používaný rostlinami v rámci kontroly hladiny RNA v buňkách a slouží také jako obranný mechanismus proti virové infekci (Stenger *et al.*, 2005).

Za determinanty avirulence je obecně považován plášťový protein (CP), RNA polymeráza (především její helikázová doména), proteiny zajišťující pohyb viru v hostiteli („movement proteins“), VPg, CI, P3 protein a NIa proteáza. Poslední studie ukazují, že virový genom sám o sobě může představovat determinant avirulence (Rouxel *et Balesdent*, 2010).

Pro zástupce rodu *Potyvirus* je charakteristická variabilita na 3' oblasti genomu, variabilita genu pro plášťový protein (CP) je základním kritériem pro rozlišení jednotlivých zástupců rodu *Potyvirus* do odpovídajících druhů (Shukla *et al.*, 1991; Ward *et Shukla*, 1991).

Analýza genetické variability genu pro plášťový protein umožnila rozlišení atypických izolátů OYDV z různých hostitelských rostlin *Allium wakegi*, *A. fistulosum* a *A. chinense*. Tsuneyoshi *et al.* (1997) studovali izoláty OYDV z *Allium wakegi*, které vykazovaly 73,5-76% identitu s jinými známými izoláty OYDV a zároveň méně než 60% identitu

s LYSV izoláty izolovanými z česneku a póru. Na základě vysoké identity s dalšími izoláty z Japonska je tedy možné usuzovat, že před dlouhou dobou proběhla invaze kmenu OYDV, jenž se postupně rozšířil na japonské rostliny rodu *Allium*. Tyto japonské izoláty OYDV jsou považovány za blízce příbuzné k virům WoYSV a SYSV, a to na základě rozdílné sérologie a hostitelské specifity v porovnání s jinými izoláty OYDV. O rok později byl pro viry patřící do skupiny „wakegi type“ navržen název *Wakegi yellow dwarf virus* (WYDV) (Tsuneyoshi *et al.*, 1998).

Přirozeným zdrojem genetické variability RNA virů a také změn hostitelské specifity jsou rekombinace, což bylo demonstrováno např. u *Bean yellow mosaic virus* (BYMV) z rodu *Potyvirus*. Virus BYMV se vyznačuje širokým okruhem hostitelů, zahrnujícím jednoděložné i dvouděložné rostliny. Právě rekombinace pravděpodobně hrála roli ve specializaci hostitelů BYMV a je tak zodpovědná za rozšíření přirozené hostitelské specifity daného viru. Skupina izolátů BYMV, u kterých byla rekombinace zaznamenána nejvíce, rozšířila svůj okruh hostitelů na již zmíněné jednoděložné i dvouděložné rostliny (Kehoe *et al.*, 2014). U testované skupiny, která zahrnovala izoláty BYMV s úzkým okruhem hostitelů, byla také zjištěna rekombinace, která by mohla po nějaké době způsobit rozšíření viru i na další hostitele. Rekombinace byly potvrzeny u genomových oblastí P3, PIPO, CI a VPg, které souvisejí především s patogenitou viru, avšak rovněž u genů kódujících P1, HC-Pro, 6K1, 6K2, NIa, NIb a CP (Kehoe *et al.*, 2014).

Potyviry mají obecně omezený okruh hostitelů (Hollings *et Brunt*, 1981), i když se u různých druhů může výrazně lišit. Některé jako např. *Tobacco etch virus*, (TEV) infikují pouze limitovaný počet rostlinných druhů, zatímco jiné, např. *Watermelon mosaic virus*, (WMV) infikují širokou škálu rostlinných druhů (Shukla *et al.*, 1994).

Daná situace souvisí i se skutečností, že potyviry nekódují jeden vyhrazený protein zodpovědný za šíření viru, ale že se na něm účastní několik proteinů, zejména se jedná o HC-Pro, CI, VPg a CP. Tyto proteiny jsou také spojovány se schopností viru překonat rezistenci hostitele (Johansen *et al.*, 2001).

U potyvirů bylo opakovaně prokázáno, že změny v genu pro plášťový protein vedou ke změnám hostitelské specifity. N-konec plášťového proteinu *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) byl nahrazen jiným N-koncem plášťového proteinu odlišného potyviru se stejným, ale širším okruhem hostitelů (*Watermelon mosaic virus*, WMV) a také s rozdílným okruhem hostitelů (*Tobacco etch virus*, TEV). Upravený ZYMV způsoboval u tykvovitých, běžně infikovaných virem ZYMV, velmi silné počáteční symptomy. Po 6 týdnech od inokulace virem ZYMV s N-koncem plášťového proteinu viru TEV, ale začaly u infikovaných cuket

a okurek mizet symptomy u mladých listů, koncentrace viru v rostlině byla rovněž nižší, navíc se u napadených rostlin objevila specifická obrana proti sekundární infekci. Upravené viry tak nepřekonalily přirozeně se vyskytující rezistenci okurek k ZYMV, ani nerozšířily okruh hostitelů na druhy běžně infikované viry TEV a WMV. Navzdory značné variabilitě v délce a sekvenci plášťového proteinu různých potyvírů usnadnil tento CP protein systémovou infekci tykvovitých běžně infikovaných virem ZYMV, nedošlo ale k infekci dalších hostitelů, kteří nejsou charakterističtí pro tento virus. Bylo tak potvrzeno, že je N-konec plášťového proteinu důležitý pro infekčnost viru a přizpůsobení se viru k jeho hostiteli (Ullah *et al.*, 2003).

Delece N- a C-konce *Tobacco etch virus* (TEV) zabránila pohybu viru uvnitř floému na dlouhé vzdálenosti (Dolja *et al.*, 1994; 1995), záměna aminokyseliny na N-konci plášťového proteinu *Tobacco vein mottling virus* (TVMV) zrušila schopnost viru způsobit systémovou infekci, neměla ale vliv na replikaci a přítomnost virionu v protoplastu (Lopez-Moya *et Pirone*, 1998).

Záměna jedné aminokyseliny v plášťovém proteinu *Pea seed borne mosaic virus* (PSbMV) vedla k systémové infekci způsobující lokální léze u svého typického hostitele, *Chenopodium quinoa*, virus také interagoval se specifickými komponenty hostitele, které umožnily efektivní pohyb viru na dlouhé vzdálenosti (Andersen *et Johansen*, 1998).

Významnou determinantou avirulence potyvírů je P3 protein (Suehiro, *et al.*, 2004). Bylo prokázáno, že právě variabilita P3 je zodpovědná za odlišnou hostitelskou specifitu *Turnip mosaic virus* (TuMV), a to u izolátu Tu-2R1, který infikuje japonskou ředkev (*Raphanus sativum L.*) a také *Brassica* spp., u brukve zelné (*Brassica oleracea L.*) však způsobuje pouze mírné symptomy infekce a u izolátu Tu-3, který infikuje pouze *Brassica* spp., nikoliv ředkev (Suehiro *et al.*, 2004). P3 protein je také determinantou avirulence u extrémní formy rezistence *Brassica napus*, jedná se o geny TuRB03 a TuRB04 (Jenner *et al.*, 2002).

Oblast P3-6K1 hraje důležitou roli při replikaci viru a při šíření viru z buňky do buňky i u *Pea seed-borne mosaic virus* (PSbMV) (Hjulsager *et al.*, 2006). U *Plum pox virus* (PPV) P3 protein spolu s 6K1 ovlivňuje rozvinutí symptomů v rámci systémové infekce svého hostitele *Pisum sativum* a *Nicotiana clevelandii* (Sáenz *et al.*, 2000), ovlivňuje také infekci u slivoně švestky a broskvoní z rodu *Prunus* (Dallot *et al.*, 2001).

Přizpůsobení se novému hostiteli je ale složitější proces, což bylo ukázáno pomocí dlouhodobého testování hostitelské specifity u *Plum pox virus* (PPV). Populace PPV z broskvoní jsou schopné trvalé adaptace na bylinného hostitele, a to na hrách. S nižší

účinností lze zpětně přenést PPV z hrachu na broskvoně. Po takové adaptaci dochází ke snížení doby do rozvinutí symptomů, zvýšené účinnosti inokulace a také zvýšení koncentrace viru v rostlině. Po adaptaci viru na jiného hostitele byla zaznamenána specifická mutace v NIb genu, která dovolila viru mnohem rychleji se replikovat než v původním hostiteli, objevily se mutace také v dalších částech genomu. Po vyhubení dřevin postižených PPV by ale mohl nastat problém, kdyby se PPV přemístil na jiného hostitele, jenž by poté sloužil jako jeho rezervoár. Je obtížné přenést PPV na jiného hostitele, ale jakmile je nový hostitel infikován, každý další přenos na stejného hostitele bude již snadný, protože se virus na něj adaptuje (Wallis *et al.*, 2007).

HC-Pro může být rovněž faktorem pro řízení hostitelské specifity u PPV, což potvrdili Sáenz *et al.* (2000). Zhotovením hybridních virů, u kterých byl nahrazen gen kódující CP u viru PPV odpovídajícím genem z *Zucchini yellow mosaic virus*, bylo zjištěno, že CP nemá žádný vliv na hostitelskou specifitu (Tóbiás *et al.*, 2001).

3.3.1 Genetická variabilita a hostitelská specifita OYDV

Odlišná hostitelská specifita je studována i u izolátů OYDV pocházejících z cibule a česneku. Nově popsané izoláty, OYDV-Se a OYDV-Mi pocházející z cibule, vykazují podobnost v nukleotidové sekvenci CP s izoláty OYDV z česneku dostupnými v GenBank pouze max. 70,7 %, což je hodnota nižší, než je kritérium pro zařazení do druhu. King *et al.* (2012) udávají, že podobnost v sekvenci aminokyselin plášťového proteinu musí být nad 80 % a podobnost v sekvenci nukleotidů nad 76 % v rámci genu kódujícího plášťový protein a rovněž v rámci celého genomu.

Porovnáním sekvence nukleotidů mezi izoláty OYDV z cibule a česneku bylo zjištěno, že pouze gen kódující plášťový protein a 3'UTR oblast měly vyšší procentuální shodu nukleotidů, než jaká je navrhovaná minimální hodnota. Nicméně nukleotidové sekvence kódující kompletní polyprotein (především oblasti genomu kódující proteiny P1, HC-Pro, P3, VPg, NIa, CI) vykazovaly nižší podobnost než u jiných izolátů stejného druhu. Gen kódující CI mezi izoláty OYDV z česneku a cibule vykazoval menší procentuální podobnost, avšak gen kódující NIb vykazoval podobnost vyšší (Celli *et al.*, 2013).

Byly objeveny rozdíly i mezi proteolytickými štěpnými místy u izolátů OYDV z cibule a česneku. Pouze 3 proteolytická štěpná místa se u izolátu OYDV-Se z cibule se shodují s izolátem z česneku, u izolátu OYDV-Mi se jedná o shodu 4 štěpných míst. Také

GxSG motiv lokalizovaný uvnitř P1 proteinu byl u izolátu OYDV z cibule nalezen na jiné pozici v sekvenci aminokyselin než u izolátu z česneku.

Vysoká identita v sekvenci aminokyselin plášťového proteinu mezi izoláty OYDV z česneku a cibule byla doposud dostačující k zařazení těchto izolátů do stejného druhu, avšak znalost kompletní sekvence izolátů z česneku a cibule by s větší jistotou dovolila virus OYDV považovat za stejný druh. Celli *et al.*, (2013) proto navrhli, aby se pouze virový izolát z cibule nazýval OYDV, avšak izolát z česneku by měl být pojmenován jako „*garlic common stripe virus*“ (GaCSV).

Ačkoliv izoláty OYDV pocházející z cibule vykazují vysoký stupeň podobnosti v genomové sekvenci, objevují se značné rozdíly v projevu symptomů. Není tedy doposud jasné, zda genetické rozdíly mezi dvěma izoláty pocházejícími z cibule mohou být spojovány s jejich geografickým původem a biologickými vlastnostmi, především agresivitou (Celli *et al.*, 2013).

Izolát OYDV-Se (způsobující závažnou formu infekce) získaný z cibule byl přenesen na rostliny cibule s 95% úspěšností, avšak OYDV-Mi (způsobující mírnou formu infekce) taktéž původem z cibule byl přenesen pouze s 11% úspěšností. Tyto izoláty se lišily pouze v agresivitě a virulenci vůči napadené rostlině, nikoliv v hostitelské specifitě, nepodařilo se je mechanicky přenést na česnek, pažitku a pórek, což potvrdilo teorii, že izolát OYDV pocházející z cibule infikuje pouze cibuli a izolát česneku infikuje pouze česnek (Van Dijk, 1993a; Conci *et al.*, 1999; Celli *et al.*, 2013). Je obecně známo, že je OYDV z česneku obtížně přenosný na cibuli, avšak z cibule na cibuli je přenosný snadno (Mahmoud *et al.*, 2007).

Rozdíly v hostitelské specifitě a také v sekvenci aminokyselin mezi izoláty z cibule a česneku poukazují na skutečnost, že by mohly představovat odlišné druhy. Jelikož je OYDV z česneku obtížně přenosný na cibuli, některé zdroje uvádí OYDV pocházející z česneku jako OYDV-G a OYDV z cibule jako OYDV-O (Van Dijk, 1993a, Conci *et al.*, 1999, Mahmoud *et al.*, 2007)

3.4 Detekce OYDV

Pro detekci OYDV jsou využívány metody, které jsou běžné k detekci virů. Bylo potvrzeno, že koncentrace viru je obecně nižší v apikálních částech rostliny a v mladých listech oproti vyzrálejším a starším listům (Mahmoud *et al.*, 2007), viry OYDV a LYSV se

vyskytují ve vyšších koncentracích v posledních dvou plně vyvinutých listech (Dovas *et al.*, 2002).

Detekce OYDV v rostlině je možná hned několika způsoby, vizuální detekce prostřednictvím pozorování příznaků je tím nejrychlejším prostředkem, avšak málo spolehlivým. Často využívanou metodou je sérologická metoda ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay), hojně používanou formou ELISA testu je DAS-ELISA test (Double-antibody sandwich-Enzyme-linked immunosorbent assay) (Clark *et Adams*, 1977). Další možností je po nástupu molekulárních metod využití RT-PCR k detekci RNA-viru v hostiteli.

Detekce OYDV spolu s LYSV je vizuálně snadná, neboť tyto viry vyvolávají typické příznaky, jedná se o charakteristickou světlou žlutozelenou mozaiku na listech (Van Dijk, 1993a; Takaichi *et al.*, 1998). V závislosti na hostiteli a podmínkách prostředí ale nemusí být příznaky infekce vždy zřetelné (Alves *et al.*, 2008; Baghalian *et al.*, 2010), navíc různé viry vyvolávají stejné příznaky, proto není vhodné se spoléhat pouze na vizuální detekci.

Naopak DAS-ELISA test je spolehlivou metodou pro běžnou detekci OYDV, a to díky využití komerčně dostupných protilátek. Protilátky ale nemusí vždy reagovat s každým virovým materiálem, neboť viry jsou velmi variabilní, což je nevýhodou této metody. Dochází tak k nechtěným křížovým reakcím, které mají za následek interpretaci nesprávných výsledků (Conci *et al.*, 1999). Klasifikace virů je proto velmi obtížná často kvůli nevhodným antisérům, nízké citlivosti této metody a nedostatku rostlin infikovaných pouze jedním, snadno identifikovatelným virem (Shiboleth *et al.*, 2001).

Sérologické metody mohou být tedy využity spíše pro detekci potyvírů, nejsou ale vhodné k taxonomii (Shukla *et Ward*, 1988), především kvůli variabilitě plášťového proteinu na N-konci polyproteinu u potyvírů a s tím spojenou obtížnou produkcí specifických protilátek proti OYDV.

RT-PCR je citlivou a spolehlivou technikou pro testování přítomnosti OYDV (Arya *et al.*, 2006), výhodou je v tomto případě detekce konkrétního viru, možnou variantou je také duplex či multiplex RT-PCR používaná pro identifikaci více virů ve směsné infekci najednou. Pomocí duplex RT-PCR byl poprvé identifikován u cibulí pocházejících z Indie současně virus OYDV a allelixiviry (Kumar *et al.*, 2010). OYDV spolu s SLV (z rodu *Carlavirus*) byly detekovány v listech a stroužcích česneků pocházejících z Indie rovněž pomocí duplex RT-PCR (Majumder *et al.*, 2008).

Detekce potyvírů je prováděna především na základě analýzy genu pro plášťový protein na 3' konci genomu, DAG motiv související s přenosem viru pomocí mšic, který je

přítomen blízko tohoto genu, je také důležitým znakem charakteristickým pro potyviry (Riechmann *et al.*, 1992; Arya *et al.*, 2006). Bylo potvrzeno, že substituce několika aminokyselin v sekvenci plášťového proteinu může změnit biologické vlastnosti viru, například jeho antigenní vlastnosti, proto jsou aminokyseliny plášťového proteinu užitečným markerem pro klasifikaci různých izolátů OYDV (Baghalian *et al.*, 2010).

4 Materiál a metody

4.1 Rostlinný materiál

Infikované rostliny česneku a cibule byly pěstovány ve skleníku, v pěstebním substrátu perlit, v květináčích o průměru 9 cm a to v měsících duben-květen a září-říjen. Stejně podmínky byly použity i při přenosových experimentech. Pro experimenty byl zvolen kultivar česneku 1172 získaný ze sbírky genových zdrojů VÚRV, Olomouc, u kterého byla detekována přítomnost jen OYDV, další viry komplexu virů česneku nebyly přítomny.

Pro srovnání molekulárně biologické variability byly analýzy doplněny dvěma vzorky dříve testovaných izolátů OYDV původem z cibule, Křivský a Puchala. Tento biologický materiál (vzorky listů a izolovaná RNA) byl dlouhodobě skladován při teplotě -80 °C. Izoláty virů byly získány z hostitelských rostlin česneku a cibule původem z České republiky.

4.2 DAS-ELISA

Detekce přítomnosti viru byla provedena pomocí DAS-ELISA testu. Byly použity protilátky Onion Yellow Dwarf Virus IgG, Onion yellow dwarf virus IgG Conjugated w/AP (BIOREBA, Switzerland); Garlic Common Latent Virus IgG, Garlic Common Latent Virus IgG Conjugated w/AP (BIOREBA, Switzerland); Leek Yellow Stripe Virus IgG, Leek Yellow Stripe Virus IgG Conjugated w/AP (BIOREBA, Switzerland); Shallot Latent Virus IgG, Shallot Latent Virus IgG Conjugated w/AP (BIOREBA, Switzerland), detekce byla provedena podle pokynů výrobce.

V prvním kroku bylo provedeno potažení povrchu jamek ELISA destičky protilátkami anti-OYDV, anti-GarCLV, anti-LYSV a anti-SLV proti testovaným virům. Jednotlivé protilátky byly ředěny v potahovacím pufru (anti-OYDV 500x; anti-GarCLV, anti-LYSV a anti-SLV 1000x), a poté bylo do jamky pipetováno 200 µl roztoku. Destička byla inkubována při 35 °C po dobu 3 hodin (Solo HT Incubator, Thermo Labsystems), pak byla na promývačce třikrát promyta promývacím pufrem (ELx50, BioTek).

Následovala homogenizace vzorků listů testovaných rostlin spolu s extrakčním pufrem pomocí tyčového homogenizéru (ULTRA-TURRAX, JANKE & KUNKEL, IK-Labortechnik) při ředění 1:10, kdy bylo na cca 0,5 g listu použito 5 ml pufru. Do jamky ELISA destičky bylo pipetováno 250 µl vzorku, v každé destičce byla použita pozitivní kontrola (rostlina infikovaná OYDV), negativní kontrola (zdravá rostlina) a extrakční pufr jako tzv. slepá kontrola (blank).

Destička byla překryta fólií a inkubována přes noc v lednici při 4 °C. Následující den byla destička třikrát promyta promývací pufrem a bylo přidáno 200 µl konjugačních protilátek, ředěných v konjugačním pufru podle doporučení výrobce: anti-OYDV 500x; anti-GCLV, anti-LYSV a anti-SLV 1000x. Následovala inkubace při 35 °C po dobu 3 hodin. Poté byla destička jednou promyta promývacím pufrem. Nakonec bylo přidáno 200 µl substrátu (na 7 ml substrátového pufru použito 5,25 mg p-nitrofenylfosfátu) a destička byla inkubována při pokojové teplotě, za tmy. Barevná změna byla stanovena na základě měření absorbance při 405 nm pomocí ELISA readeru (ELx800, BioTek) po 1, 2 a 3 hodinách inkubace.

Složení pufrů použitých při DAS-ELISA testu:

Potahovací pufr (pH 9,6; 1000 ml)

Na ₂ CO ₃ (Lachema)	1,59 g
NaHCO ₃ (Lachema)	2,93 g

PBS pufr (pH 7,4; 1000 ml)

NaCl (Lachema)	8,00 g
KH ₂ PO ₄ (Lachema)	0,20 g
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O (Lachema)	2,90 g
KCl (Lachema)	0,20 g

Extrakční pufr (pH 7,4; 1000 ml)

PBS	1000 ml
PVP K-25 (Serva)	20,00 g
Tween 20 (Sigma)	0,50 ml
Odtučněné sušené mléko (Olma)	10,00 g

Konjugační pufr (pH 7,4; 1000 ml)

PBS	1000 ml
PVP K-25 (Serva)	20,00 g
Odtučněné sušené mléko (Olma)	2,00 g
Tween 20 (Sigma)	0,50 ml

Promývací pufr

1/5 PBS	1000 ml
Tween 20 (Sigma)	0,50 ml

Substrátový pufr (pH 9,8; 1000 ml)

Diethanolamin (Sigma)	97 ml
-----------------------	-------

(upraveno pomocí HCl)

4.3 Mechanická inokulace

Přenos viru byl prováděn pomocí mechanické inokulace rostlin. Pro inokulaci byly použity listy česneku 1172, který vykazoval symptomy infekce studovaným virovým izolátem. 0,5 g listu bylo homogenizováno ve třecí misce spolu s 2,5 ml fosfátového pufru (tj. v poměru 1:5 w/v), 30 mg celitu a 30 mg aktivního uhlí. Inokulum bylo následně houpičkou nanášeno na rostliny cibule cv. Všetana ve stádiu tří listů, vždy na 2 listy dané rostliny (ne však na nejmladší list) a po 5 min opláchnuto vodou. Bylo testováno 12 rostlin, pokus byl nezávisle dvakrát opakován.

Fosfátový pufr (pH 8; 250 ml)

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

4.4 Testování hostitelské specifity

Cílem tohoto biologického pokusu bylo zjistit, zda je izolát OYDV pocházející z česneku 1172 přenosný na cibuli. Po 14 dnech od mechanické inokulace byla úspěšnost inokulace a přítomnost viru OYDV v těchto rostlinách ověřena pomocí DAS-ELISA testu.

4.5 Izolace RNA

Celková RNA byla izolována pomocí Tri-Reagentu (Sigma), podle modifikovaného postupu výrobce. Ve třecí misce umístěné na ledu bylo 0,1 g rostlinného pletiva (infikovaného listu) česneku homogenizováno v 1 ml Tri-Reagentu. Následně byl obsah misky (homogenát) přemístěn do zkumavky a ponechán 5 min při pokojové teplotě. Poté bylo přidáno 0,2 ml chloroformu, zkumavka byla intenzivně protřepávána po dobu cca 15 s

a ponechána 15 min při pokojové teplotě. Následně byla zkumavka centrifugována 15 min při 12 000 g a 4 °C (centrifuga UNIVERSAL 32, Schoeller instruments, Hettich ZENTRIFUGEN) a 100 µl vodné fáze obsahující RNA bylo přemístěno do nových zkumavek a do každé bylo přidáno 0,5 ml izopropanolu. Vzorky byly inkubovány při pokojové teplotě po dobu 10 min, následně centrifugovány při 12 000 g po dobu 10 min při 4 °C. Supernatant byl opatrně odstraněn a k izolované RNA byl přidán 1 ml 75% etanolu. Vzorky byly opět centrifugovány při 12 000 g po dobu 5 min při 4 °C. Etanol byl odpipetován a předchozí krok byl zopakován. Takto vyizolovaná, vysrážená RNA byla uchována v -80 °C.

Pro další použití byl odstraněn etanol, a sedimentovaná RNA byla vysušena ve vakuové odparce (SpeedVac, SPD 111V, ThermoSavant; UV S400A Universal Vacuum System) po dobu 20 min při 35 °C. Následně bylo do zkumavek přidáno 30 µl dEPC dH₂O pro rozpuštění RNA a zkumavka byla inkubována na třepačce při pokojové teplotě po dobu 5 min, při 300 rpm (Mixing Block MB-102, BIOER). Rozpuštěná RNA byla použita pro jednotlivé analýzy a dlouhodobě uchovávána v -80 °C. Koncentrace RNA byla stanovena ve 2 µl vzorku pomocí spektrofotometru NanoDrop1000 (Thermo Fisher Scientific).

4.6 Reverzní transkripce

Virová cDNA byla získána prostřednictvím dvoukrokové reverzní transkripce s použitím random nebo specifického reverzního primeru. Do první části reakční směsi (Premix I) o objemu 10 µl obsahující 9 µl dEPC dH₂O a 1 µl primeru (20 pmol/µl, Genери Biotech) byly přidány 3 µl vyizolované RNA. Směs byla zakápnuta parafinovým olejem a inkubována při 70 °C po dobu 5 min v termobloku (DB-2D Dri-Block, Techne), kdy probíhala predenaturace, a poté byla okamžitě přemístěna na led.

Následně byla k této směsi přidána druhá část reakční směsi (Premix II) o celkovém objemu 27 µl obsahující 15,5 µl dEPC dH₂O, 8 µl 5x AMV RT pufru (Promega), 2 µl 10 mM dNTP mixu (Fermentas), 0,5 µl 40U/µl inhibitoru ribonukleas (Promega) a 1 µl 10 U/µl AMV reverzní transkriptázy (Promega), celkový objem reakce tedy odpovídal 40 µl. Poté byla hotová směs zvortexována (vortex-yellowline TTS2, MANEKO) a stočena na centrifuze (minicentrifuga-PRISM mini, Labnet).

Reverzní transkripce byla u všech studovaných izolátů (1172, Křivský a Puchala) provedena pomocí primerů Poly(T)18, OYD-DW a Random primer, u izolátu 1172 byly použity také primery 1gR, 2gR, 3gR, 4gR, 5gR. Reverzní transkripce probíhala po dobu

60 min v termobloku, za teploty 37 °C při použití random primeru anebo 42 °C při použití specifických primerů.

4.7 Polymerázová řetězová reakce

Jednotlivé genomické fragmenty byly amplifikovány pomocí kombinací forward a reverse primerů v závislosti na typu amplifikovaného fragmentu. Reakční směs o objemu 18 µl byla složena ze 4 µl 5x pufru (5x MyTaq Red Reaction Buffer, BIOLINE), 13,4 µl destilované vody, 0,2 µl forward (F) primeru (20 pmol/µl, Generi Biotech), 0,2 µl reverse (R) primeru (20 pmol/µl, Generi Biotech) a 0,2 µl 5U/µl Taq polymerázy (BIOLINE). K této směsi byly přidány 2 µl RT produktu, celkový objem reakce tedy odpovídal 20 µl. Polymerázová řetězová reakce probíhala v termocykléru (Biometra, Schoeller Instruments) dle podmínek daných specifickými primery (viz tabulka 3).

Pro amplifikaci genomů izolátů OYDV pocházejících z cibule a česneku byly použity tyto kombinace primerů: OCP2/P9502, Sprimer/OYD-DW, OYD7706/OYD-DW. Dále byly pouze pro izoláty z cibulí navrženy primery a kombinace primerů 0oR, 1oF/1oR, 2oF/2oR, 2.1oF/2.1oR, 3oF/3oR, 4oF/4oR, 5oF/5oR, 6oF/6oR, 7oF/7oR, 8oF/8oR, 9oF/9oR, 9.1oF/9.1oR (viz tabulka 1). Pro izolát z česneku 1172 byly ještě navrženy kombinace primerů 1gF/1gR, 2gF/2gR, 3gF/3gR, 3.1gF/1.1gR, 4gF/4gR, 5gF/5gR (viz tabulka 2).

Tabulka 1: Seznam primerů použitých pro amplifikaci genomu izolátů OYDV z cibule

Název	Autor	Sekvence 5' – 3'
OCP2	Duchoslavová, 2008	GARTATCCACTMGCACCAGT
P9502	Van der Vlugt <i>et Bouwen</i> , 1997	GCGGATCCTTTTTTTTTTTTTTTTTT
Sprimer	Chen <i>et al.</i> , 2001	GGNAAYAAAYAGYGGNCARCC
OYD-DW	Van der Vlugt, <i>et al.</i> 1999	CACGGATCCGYGCCATWATYTGTCTG
OYD7706	Gorgolová, 2009	ACACTGGATAACAACCTAAGGAAGG
Poly(T)18		TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
0oR	Tato práce	ATTTGGATTTCATGTGTTTCGTC
1oF	Tato práce	AAAATTATAAAAAACAAAACAC
1oR	Tato práce	CGTATATCGAATTCATCCACTAAG
2oF	Tato práce	AGCGCACTGTGTAACGAG
2oR	Tato práce	TGTCATCCTTTCTATATCTGTGGT
2.1oF	Tato práce	AAAAACAAGCCACTGGACGATG
2.1oR	Tato práce	CCAATTGACGCGACCCTCTTA
3oF	Tato práce	TCGAATGACCAAGAAGTG
3oR	Tato práce	GTGTGAAGTGATGCTGTTT
4oF	Tato práce	GACAGCCAACATTGAAGACACAGA
4oR	Tato práce	TGCGATAAAATTTTCCATACTTCC
5oF	Tato práce	GAATGGGAAAAGCTAAAGTGATG
5oR	Tato práce	ATCCAGATTCGCGTCCAGGTAT
6oF	Tato práce	TTTACGCGAACAACAGC
6oR	Tato práce	TGGTATTCTAACATTATCATCACA
7oF	Tato práce	GTCCCAAACATTCCTACTT
7oR	Tato práce	TTCTTCGCAAAACGCCTTCTT
8oF	Tato práce	AGCAACTGAATACACTCCTACTGG
8oR	Tato práce	AGATTTGGCTGCTTCATTCGTG
9oF	Tato práce	GGGCATACATAGTTTGACCA
9oR	Tato práce	GTAGATATTCCACATTTTCTGAGC
9.1oF	Tato práce	TCTCAATATGAAATCGGCAGTTGG
9.1oR	Tato práce	TGATTGTACGGGGCCTGTTCC

Tabulka 2: Seznam primerů použitých pro amplifikaci genomu izolátů OYDV z česneku

Název	Autor	Sekvence 5' – 3'
Poly(T)18		TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
1gF	Tato práce	AGCCGTGGGATATAGGTGAGAAGA
1gR	Tato práce	GAATGCGTAACGTGCCAAACTA
2gF	Tato práce	TTAATAGCGTGACCTTCCAATC
2gR	Tato práce	ACTACGCGTTCTCTATCCA
2.1gF	Tato práce	ACGAGGAATAATGGGACACTGAAG
2.1gR	Tato práce	CAATCGGAGCAGCTGTAAATGA
3gF	Tato práce	ATGGGGCGGAAAATGAATA
3gR	Tato práce	CAACAATGGCTGAAAGAAGCTG
3.1gF	Tato práce	ATGCGAATTGAAATGGTGGAAGAC
1.1gR	Tato práce	CGTCCTCCTTAGATTTGCTCCTAC
4gF	Tato práce	TGGCTCAATGCATAAACAAATAC
4gR	Tato práce	AGTCCTCCTGAGAACACCT
5gF	Tato práce	TAGGAGTCATGGTGTATTTCTTG
5gR	Tato práce	ATGGTATTTTGGTATTGTCCTCA

Tabulka 3: Reakční podmínky pro PCR

	Teplota [°C]	Čas [min]	Počet cyklů
Predenaturace	95	3	1x
Denaturace	95	1	35-40x
Nasedání primerů	X (viz tabulka 4)	1	
Syntéza	72	1	
Dosyntetizování	72	7	1x

Pozn: U primerových párů OYD7706/OYD-DW a 3.1gF/1.1gR probíhá syntéza vzhledem k očekávané velikosti PCR produktu po dobu 2 min.

Tabulka 4: Teplota nasedání použitých primerů a délka očekávaných PCR produktů

Primerový pár	Teplota nasedání primerů [°C]	Délka produktu [bp]
OCP2/P9502	48	602
Sprimer/OYD-DW	48	1102
OYD7706/OYD-DW	49	2324
1oF/1oR	49,9	1256
2oF/2oR	51,9	1206
2.1oF/2.1oR	53	1202
3oF/3oR	50,9	1256
4oF/4oR	54	1323
5oF/5oR	53	1303
6oF/6oR	51,8	1302
7oF/7oR	51	1453
8oF/8oR	53,6	1204
9oF/9oR	52	1248
9.1oF/9.1oR	53,3	1031
1gF/1gR	54,3	1310
2gF/2gR	51,2	1267
3gF/3gR	52,9	1329
3.1gF/1.1gR	61	2183
4gF/4gR	51,3	1279
5gF/5gR	52,6	1328

4.8 Elektroforéza v agarózovém gelu

Pro zjištění velikosti PCR produktu byla provedena jeho elektroforetická separace v 1,5% agarózovém gelu. Do kádinky bylo odměřeno 50 ml rozvařené agarosy (AGAROSE I, AMRESCO) a přidáno 3 μ l barviva GoodView Nucleic Acid Stain (SBS Genetech), směs byla promíchána a nalita do vaničky s elektroforetickým hřebínkem. Gel byl ponechán tuhnout po dobu minimálně 0,5 hod, poté byl zalit TAE pufrem a vytáhnut hřebínek. Do první jamky byly napipetovány 2 μ l markeru molekulové hmotnosti Gene Ruler 100 bp plus DNA ladder (Fermentas) a do dalších jamek postupně produkty PCR reakce o objemu 5 μ l. Migrace vzorků v gelu proběhla při stejnosměrném napětí 80 V po dobu cca 45 min (zdroj elektrického napětí - POWER STATION 300, Labnet). Gel byl následně přemístěn na UV transluminátor (G:BOX Syngene), PCR produkty byly vizualizovány v UV světle a poté zdokumentovány pomocí dokumentačního zařízení a softwaru GeneSnap (Syngene).

5x TAE pufr (pH 8, 1000 ml)

Tris (Serva)	24,2 g
ledová kyselina octová (Lach-Ner)	5,71 ml
0,5 mol/l EDTA (Lachema)	10 ml

pro vlastní použití ředíme na 1x TAE

4.9 Izolace PCR produktu z gelu

Získané PCR produkty byly izolovány pomocí QIAquick Gel Extraction Kitu (QIAGEN) podle pokynů výrobce.

Nejprve byla provedena elektroforetická separace v 1% agarózovém gelu. Do 75 ml rozvařené agarózy byly přidány 4 µl ethidium bromidu (o koncentraci 2,5 mg/1ml; Serva). Po ztuhnutí byl gel zalit TAE pufrům a separace proběhla při 80 V po dobu cca 45 min.

Po skončení separace byl gel umístěn na UV transluminátor určený pro vyřezávání z gelu (UVT-14L, Herolab). Sterilním skalpelem byly vyřezávány v UV světle jednotlivé PCR produkty do 1,5ml mikrozkušavek. Poté bylo potřeba zjistit váhu gelu ve zkumavce (váhy - A&D EK 200g) a přidat QG pufr v objemovém poměru 3:1. Následně byly zkumavky inkubovány po dobu 10 min při 50 °C v dry-bloku, dokud se gel kompletně nerozpustil. Poté byl přidán 1 objem izopropanolu a směs byla přemístěna do kolonky určené k izolaci DNA. Postupně byl přidáván QG pufr, PE pufr a kolonka se směsí byla opakovaně centrifugována (stolní centrifuga – Biofuge pico, Heraeus). Nakonec bylo do kolonky napipetováno 30 µl destilované vody, tato DNA byla dlouhodobě uchovávána v -20 °C.

Koncentrace vyizolované DNA byla stanovena fluorometricky pomocí fluorometru (Hoefler DyNA Quant 200) v TNE pufru za pomoci barviva Hoechst 33258 (1mg/ml; Sigma-Aldrich).

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

Tris (Serva)	12,11 g
EDTA (Lachema)	3,72 g
NaCl (Lachema)	116,89 g

doplnit destilovanou vodou

4.10 Sekvencování DNA fragmentů

Sekvenační značení bylo provedeno pomocí Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kitu (AB Applied Biosystems) podle pokynů výrobce. Složení reakční směsi bylo 2 µl (3,2 pmol) sekvenačního primeru, 1 µl Big Dye (Sequencing RR-100), 1 µl pufru (Big Dye Terminator sequencing buffer, 5x) a 6 µl vzorku DNA naředěného na požadovanou koncentraci.

Množství použité DNA v reakci odpovídalo velikosti PCR fragmentu, tj. 30 ng DNA bylo použito v případě PCR produktu dlouhého cca 600 bp, 40 ng DNA pro produkt 1 100-1 300 bp dlouhý a 50 ng DNA u produktů delších než 2 000 bp.

Následně byly zkumavky umístěny do termocykléru a bylo provedeno sekvenační značení za podmínek doporučených výrobcem (viz tabulka 5).

Tabulka 5: Reakční podmínky pro PCR

	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
Predenaturace	96	1 min	1x
Denaturace	96	10 s	40x
Nasedání primerů	50	5 s	
Syntéza	60	4 min	

Vzorky byly analyzovány pomocí genetického analyzátoru ABI3730 (Applied Biosystems) na pracovišti Ústavu experimentální botaniky, AV ČR, Olomouc.

4.11 Bioinformatická analýza

Prvním krokem bioinformatické analýzy bylo navržení primerů potřebných pro amplifikaci genomických fragmentů a pro sekvencování genomu virových izolátů. Primery použité v jednotlivých analýzách byly navrženy pomocí software PrimerSelect, Lasergene (Dnastar, Inc.). Jako referenční sekvence byly použity sekvence izolátů OYDV-Se (Acc. No. JX433019.1) pro izoláty OYDV z cibule a OYDV-SW9-Arg3 (Acc. No. KF632715.1) pro izoláty OYDV z česneku, případně byly primery navrženy na základě průběžně získaných sekvencí studovaných izolátů viru.

Sekvenační výstupy byly sestaveny do konečných kontigů pomocí programu SeqMan, Lasergene (Dnastar, Inc.). Následovala jejich identifikace prostřednictvím programu BLAST. Získané sekvence byly porovnány se sekvencemi OYDV dostupnými v databázi GenBank,

byla sestavena matice pomocí programu ClustalW a na jejím základě byla provedena jejich fylogenetická analýza pomocí neighbor-joining metody, maximum composite likelihood metoda s 1 000 opakováními (obě MEGA 6.0). Výsledný fylogenetický strom byl vizualizován v programu Tree Explorer (MEGA 6.0).

5 Výsledky

Pro plánované experimenty byl důležitý výběr vhodného materiálu. Byl proveden skríníng různých rostlin česneku a byla vybrána rostlina česneku vykazující typické příznaky infekce OYDV - žlutou proužkovitost na listech a byl pozorován celkově zakrslý vzrůst rostliny (viz fotografie 2). Na základě DAS-ELISA testu byla potvrzena přítomnost viru OYDV u česneku 1172, naopak další viry komplexu česneku (GarCLV, SLV, LYSV) nebyly zjištěny.

Tento virový izolát byl vhodný pro následné analýzy, protože směsná infekce s dalšími viry by mohla pozměnit výsledky analýzy hostitelské specifity u studovaného izolátu OYDV.

5.1 Hostitelská specifita izolátu 1172

Pomocí přenosových experimentů byla testována hostitelská specifita izolátu 1172. V první fázi bylo virem inokulováno 12 rostlin cibule kuchyňské (cv. Všetana). Žádná rostlina nevykazovala po 14, 21 a 30 dnech viditelné příznaky infekce. Přítomnost viru nebyla prokázána ani pomocí DAS-ELISA testu. Přenosový experiment byl dvakrát opakován, se stejným výsledkem. Virový izolát byl přenosný jen na česnek (viz tabulka 6).

Tabulka 6: Testování hostitelské specifity OYDV izolátu 1172

Hostitelská rostlin	Počet testovaných / pozitivních rostlin
Cibule (<i>Allium cepa</i> L.)	12/0
	12/0
	10/0
Česnek (<i>Allium sativum</i> L.)	5/5

Pro studium genetické variability byly vybrány tři izoláty OYDV, izolát 1172 původem z česneku a dále dva izoláty (Křivský a Puchala) původem z cibule, u kterých bylo dříve zjištěno, že nejsou naopak přenosné na česnek (Gorgolová, 2009). Cílem této práce bylo získat celou sekvenci genomu všech tří izolátů viru OYDV. Byla zvolena základní strategie amplifikace dílčích fragmentů, kdy byly porovnány známé sekvence OYDV a sekvence byla rozdělena na fragmenty o délce přibližně 1 200 bp, s překryvem okolo 300 bp (viz obrázek 2,

3). Byly postupně navrženy primery, které posloužily k získání dílčích genomických fragmentů těchto izolátů OYDV.

5.2 Genom izolátů OYDV pocházejících z cibule

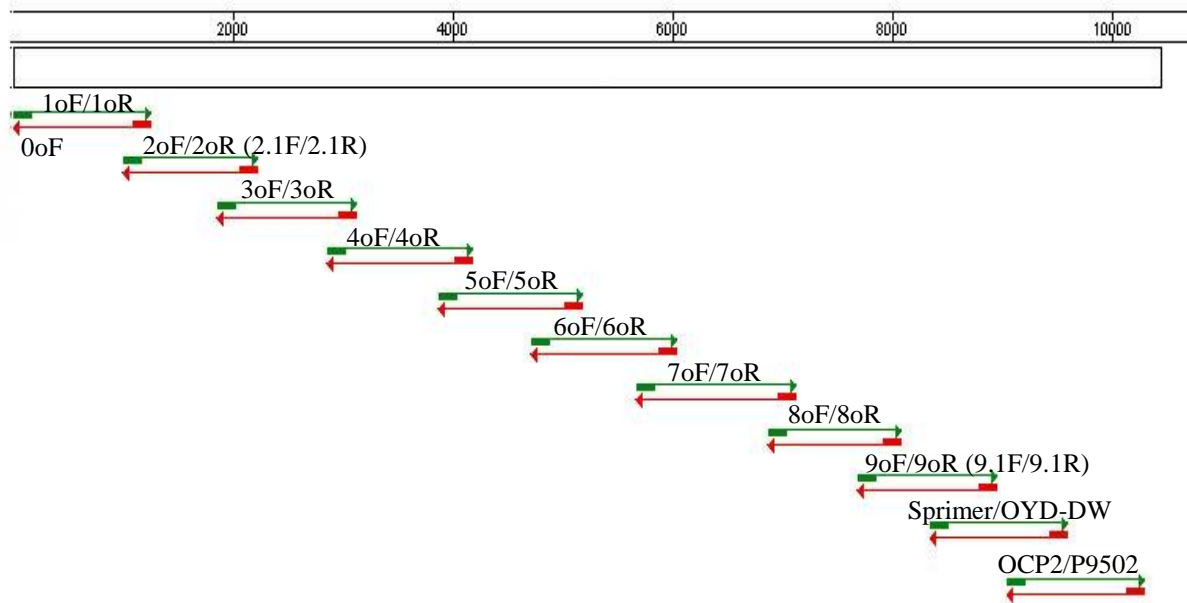
U izolátů Křivský a Puchala se podařilo úspěšně získat celkové genomické sekvence. V první fázi byla ověřena identita izolátů z cibule. Pomocí reverzní transkripce s primerem Poly(T)18 byla poté syntetizována cDNA, z níž byly úspěšně amplifikovány genomické fragmenty z oblasti CP a 3'UTR. Pomocí PCR s primerovými kombinacemi OCP2/P9502 a Sprimer/OYD-DW tak byla namnožena část genomu o délce 602 a 1 102 bp (viz fotografie 3A, 3B). Pomocí primerové kombinace OYD7706/OYD-DW byl úspěšně získán fragment o očekávané velikosti 2 324 bp, jako primer pro reverzní transkripci byl v tomto případě použit OYD-DW (viz fotografie 3C).

Byly získány sekvence amplifikovaných fragmentů a pomocí BLAST byla potvrzena jejich podobnost s izoláty OYDV původem z cibule. Na základě známé sekvence (OYDV-Se, Acc. No. JX433019.1) dostupné v databázi GenBank byla genomová sekvence rozdělena na 9 částí o délce cca 1 200 bp, přičemž fragmenty měly překryv přibližně 300 bp (viz obrázek 2). Pro PCR amplifikaci byly navrženy nové kombinace primerů 1oF/1oR, 2oF/2oR, 3oF/3oR, 4oF/4oR, 5oF/5oR, 6oF/6oR, 7oF/7oR, 8oF/8oR, 9oF/9oR, při reverzní transkripci byly použity Random primery. Pomocí specifické PCR byly úspěšně získány amplikony s použitím primerů 1oF/1oR, 3oF/3oR, 4oF/4oR, 5oF/5oR, 6oF/6oR, 7oF/7oR, 8oF/8oR, 9oF/9oR (pouze u izolátu Křivský), nepodařilo se však získat fragmenty s použitím kombinace primerů 2oF/2oR u obou izolátů (viz fotografie 4A, 4B) a 9oF/9oR u izolátu Puchala (viz fotografie 4B). Na základě získaných fragmentů a znalosti hraničních částí byly proto navrženy nové primery 0oR, 2.1oF, 2.1oR, 9.1oF a 9.1oR a chybějící části genomu byly úspěšně získány.

Dílčí fragmenty genomu izolátů Křivský a Puchala byly složeny do celkové sekvence o délce 10 461 bp bez poly(A)-konce. Analýzou BLAST bylo následně ověřeno, že se v obou případech jedná o virus OYDV. Genomové sekvence obou izolátů vykazují největší, 93% podobnost s izolátem OYDV-At (Acc. No. JX433020.1) pocházejícím z Německa a s izolátem OYDV-Se (Acc. No. JX433019.1) pocházejícím z Argentiny, jejichž původním hostitelem byla cibule. Genomové sekvence izolátů Křivský a Puchala mezi sebou vykazují 99% identitu. Sekvence těchto izolátů vykazují nejvíce 76% identitu s izoláty původem z česneku, jedná se o izoláty Yuhang (Acc. No. AJ510223.1), MS/SW1 (Acc. No.

HQ258894.1), SG1 (Acc. No. JX429964.1), G79 (Acc. No. AB219833.1), G5h (Acc. No. AB219834.1).

Obrázek 2: Schéma kombinací primerů k syntéze a sekvencování kompletní sekvence genomu izolátů OYDV původem z cibule



5.3 Genom izolátu OYDV pocházejícího z česneku

Pro získání celkové genomické sekvence izolátu 1172 z česneku byla zvolena obdobná strategie amplifikace dílčích fragmentů stejně jako u izolátů OYDV pocházejících z cibule. Genom izolátu 1172 se však nepodařilo získat kompletní.

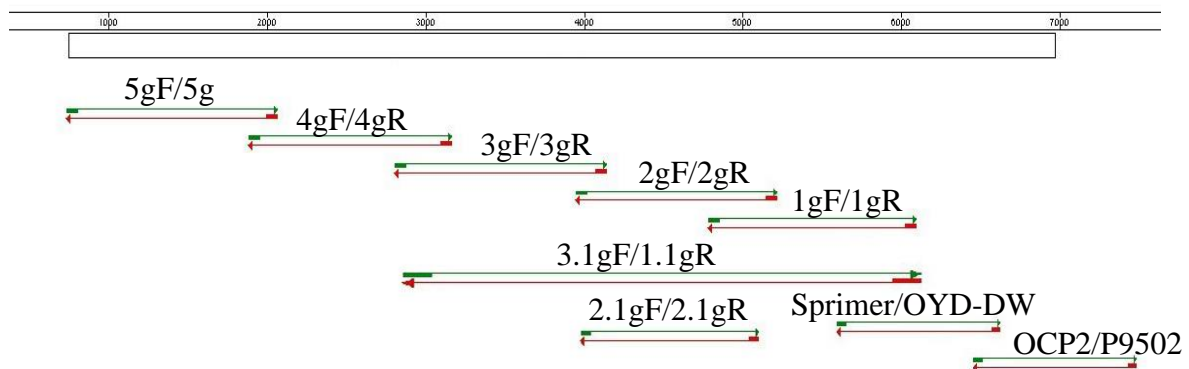
Pomocí PCR amplifikace byly obecně u izolátu 1172 získány pouze slabé dílčí produkty i přes použití specifických primerů, neboť se virus v hostitelské rostlině vyskytoval ve velmi nízké koncentraci.

Pomocí reverzní transkripce s primerem Poly(T)18 byla syntetizována cDNA, z níž byly úspěšně amplifikovány genomické fragmenty z oblasti CP a 3'UTR. Pomocí PCR s primerovými kombinacemi OCP2/P9502 a Sprimer/OYD-DW tak byly namnoženy části genomu o délce 602 a 1 102 bp (viz fotografie 3A, 3B). Na těchto fotografiích je patrné, že tyto kombinace primerů jsou vhodné především pro izoláty pocházející z cibule, neboť byl získán velmi slabý produkt. Pomocí primerové kombinace OYD7706/OYD-DW nebyl získán žádný produkt (viz fotografie 3C).

Na základě získané sekvence CP a 3'UTR byla potvrzena vysoká identita s izolátem OYDV-SW9-Arg3 pocházejícím z Argentiny (Acc. No. KF632715.1), podle jehož sekvence byly navrženy primery pro amplifikaci dalších dílčích fragmentů izolátu 1172. Pro zjištění kompletní genomické sekvence byla zbývající část genomu rozdělena na 5 fragmentů o délce cca 1 300 bp, přičemž fragmenty měly překryv přibližně 300 bp (viz obrázek 3). Pro reverzní transkripci byly použity nově navržené primery 1gR, 2gR, 3gR, 4gR, 5gR, Random primery nebyly v tomto případě vhodné, jelikož nebyl získán očekávaný produkt. Dílčí části byly amplifikovány pomocí PCR s primerovými kombinacemi 1gF/1gR, 2gF/2gR, 3gF/3gR, 4gF/4gR, 5gF/5gR, avšak pouze pomocí primerového páru 4gF/4gR byla naamplifikována odpovídající část genomu o délce 1279 bp (viz fotografie 5A). S použitím primerových kombinací 1gF/1gR, 2gF/2gR, 3gF/3gR a 5gF/5gR nebyly získány očekávané fragmenty. Získané fragmenty o délce 1 279 bp (v případě použití primerové kombinace 4gF/4gR) a fragmenty z oblasti CP a 3'UTR o délce 602 a 1 102 bp (v případě použití primerových kombinací OCP2/P9502 a Sprimer/OYD-DW) byly sekvencovány, podle hraničních sekvencí byly poté navrženy primery 3.1gF a 1.1gR. Fragment o délce 2183 bp byl úspěšně amplifikován (viz fotografie 5B) a sekvenován pomocí hraničních sekvencí získaných kombinací primerů 3.1gF, 1.1gR (pro vnější část) a 2.1gF, 2.1gR (pro vnitřní část). Pro získání chybějící sekvence na 5' konci genomu by bylo vhodné provést RACE-PCR, tato metoda nebyla ale z časových důvodů uskutečněna.

Dílčí fragmenty genomu izolátu 1172 byly složeny do parciální sekvence o délce 4 590 bp bez poly(A)-konce. Analýzou BLAST bylo následně ověřeno, že se jedná o virus OYDV. Genomická sekvence izolátu 1172 vykazovala největší, 88% podobnost s izolátem OYDV-SW9-Arg3 (Acc. No. KF632715.1), který je původem z česneku pocházejícího z Argentiny. Následně byly vzájemně porovnány sekvence 3 izolátů získaných v této práci, kdy bylo zjištěno, že genomová sekvence izolátu 1172 z česneku vykazuje pouze 77% identitu v porovnání s izoláty Křivským a Puchalou, které jsou původem z cibule.

Obrázek 3: Schéma kombinací primerů k syntéze a sekvencování parciální sekvence genomu izolátu OYDV původem z česneku



Fotografie 2: Rostlina česneku infikovaného izolátem 1172, vykazující typické příznaky virové infekce OYDV



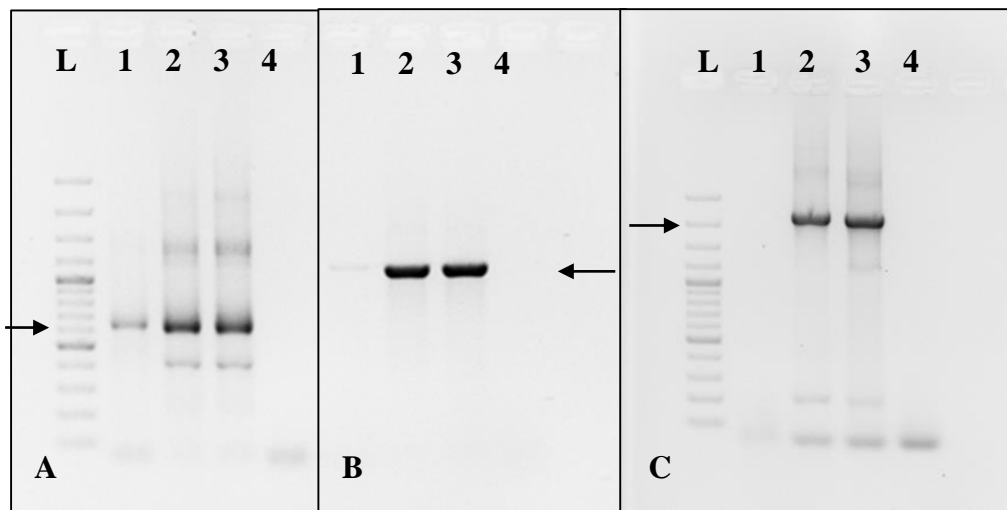
Fotografie 3: Genomické fragmenty izolátů 1172, Křivský a Puchala, amplifikované pomocí specifických primerů

A) produkty PCR získané s kombinací primerů OCP2/P9502

B) produkty PCR získané s kombinací primerů Sprimer/OYD-DW

C) produkty PCR získané s kombinací primerů OYD7706/OYD-DW

Dráhy: L: Gene Ruler 100 bp plus DNA ladder, 1: izolát 1172, 2: izolát Křivský, 3: izolát Puchala, 4: blank; (produkty označeny šipkou)

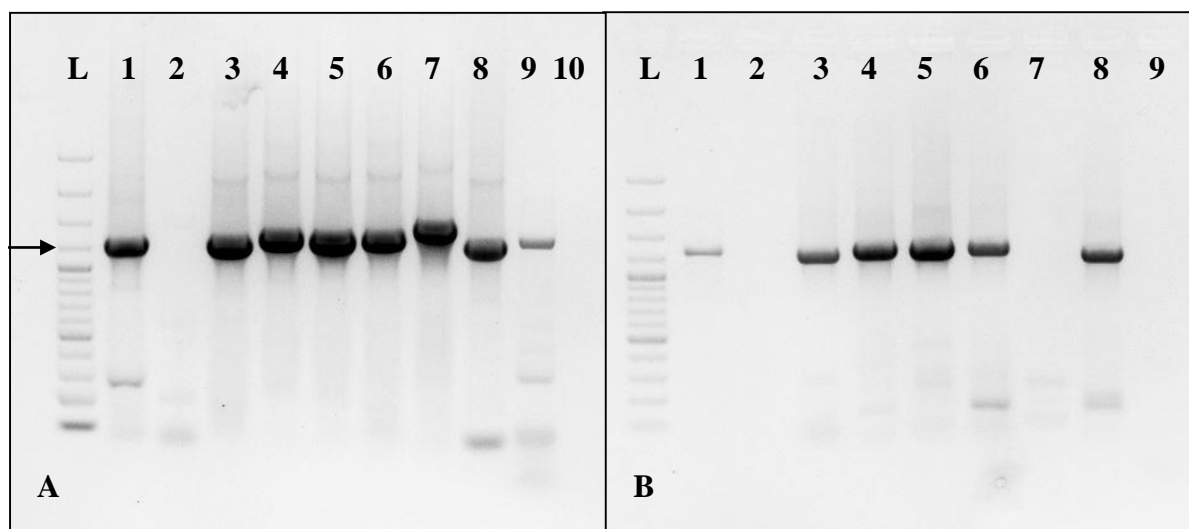


Fotografie 4: Genomické fragmenty izolátu Křivský a Puchala, amplifikované pomocí specifických primerů

A) izolát Křivský

B) izolát Puchala

Dráhy: L: Gene Ruler 100 bp plus DNA ladder, 1-9: produkty PCR s primerovými kombinacemi 1oF/1oR, 2oF/2oR, 3oF/3oR, 4oF/4oR, 5oF/5oR, 6oF/6oR, 7oF/7oR, 8oF/8oR, 9oF/9oR, 10: blank; (produkty označeny šipkou)

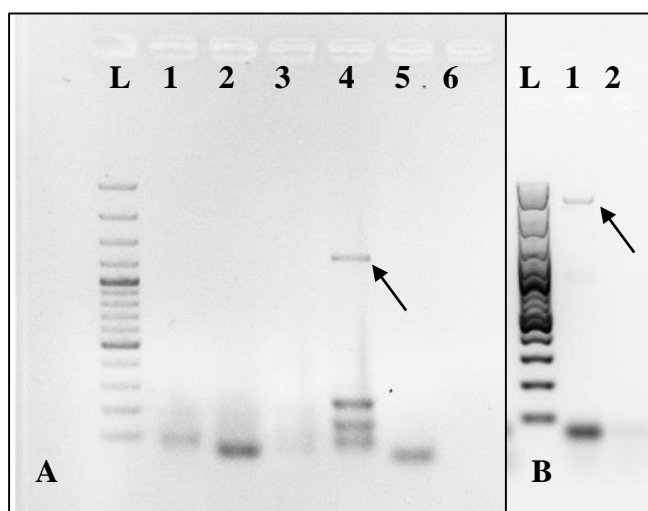


Fotografie 5: Genomické fragmenty izolátu 1172, amplifikované pomocí specifických primerů

A) produkty PCR získané s kombinacemi primerů 1gF/1gR, 2gF/2gR, 3gF/3gR, 4gF/4gR, 5gF/5gR

B) produkty PCR získané s kombinací primerů 3.1gF/1.1gR

Dráhy: L: Gene Ruler 100 bp plus DNA ladder, 1-5: izolát 1172; 6A, 2B: blank; (produkty označeny šipkou)



5.4 Genetická a fylogenetická analýza

Pomocí analýzy ClustalW byla provedena analýza genetické variability izolátů OYDV. Vzhledem k tomu, že byla u izolátu 1172 získána pouze parciální sekvence o délce 4 590 nt bez poly(A)-konce pokrývající oblast parciální sekvence genu kódující CI, 6K2, NIa, NIb, CP a 3'UTR, byla provedena analýza, ve které byly porovnány sekvence genomů odpovídající této délce. Byla získána matice o délce 4 592 nt, pokrývající sekvenci izolátu 1172 v pozici 1-4 584 nt.

Nově popisovaný izolát 1172 vykazoval při porovnání s nejpodobnějšími sekvencemi z česneku různé delece nebo inserce, a to zejména v oblastech kódujících proteiny CI, CP a 3'UTR oblast.

U nejpodobnějších izolátů OYDV-SW9-Arg2 a OYDV-SW9-Arg3 byla zjištěna inserce 6 nukleotidů v pozici 1172¹⁹⁵ nt, naopak u izolátu SG1 byla zjištěna delece 6 nukleotidů v pozici 4 028-4 033. Izolát OYDV-SW9-Arg3 navíc obsahuje ještě deleci v pozici 4 335-4 592 v porovnání s izolátem 1172. Pro izoláty MS/SW1, SG1 a RR1 je charakteristická delece 1 nukleotidu v pozici 4 379. Velká variabilita byla zjištěna v oblasti odpovídající pozici 4 409-4 415, kde jednotlivé izoláty v porovnání s izolátem 1172 obsahují různě dlouhé delece, a to: Křivský, Puchala a OYDV-Se 5 nt (v pozici 4 411-4 415), OYDV-At 7 nt, OYDV-SW9-Arg2 a Yuhang 2 nt (v pozici 4 413-4 414). Izoláty G79 a G5h obsahují deleci v pozici 4 516-4 592. V pozici 4 564 byla zjištěna delece 1 nukleotidu u izolátu Křivský, OYDV-At, OYDV-Se a Puchala, jedná se o izoláty získané pouze z cibule. U izolátu Bate6 zjištěna inserce 2 nukleotidů v pozici 1172⁴⁵⁷¹ nt.

Při porovnání celých genomů byla jako referenční sekvence použita sekvence izolátu OYDV-At o velikosti 10 459 nt (JX433020.1). Byla sestavena matice o délce 10 524 nt pokrývající sekvenci OYDV-At v pozici 16-10 444.

V porovnání s izoláty z česneku nesou izoláty získané z cibule charakteristické delece, které jsou obecně detekovány v oblastech genů kódujících proteiny P1, P3, CP a také v oblasti 3'UTR. U nově popisovaných izolátů, Křivský, Puchala, i u izolátů původem z Německa (OYDV-At) a Argentiny (OYDV-Se) byly zjištěny tyto delece: 4 nt v pozici 512-515, 3 nt v pozici 535-537, 2 nt v pozici 588-589, 6 nt v pozici 607-612, 7 nt v pozici 631-637, 1 nt v pozici 651, 13 nt v pozici 666-678, 3 nt v pozici 750-752, 3 nt v pozici 805-807, 17 nt v pozici 838-854, 7 nt v pozici 869-875, 5 nt v pozici 3 128-3 132, 1 nt v pozici 3 367, 1 nt v pozici 10 498. Tři izoláty původem cibule, Křivský, Puchala, OYDV-Se, nesou 5 nt deleci v pozici 10 345-10 349, izolát OYDV-At má v tomto místě deleci delší, a to 7 nt (v pozici 10 343-10 349).

K izolátům OYDV původem z česneku je řazen i izolát RR1 získaný z cibule, neboť s těmito izoláty vykazuje velkou podobnost. Izoláty MS/SW1, SG1, RR1, G79, G5h a Yuhang pocházející z česneku, v porovnání s referenčním izolátem OYDV-At získaným z cibule, obsahují delece v oblastech kódujících proteiny P1, HC-Pro, P3, CP a také v oblasti 3'UTR, jedná se o tyto delece: 3 nt v pozici 1 043-1 045, 2 nt v pozici 3 148-3 149 a 1 nt v pozici 3 389. Izolát G79 obsahuje oproti referenčnímu izolátu OYDV-At delecí 276 nt v pozici 1 508-1 783, dále izolát SG1 obsahuje delecí 6 nt v pozici 9 963-9 968. Izoláty MS/SW1, SG1 a RR1 obsahují delecí 1 nt v pozici 10 313. Izolát Yuhang obsahuje delecí 2 nt v pozici 10 347-10 348. Izoláty G79 a G5h obsahují delecí 75 nt v pozici 10 450-10 524.

Analýza na základě parciálních sekvencí pokrývajících sekvenci izolátu 1172 i analýza na základě úplných sekvencí izolátů získaných z cibule prokázala stejné fylogenetické vztahy porovnávaných izolátů, byly vytvořeny stromy se stejnou topologií.

Vzhledem k tomu, že byla u izolátu 1172 získána pouze parciální sekvence o délce 4 590 nt bez poly(A)-konce pokrývající oblast parciální sekvence genu kódující CI, 6K2, NIa, NIb, CP a 3'UTR, byla provedena neighbor-joining analýza podle matice o délce 4 592 nt, pokrývající sekvenci izolátu 1172 v pozici 1-4 584 nt.

Analýza potvrdila odlišnost izolátů původem z cibule a česneku, které se vyvětvily, s jedinou výjimkou, do dvou samostatných, vysoce statisticky průkazných skupin (viz obrázek 4). České izoláty OYDV původem z cibule (*Allium cepa*), Křivský a Puchala, vytvořily samostatnou větev společně s dalšími izoláty OYDV-At (z Německa; Acc. No. JX433020.1) a OYDV-Se (z Argentiny; Acc. No. JX433019.1).

Izoláty OYDV získané z česneku vytvořily 4 clustery. Český izolát 1172 původem z česneku, který byl získán v této práci, vytvořil společnou větev (cluster III) s izolátem OYDV-SW9-Arg3 (Acc. No. KF632715.1) pocházejícím z Argentiny. Tato větev byla průkazně odlišná od dalších izolátů a clusterů (I, II a IV, *Allium cepa*). Zbývající izoláty původem z česneku vykazovaly příbuznost s českým izolátem, vytvořily další dvě samostatné fylogenetické větve.

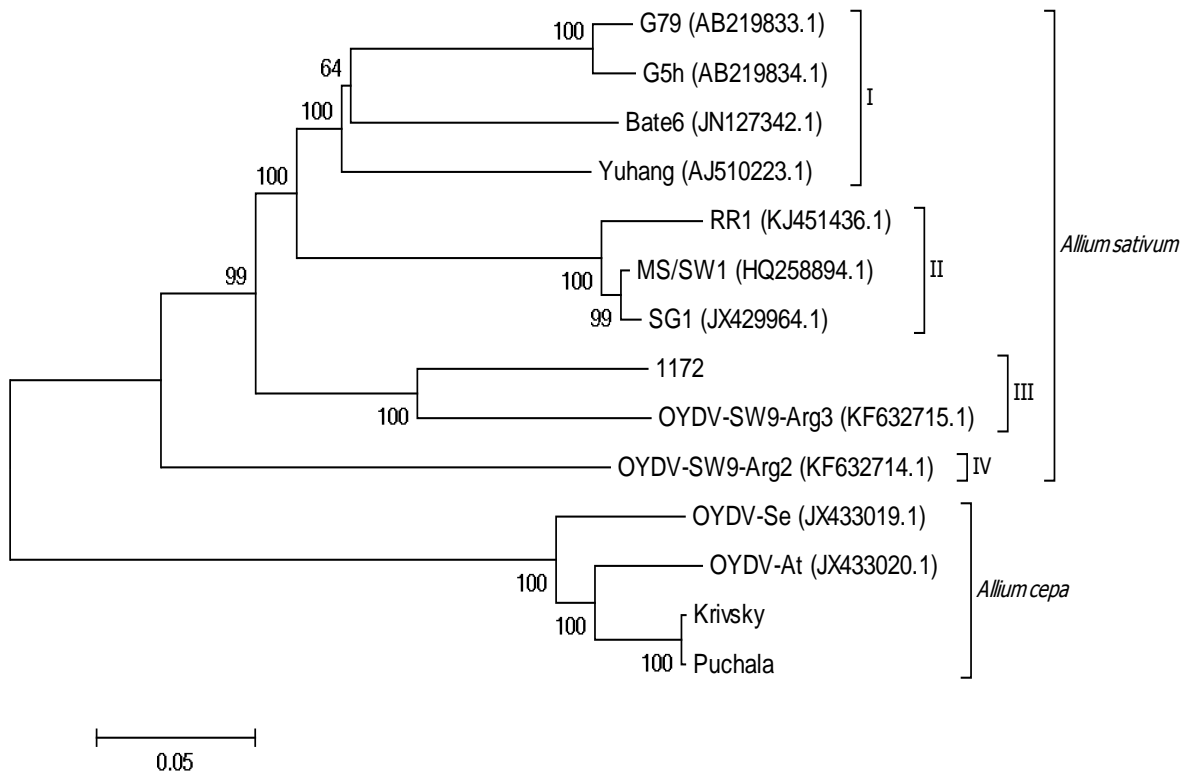
Cluster I byl tvořen izoláty G79 (Acc. No. AB219833.1) a G5h (Acc. No. AB219834.1) pocházejícími z Japonska, dále izolátem Bate6 (Acc. No. JN127342.1) z Austrálie a izolátem Yuhang (Acc. No. AJ510223.1) z Číny.

Cluster II byl tvořen izolátem MS/SW1 (Acc. No. HQ258894.1) z Austrálie a izolátem SG1 (Acc. No. JX429964.1) ze Španělska. Součástí tohoto clusteru je i izolát RR1 (Acc. No. KJ451436.1) z Indie, který je specifický svým hostitelem, protože jako jediný nepochází z česneku, ale byl izolován z cibule, geneticky ale odpovídá této skupině izolátů.

Izolát OYDV-SW9-Arg2 (Acc No. KF632714.1), pocházející z Argentiny, se nejvíce liší od ostatních izolátů OYDV původem nejen z česneku ale i cibule. Představuje cluster IV, jenž je vymezen jako samostatná větev tohoto fylogenetického stromu.

Obrázek 4: Fylogenetický strom izolátů OYDV zhotovený pomocí neighbor-joining analýzy

Jednotlivé izoláty OYDV jsou popsány jménem a přístupovým číslem (Acc. No.) podle databáze GenBank. Měřítko znázorňuje 0,05 substitucí na pozici. Zobrazeny hodnoty bootstrap ≥ 60 .



6 Diskuze

V této práci byla pomocí přenosových experimentů testována hostitelská specifita izolátu viru OYDV původem z česneku. U česneku byla potvrzena pouze přítomnost viru OYDV, což usnadnilo analýzu hostitelské specifity studovaného izolátu. Viry působící ve směsné infekci si totiž mohou navzájem pomáhat v napadání hostitele a jejich účinek se zvyšuje, je navíc možná i kompetice mezi těmito viry (Lot *et al.*, 1998; Bagi *et al.*, 2012). Úspěšnost přenosu virového izolátu 1172 nebyla ale ovlivněna koinfekcí jiným virem. U tohoto izolátu byla potvrzena 100% úspěšnost přenosu na další rostliny česneku, avšak na cibuli se jej i přes opakované pokusy přenést nepodařilo. Izoláty OYDV původem z česneku (poprvé označené jako skupina OYDV-G) jsou obecně považovány za přenosné na oba hostitele OYDV, česnek i cibuli, i když úspěšnost jejich přenosu z česneku na cibuli je nižší (Van Dijk, 1993a; Conci *et al.*, 1999, Mahmoud *et al.*, 2007), izolát 1172 se tedy značně biologicky odlišuje od ostatních izolátů získaných z česneku.

Úzká hostitelská specifita byla u OYDV pozorována již dříve, ale byla spojována s cibulí jako jediným hostitelem. U izolátů Křivský a Puchala, které byly geneticky charakterizovány v této práci, bylo již dříve potvrzeno, že nejsou přenosné na česnek, ale pouze na cibuli (Gorgolová, 2009). Tyto výsledky v rámci testování hostitelské specifity se shodují i s poznatky Celli *et al.* (2013), která popisuje tutéž situaci, izoláty OYDV původem z cibule byly mechanicky přenosné pouze na cibuli, nikoliv na česnek.

Odlišnost izolátu 1172 se projevila i v obtížnostech v popisu jeho genomu. Izolát vykazuje relativně velkou variabilitu v porovnání s již známými sekvencemi OYDV dostupnými v databázi GenBank, proto bylo navrzení vhodných primerů a úspěšná amplifikace relativně malá, pozdější analýza ukázala, že mezi sekvencí genomu izolátu 1172 a některými navrženými primery tak nebyla dostatečná homologie. Pro amplifikaci odpovídajících dílčích fragmentů genomu musela být zvolena zdlouhavější strategie, kdy byly postupně navrhovány nové primery a jejich kombinace, a to podle hraničních sekvencí již získaných fragmentů.

Sekvence navržených primerů se u dílčích fragmentů genomu izolátů OYDV z cibule a česneku lišily, některé primery byly specifické jen pro izoláty z cibule a naopak. Tato skutečnost vypovídá o značné variabilitě mezi sekvencemi genomu izolátů OYDV z cibule a česneku, která může souviset s jejich hostitelskou specifikou.

Z fylogenetické analýzy je zřejmé, že izolát RR1 (Acc. No. KJ451436.1) vykazuje vysokou podobnost s izoláty OYDV původem z česneku, i když byl získán z cibule (GenBank). Vzhledem k jeho velké podobnosti s izoláty z česneku lze předpokládat, že jeho původním hostitelem byl česnek, který byl druhotně přenesen na cibuli.

Izoláty původem z cibule, Křivský a Puchala, obsahují po porovnání s parciální sekvencí izolátu 1172 původem z česneku delecí 5 nt v pozici 4 411-4 415 a 1 nt v pozici 4 564, jedná se o oblast genu kódující plášťový protein (CP) a 3'UTR oblast. Z těchto výsledků je tak možné usuzovat, že gen pro plášťový protein může souviset s již zmíněnou jedinečnou hostitelskou specifikou izolátu 1172.

Izoláty původem z cibule, Křivský, Puchala, OYDV-At (Acc. No. JX433020.1) a OYDV-Se (Acc. No. JX433019.1), obsahují po porovnání s izolátem 1172 získaným z česneku delece na totožných místech, jedná se o geny kódující proteiny P1, P3, CP a oblast 3'UTR. Izoláty Křivský a Puchala mají dále po porovnání s izolátem OYDV-Se (Acc. No. JX433019.1) publikovaným Celli *et al.* (2013) také totožnou délku nukleotidové sekvence, jedná se o 10 461 nt. Druhý izolát OYDV-Mi (tj. OYDV-At) (Acc. No. JX433020.1) se od těchto izolátů jen nepatrně odlišuje v délce genomu odpovídající 10 459 nt (Celli *et al.*, 2013). Z těchto pozorování je patrné, že izoláty OYDV z cibule mají konstantní délku nukleotidové sekvence a také charakteristické variabilní oblasti, které po porovnání s izoláty s česneku vykazují různě dlouhé delece.

Celli *et al.* (2013) zjistila po porovnání genomové sekvence izolátů získaných z cibule (OYDV-Se, OYDV-Mi) a izolátů z databáze GenBank původem z česneku charakteristické oblasti, které nesplňovaly kritérium pro zařazení viru do stejného druhu (King *et al.*, 2012). Geny kódující proteiny P1, HC-Pro, P3, VPg, NIa a CI vykazovaly shodu nukleotidové sekvence mezi izoláty OYDV z cibule a česneku menší než 76 %, geny kódující NlB, CP a 3'UTR však toto kritérium splňovaly.

Zjištěné rozdíly v genomové sekvenci izolátů OYDV analyzovaných v této práci, detekované v oblastech kódujících proteiny P1, P3, plášťový protein (CP) a v 3'UTR oblasti u izolátů získaných z cibule a v oblastech kódujících proteiny P1, HC-Pro, P3, CI, CP a v 3'UTR oblasti izolátů získaných z česneku, mohou mít za následek odlišnou hostitelskou specifikou těchto izolátů, která souvisí i s jejich geografickým původem, což potvrdila i Celli *et al.* (2013).

7 Závěr

Virus žluté zakrslosti cibule (OYDV) patřící do rodu *Potyvirus* je významným zástupcem komplexu virů česneku, který napadá rostliny rodu *Allium*. Tento virus je celosvětově rozšířený, u infikovaných plodin vyvolává charakteristické symptomy. Bylo potvrzeno, že infekce komplexem virů česneku výrazně ovlivňuje zemědělské výnosy.

V této práci byla studována hostitelská specifita a genetická variabilita tří izolátů viru žluté zakrslosti cibule, jedná se o izolát 1172 původem z česneku (*Allium sativum* L.) a dva izoláty původem z cibule (*Allium cepa* L.), Křivský a Puchala.

U česneku 1172 byl identifikován virus OYDV, který vykazoval úzkou hostitelskou specifitu, byl přenosný pouze na česnek, nikoliv na cibuli. Žádný takový izolát zatím nebyl doposud popsán. Analýza dvou izolátů z cibule, které se vyznačují opačnou hostitelskou specifikou, potvrdila genetickou odlišnost a charakteristickou strukturu genomu typickou pro nově popsané skupiny izolátů z cibule kuchyňské (*Allium cepa* L.)

U dvou izolátů OYDV získaných z cibule byla zjištěna kompletní sekvence genomu, jedná o délku 10 461 bp bez poly(A)-konce, u izolátu z česneku byla získána pouze parciální sekvence o délce 4 590 bp bez poly(A) konce. Izoláty původem z cibule vykazovaly vzájemnou 99% identitu, a pouze 77% identitu s izolátem 1172 původem z česneku. Genomové sekvence izolátů Křivský a Puchala vykazují největší, 93% podobnost dalšími izoláty OYDV z cibule, a to s OYDV-At (Acc. No. JX433020.1) pocházejícím z Německa a OYDV-Se (Acc. No. JX433019.1) pocházejícím z Argentiny. Při srovnání úplných genomických sekvencí dále vykazují 76% identitu s izoláty původem z česneku, Yuhang (Acc. No. AJ510223.1), MS/SW1 (Acc. No. HQ258894.1), SG1 (Acc. No. JX429964.1), G79 (Acc. No. AB219833.1), G5h (Acc. No. AB219834.1). Izolát 1172 vykazuje největší, a to 88% identitu s izolátem OYDV-SW9-Arg3 původem z česneku z Argentiny (Acc. No. KF632715.1).

Fylogenetická analýza potvrdila odlišnost vybraných izolátů OYDV původem z cibule a česneku, které se vyvětvily, s jedinou výjimkou, do dvou samostatných skupin, v souladu se zjištěnou nukleotidovou identitou. Porovnáním genomových sekvencí studovaných izolátů spolu s dalšími izoláty OYDV z databáze GenBank byla variabilita byla zjištěna v oblastech kódující proteiny P1, P3, plášťový protein (CP) a také v oblasti 3'UTR u izolátů získaných z cibule a v oblastech kódujících P1, HC-Pro, P3, CI, CP a 3'UTR oblasti u izolátů původem z česneku.

8 Literatura

- Abd El-Wahab, A. S. (2009):** Aphid-transmission efficiency of two main viruses on garlic in Egypt, *Onion yellow dwarf virus* (OYDV-G) and *Leek yellow stripe virus* (LYSV-G). *Academic Journal of Entomology* 2(1): 40-42.
- Abd El-Wahab, A. S., Elnagar, S., El-Sheikh, M. A. K. (2009):** Incidence of aphid-borne *Onion yellow dwarf virus* (OYDV) in *Alliaceae* crops and associated weeds in Egypt. In: 4th Conference on Recent Technologies in Agriculture, p. 21-33.
- Adams, M. J., Antoniw, J. F., Fauquet, C. M. (2005):** Molecular criteria for genus and species discrimination within the family *Potyviridae*. *Archives of Virology* 150(3): 459-479.
- Alves, M. J., Marraccini, F. M., Melo Filho P. A., Dusi, A. N., Pio-Ribeiro, G., Ribeiro, B. M. (2008):** Recombinant expression of *Garlic virus C* (GARV-C) capsid protein in insect cells and its potential for the production of specific antibodies. *Microbiological Research* 163(3): 354-361.
- Andersen, K., Johansen, I. E. (1998):** A single conserved amino acid in the coat protein gene of *Pea seed borne mosaic potyvirus* modulates the ability of the virus to move systemically in *Chenopodium quinoa*. *Virology* 241(2): 304-311.
- Arya, M., Baranwal, V. K., Ahlawat, Y. S., Singh, L. (2006):** RT-PCR detection and molecular characterization of *Onion yellow dwarf virus* associated with garlic and onion. *Current Science* 91(9): 1230-1234.
- Baghalian, K., Kim, O. K., Natzuaki, K. T. (2010):** Molecular variability and genetic structure of the population of *Onion yellow dwarf virus* infecting garlic in Iran. *Virus Genes* 41: 282-291.
- Bagi, F., Stojšin, V., Budakov, D., Moh. A. El Swaeh, S., Gvozdanović-Varga J. (2012):** Effect of *Onion yellow dwarf virus* (OYDV) on yield components of fall garlic (*Allium sativum* L.) in Serbia. *African Journal of Agricultural Research* 7(15): 2386-2390.
- Berger, P. H., Pirone, T. P. (1986):** The effect of helper komponent on the uptake and localization of potyviruses in *Myzus persicae*. *Virology* 153(2): 256-261.
- Bos, L. (1976):** *Onion yellow dwarf virus*. CMI/AAB Description of Plant Viruses, p. 158.
- Bos, L. (1981):** *Leek yellow stripe virus*. CMI/AAB Description of Plant Viruses, p: 240.
- Bos, L., Huijberts, N., Huttinga, H., Maat, D. Z. (1978):** *Leek yellow stripe virus* and its relationships to *Onion yellow dwarf virus*; characterization, ecology and possible control. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 84: 185-204.

- Brunt, A., Crabtree, K., Dallwitz, M. J., Gibbs, A. J., Watson, L. (1996):** Viruses of Plants. CAB International, Wallingford, UK, p. 856-858.
- Cafrune, E. E., Perotto, M. C., Conci, V. C. (2006):** Effect of two *Allexivirus* isolates on garlic yield. *Plant Disease* 90: 898-904.
- Canavelli, A., Nome, S., Conci V. C. (1998):** Incidencia de las virosis en cultivos de ajo Rosado Paraguayo. *Fitopatologia Brasileira* 23: 354-358.
- Carrington, J. C., Cary, S. M., Parks, T. D., Dougherty, W. G. (1989):** A second proteinase encoded by a plant potyvirus genome. *The EMBO Journal* 8(2): 365-370.
- Celli, M. G., Torrico, A. K., Kiehr, M., Conci, V. C. (2013):** Striking differences in the biological and molecular properties of onion and garlic isolates of *Onion yellow dwarf virus*. *Archives of Virology* 158: 1377-1382.
- Clark, F. M., Adams, N. A. (1977):** Characteristics of the micro-plates methods of Enzyme Linked Immunosorbent Assay for detection of plant viruses. *Journal of General Virology* 34: 475-483.
- Conci, V. C., Helguera, M., Nome, S. F. (1999):** Serological and biological comparison of *Onion yellow dwarf virus* from onion and garlic in Argentina. *Fitopatologia Brasileira* 24: 73-75.
- Conci, V. C., Lunello P., Buraschi, D., Italia, R. R., Nome, S. F. (2002):** Variations of *Leek yellow stripe virus* concentration in garlic and its incidence in Argentina. *Plant Disease* 86: 1085-1088.
- Dallot, S., Quiot-Douine, L., Sáenz, P., Cervera, M. T., García, J.-A., Quiot, J.-B. (2001):** Identification of *Plum pox virus* determinants implicated in specific interactions with different *Prunus* spp. *Phytopathology* 91: 159-164.
- Daniels, J. (1999):** Occurrence of viruses in garlic in the state of Rio Grande de Sul, Brazil. *Fitopatologia Brasileira* 24: 91.
- Dolja, V. V., Haldeman-Cahill, R., Montgomery, A. E., Vandenbosch, K. A., Carrington, J.C. (1995):** Capsid protein determinants involved in the cell-to cell and long distance movement of *Tobacco etch potyvirus*. *Virology* 206(2): 1007-1016.
- Dolja, V. V., Haldeman-Cahill, R., Robertson, N. L., Dougherty, W. G., Carrington, J. C. (1994):** Distinct functions of capsid protein in assembly and movement of *Tobacco etch potyvirus* in plants. *EMBO Journal* 13(6): 1482-1491.
- Dougherty, W. G., Carrington, J. C. (1988):** Expression and function of potyviral gene products. *Annual Review of Phytopathology* 26: 123-143.

- Dovas, C. I., Hatziloukas, E., Salomon, R., Barg, E., Shibolet, Y., Katis, N. I. (2001):** Incidence of viruses infecting *Allium* spp. in Greece. *European Journal of Plant Pathology* 107: 677-684.
- Dovas, C. I., Mamolos, A. P., Katis, N. I. (2002):** Fluctuations in concentration of two potyviruses in garlic during the growing period and sampling conditions for reliable detection by ELISA. *Annals of Applied Biology* 140: 21-28.
- Dovas, C. I., Vovlas, C. (2003):** Viruses infecting *Allium* spp. in southern Italy. *Journal of Plant Pathology* 85(2): 135.
- Duchoslavová, J. (2008):** Molekulárně biologická charakteristika zástupců rodu *Potyvirus* infikujících rostliny česneku (*Allium sativum* L.). Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc.
- Edwardson, J. R. (1974):** Some properties of the *Potato virus Y* group. *Florida Agricultural Experiment Stations monograph series* 4: 185-187.
- Fajardo, T. V. M., Nishijima, M., Buso, J. A., Torres, A. C., Avila, A. C., Resende, R. O. (2001):** Garlic viral complex: Identification of *Potyvirus* and *Carlavirus* in central Brazil. *Fitopatologia Brasileira* 26: 619-626.
- FAOSTAT (2013):** Food and Agricultural Organisation. (<http://faostat.org>)
- Fayad-André, M., Dusi, A. D., Resende, R. O. (2011):** Spread of viruses in garlic fields cultivated under different agricultural production systems in Brazil. *Tropical Plant Pathology* 36: 341-349.
- Gibbs, A., Ohshima K. (2010):** Potyviruses and the digital revolution. *Annual Review of Phytopathology* 48: 205-223.
- Gorbalenya, A. E., Koonin, E. V., Donchenko, A. P., Blinov, V. M. (1988):** A novel superfamily of nucleoside triphosphate-binding motif containing protein which are probably involved in duplex unwinding in DNA and RNA replication and recombination. *FEBS Letters* 235: 16-24.
- Gorgolová, Z. (2009):** Variabilita nukleotidových sekvencí viru žluté zakrslosti cibule (OYDV) a experimentální okruh hostitelů. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc.
- Gvozdanović-Varga, J., Vasić, M., Takač, A., Bugarski, D., Jovičević, D., Červenski, J., Stojšin, V. (2009):** Garlic production from the aspect of planting material. A periodical of scientific research on field and vegetable crops 46: 99-109.

- Hjulsager, C. K., Olsen, B. S., Jensen, D. M., Cordea, M., I., Krath, B. N., Johansen, I. E., Lund, O. S. (2006):** Multiple determinant in the coding region of *Pea seed-borne mosaic virus* P3 are involved in virulence against sbm-2 resistance. *Virology* 355(1): 52-61.
- Hollings, M., Brunt, A. A. (1981):** Potyviruses. In *Handbook of Plant Virus Infections and Comparative Diagnosis*, p. 731-807.
- Hong, X. Y., Chen, J., Shi, Y. H, Chen, J. P. (2007):** The '6K1' protein of a strain of *Soybean mosaic virus* localizes to the cell periphery. *Archives of Virology* 152(8): 1547-1551.
- Chen J., Adams M. J., Zheng H. Y., Chen J. P. (2003):** Sequence analysis demonstrates that *Onion yellow dwarf virus* isolates from China contain a P3 region much larger than other potyviruses. *Archives of Virology* 148: 1165-1173.
- Chen, J., Chen, J., Adams, M. J. (2001):** A universal PCR primer to detect members of the *Potyviridae* and its use to examine the taxonomic status of several members of the family. *Archives of Virology* 146(4): 757-766.
- Chodorska, M., Paduch-Cichal, E., Kalinowska, E., Szyndel, M. S. (2014):** First report of *Onion yellow dwarf virus*, *Garlic common latent virus* and *Shallot latent virus* on garlic in Poland. *Plant Disease* 98: 858.
- Chung B. Y., Miller, W. A., Atkins, J. F., Firth, A. E. (2008):** An overlapping essential gene in the *Potyviridae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105: 5897-5902.
- ICTV (2014):** EC 46, Montreal, Canada (MSL #29). (<http://ictvonline.org>)
- ICTVdB Management (2006).** 00.057. Potyviridae. In: *ICTVdB - The Universal Virus Database*, version 3. Büchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA
- Jenner, C. E., Tomimura, K., Ohshima, K., Hughes, S. L., Walsh, J. A. (2002):** Mutations in *Turnip mosaic virus* P3 and cylindrical inclusion proteins are separately required to overcome two *Brassica napus* resistance genes. *Virology* 300(1): 50-59.
- Johansen, I. E., Lund, O. S., Hjulsager, C. K., Laursen, J. (2001):** Recessive resistance in *Pisum sativum* and potyvirus pathotype resolved in a gene-for-cistron correspondence between host and virus. *Journal of Virology* 75(14): 6609–6614.
- Kehoe, M. A., Coutts, B. A., Buirchell, B. J., Jones, R. A. C. (2014):** Split personality of a *Potyvirus*. To specialize or not to specialize? *PLoS ONE* 9(8): 1-7
- Keusgen, M. (2002):** Health and *Alliums*. In: Rabinowitch H. D., Currah L. (eds.) *Allium Crop Science: Recent Advances*, CAB International, Collinwood, USA p. 357-378.

- King, A. M. O., Adams, M. J., Carstens, E. B., Lefkowitz, E. J. (eds.) (2012):** Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, Elsevier, San Diego, USA, p. 1069-1089.
- Klukáčková, J., Navrátil, M., Duchoslav, M. (2007):** Natural infection of garlic (*Allium sativum* L.) by viruses in the Czech Republic. Journal of Plant Diseases and Protection 114(3): 97-100.
- Kumar, S., Baranwal, V. K., Joshi, S., Arya, M., Majumder, S. (2010):** Simultaneous detection of mixed infection of *Onion yellow dwarf virus* and an *Allexivirus* in RT-PCR for ensuring virus free onion bulbs. Indian Journal of Virology 21(1): 64-68.
- Laín, S., Riechmann, J. L., Garcia, J. A. (1990):** RNA helicase: a novel activity associated with a protein encoded by a positive strand RNA virus. Nucleic Acids Research 18(23): 7003-7006.
- Langenberg, W. G., Zhang, L. (1997):** Immunocytology shows the presence of *Tobacco Etch Virus* P3 protein in nuclear inclusions. Journal of Structural Biology 118: 243-247.
- Lawson, R. H., Hearon, S. S. (1971):** The association of pinwheel inclusions with plasmodesmata. Virology 44(2): 454-456
- Lee, K. C., Wong, S. M. (1998):** Variability of P1 protein of *Zucchini Yellow Mosaic Virus* for strain differentiation and phylogenetic analysis with other potyviruses. Mitochondrial DNA 9: 275-293.
- Lopez-Moya, J. J., Pirone, T. P. (1998):** Charge changes near the N terminus of the coat protein of two potyviruses affect virus movement. Journal of General Virology 79: 161-165.
- Lot, H., Chovelon, V., Souche, S., Delecolle, B. (1998):** Effects of *Onion yellow dwarf* and *Leek yellow stripe viruses* on symptomatology and yield loss of three garlic cultivars. Plant Disease 82: 1381-1385.
- Mahmoud, S. Y. M., Abo-El Maaty, S. A., El-Borollosy, A. M., Abdel-Ghaffar, M. H. (2007):** Identification of *Onion yellow dwarf virus* as one of the major viruses infecting garlic in Egypt. American-Eurasian Journal Agricultural and Environmental Sciences 2(6): 746-755.
- Maiss, E., Timpe, U., Brisske, A., Jelkmann, W., Casper, R., Himmler, G., Mattanovich, D., Katinger, H. W. (1989):** The complete nucleotide sequence of *Plum pox virus* RNA. Journal of General Virology 70: 513-524.
- Majumder, S., Baranwal, V. K. (2014):** Simultaneous detection of four garlic viruses by multiplex reverse transcription PCR and their distribution in Indian garlic accessions. Journal of Virological Methods 202: 34-38.

- Majumder, S., Baranwal, V. K., Joshi, S. (2008):** Simultaneous detection of *Onion yellow dwarf virus* and *Shallot latent virus* in infected leaves and cloves of garlic by duplex RT-PCR. *Journal of Plant Pathology* 90(2): 371-374.
- Mohan, S. K., Schwartz, H. F. (2005):** Diseases of onion (*Allium cepa* L.) and garlic (*A. sativum* L.). The American Phytopathological Society Press.
- Novák, J. B. (1959):** Příspěvek k poznání viróz cibulové zeleniny v ČSSR. Sborník VŠZ Praha
- Riechmann, J. L., Lain, S., Garcia, J. A. (1992):** Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. *Journal of General Virology* 73: 1-16.
- Rodríguez-Cerezo, E., Ammar, E. D., Pirone, T. P., Shaw, J. G. (1993):** Association of the nonstructural P3 viral protein with cylindrical inclusions in potyvirus-infected cells. *Journal of General Virology* 74: 1945-1949.
- Rouxel, T., Balesdent, M.-H. (2010):** Avirulence genes. In *Encyclopedia of Life Sciences*, John Wiley & Sons Ltd, Chichester.
- Sáenz, P., Cervera, M. T., Dallot, S., Quiot, L., Quiot, J.-B., Riechmann, J. L., García, J. A. (2000):** Identification of a pathogenicity determinant of *Plum pox virus* in the sequence encoding the C-terminal region of protein P3+6K1. *Journal of General Virology* 81: 557-566.
- Sevik, M. A., Akcura, C. (2013):** Viruses occurring in onion crop in Amasya province, the major onion producing region in Turkey. *Indian Journal of Virology* 24(1): 78-81.
- Shi, Y., Chen, J., Hong, X., Chen, J., Adams, M. J. (2007):** A potyvirus P1 protein interacts with the Rieske Fe/S protein of its host. *Molecular Plant Pathology* 8(6): 785-790.
- Shiboleth, Y. M., Gal-On, A., Koch, M., Rabinowitch, H. D., Salomon, R. (2001):** Molecular characterisation of *Onion yellow dwarf virus* (OYDV) infecting garlic (*Allium sativum* L.) in Israel: Thermotherapy inhibits virus elimination by meristem tip culture. *Annals of Applied Biology* 138: 187-195.
- Shukla, D. D., Frenkel, M. J., Ward, C. W. (1991):** Structure and function of the potyvirus genome with special reference to the coat protein coding region. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 13: 178-191.
- Shukla, D. D., Ward C. W. (1988):** Amino acid sequence homology of coat proteins as a basis for identification and classification of the *Potyvirus* group. *Journal of General Virology* 69: 2703-2710.
- Shukla, D. D., Ward, C. W. (1989):** Structure of potyvirus coat proteins and its application in the taxonomy of the *Potyvirus* group. *Advances in Virus Research* 36: 273-314.
- Shukla, D. D., Ward, C. W., Brunt, A. A. (1994):** The *Potyviridae*. CAB International, Wallingford, UK: 516 pp.

- Soliman, A. M., Mahmoud, S. Y. M, Dawood, R. A. (2012):** Molecular characterization of *Onion yellow dwarf virus* (garlic isolate) with production of virus-free plantlets. *International Journal of Virology* 8: 61-70.
- Stenger, D. C., French, R., Gildow, F. E. (2005):** Complete deletion of *Wheat Streak Mosaic Virus* HC-Pro: A null mutant is viable for systemic infection. *Journal of Virology* 79(18): 12077-12080.
- Suehiro, N., Natsuaki, T., Watanabe, T., Okuda, S. (2004):** An important determinant of the ability of *Turnip mosaic virus* to infect *Brassica* spp. and/or *Raphanus sativum* is in its P3 protein. *Journal of General Virology* 85: 2087-2098.
- Takaichi, M., Nagakubo, T., Oeda, K. (2001):** Mixed virus infection of garlic determined by a multivalent polyclonal antiserum and virus effects on disease symptoms. *Plant Disease* 85: 71-75.
- Takaichi, M., Yamamoto, M., Nagakubo, T., Oeda, K. (1998):** Four Garlic Viruses Identified by Reverse transcription-Polymerase chain reaction and their regional distribution in northern Japan. *Plant Disease* 82: 694-698.
- Takaki, F., Sano, T., Yamashita, K. (2006):** The complete nucleotide sequence of attenuated *Onion yellow dwarf virus*: a natural potyvirus deletion mutant lacking the N-terminal 92 amino acids of HC-Pro. *Archives of Virology* 151: 1439-1445.
- Tóbiás, I., Palkovics, L., Tzekova, L., Baláz s, E. (2001):** Replacement of the coat protein gene of *Plum pox potyvirus* with that of *Zucchini yellow mosaic potyvirus*: characterization of the hybrid potyvirus. *Virus Research* 76(1): 9-16.
- Tsuneyoshi, T., Ikeda, Y., Sumi, S. (1997):** Nucleotide sequences of the 3' terminal region of *Onion yellow dwarf virus* isolates from *Allium* plants in Japan. *Virus Genes* 15(1): 73-77.
- Tsuneyoshi, T., Matsumi, T., Natsuaki, K. T., Sumi, S. (1998):** Nucleotide sequence analysis of virus isolates indicates the presence of three potyvirus species in *Allium* plants. *Archives of Virology* 143: 97-113.
- Ullah, Z., Chai, B., Hammar, S., Raccah, B., Gal-On, A., Grumet, R. (2003):** Effect of substitution of the amino termini of coat protein of distinct potyvirus species on viral infectivity and host specificity. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 63: 129-139.
- Van der Vlugt, R. A. A., Bowen, I. (1997):** Identification of potyviruses infecting *Alstroemeria*. In Dehne, H. W., Adam, G., Diekmann, M., Frahm, J., Mauler-Machnik, A., Van Haltaren, P. (Eds): *Diagnosis and identification of plant pathogens*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands, p. 465-467.

- Van der Vlugt, R. A. A., Steffens, P., Cuperus, C., Barg, E., Lesemann, D.-E., Bos, L., Vetten, H. J. (1999):** Further evidence that *Shallot yellow stripe virus* (SYSV) is a distinct potyvirus and reidentification of *Welsh onion yellow stripe virus* as SYSV strain. *Phytopathology* 89(2): 148-155.
- Van Dijk, P. (1993a):** Survey and characterization of potyviruses and their strains in *Allium* species. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 99 Supplement 2: 1-48.
- Van Dijk, P. (1993b):** Carlavirus isolates from cultivated *Allium* species represent free viruses. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 99: 233-257.
- Van Dijk, P. (1994):** Virus diseases of *Allium* species and prospects for their control. *Acta Horticulturae* 358: 299-306.
- Walkey, D. G. A., Antill, D. N. (1989):** Agronomic evaluation of virus-free and virus infected garlic (*Allium sativum* L.). *Journal of Horticultural Science* 64: 53-60.
- Wallis, C. M., Stone, A. L., Sherman, D. J., Damsteegt, V. D., Gildow, F. E., Schneider, W. L. (2007):** Adaptation of *Plum pox virus* to a herbaceous host (*Pisum sativum*) following serial passages. *Journal of General Virology* 88: 2839-2845.
- Wang, D., Maule, A. J. (1995):** Inhibition of host gene expression associated with plant virus replication. *Science* 267(5195): 229-231.
- Ward C. W., Shukla, D. D. (1991):** Taxonomy of potyviruses: Current problems and some solutions. *Intervirology* 32: 269-296.
- Winiarczyk, K., Solarska, E., Sienkiewicz, W. (2014):** Prevalence of infection with *Onion yellow dwarf virus*, *Leek yellow stripe virus* and *Garlic common latent virus* in plants from the genus *Allium*. *Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus* 13(3): 123-133.
- Yang, C., Guo, R., Jie, F., Nettleton, D., Peng, J., Carr, T., Yeakley, J. M., Fan, J. B., Whitham, S. A. (2007):** Spatial analysis of *arabidopsis thaliana* gene expression in response to *Turnip mosaic virus* infection. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 20: 358-370.

9 Seznam použitých zkratk a symbolů

Acc. No.	přístupové číslo, <i>accession number</i>
AK	aminokyselina(y)
AMV	<i>Avian Myeloblastosis Virus</i>
ATP	adenosintrifosfát
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	páry bází, <i>base pairs</i>
BYMV	<i>Bean yellow dwarf virus</i>
cDNA	komplementární DNA, <i>complementary DNA</i>
DAS-ELISA	<i>double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbant assay</i>
dEPC	diethylpyrokarbonát, <i>diethylpyrocarbonate</i>
dH ₂ O	destilovaná voda, <i>distilled water</i>
dNTP	dinukleotidtrifosfát, <i>deoxyribonucleotide triphosphate</i>
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
eIF4E	<i>eukaryotic translation initiation factor 4E</i>
FAOSTAT	Food and Agriculture Organization of the United Nations
GaCSV	<i>Garlic common stripe virus</i>
GarCLV	<i>Garlic common latent virus</i>
ICTVdB	The International Committee on Taxonomy of Viruses database
IYSV	<i>Iris yellow spot virus</i>
LYSV	<i>Leek yellow stripe virus</i>
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ORF	čtecí rámeček, <i>open reading frame</i>
OYDV	<i>Onion yellow dwarf virus</i>
PCR	polymerázová řetězová reakce, <i>polymerase chain reaction</i>
PPV	<i>Plum pox virus</i>
PSbMV	<i>Pea seed-borne mosaic virus</i>
PVP K-25	polyvinylpyrrolidon K-25
RT	reverzní transkripce, <i>reverse transcription</i> /reverzní transkriptáza, <i>reverse transcriptase</i>
SLV	<i>Shallot latent virus</i>
ssRNA	jednovláknová RNA, <i>single-stranded RNA</i>

SYSV	<i>Shallot yellow stripe virus</i>
TAE pufr	Tris-acetate-EDTA pufr
TEV	<i>Tobacco etch virus</i>
TRIS	2-amino-2-hydroxymethylpropan-1,3-diol
TuMV	<i>Turnip mosaic virus</i>
TVMV	<i>Tobacco vein mottling virus</i>
UTR'	netranslatovaná oblasť, <i>untranslated region</i>
VÚRV	Výzkumný ústav rostlinné výroby
WMV	<i>Watermelon mosaic virus</i>
WoYSV	<i>Welsh onion yellow stripe virus</i>
WYDV	<i>Wakegi yellow dwarf virus</i>
ZYMV	<i>Zucchini yellow mosaic virus</i>