

**Univerzita Palackého v Olomouci**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra buněčné biologie a genetiky**



## **Viry řas a sinic**

**Bakalářská práce**

**Klára Ptošková**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2015**

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

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením prof. RNDr. Milana Navrátila, CSc. a uvedla jsem veškerou použitou literaturu.

V Olomouci:.....

Podpis:.....

Tímto bych chtěla poděkovat prof. RNDr. Milanu Navrátilovi, CSc. za odborné vedení a pomoc s vypracováním bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Daně Šafářové, Ph.D. a Janě Veselské za pomoc v laboratoři při práci na experimentální části. Za poskytnutí zkoumaného materiálu děkuji doc. RNDr. Petru Hašlerovi, Ph.D. Stejně tak děkuji Interní grantové agentuře Univerzity Palackého (IGA\_PrF\_2014004) za podporu.

## SOUHRN

Viry jsou podstatnou a všudypřítomnou součástí vodního prostředí, ve kterém se účastní mnoha důležitých dějů. Koncentrace virových částic nalezených ve vodě je velmi vysoká v mořských i sladkovodních ekosystémech. Jejich pravděpodobně nejvýznamnějšími hostiteli jsou řasy a sinice. Jelikož jsou tyto primární producenti ekologicky významné organismy, jejich virové infekce se projevují globálně. Viry snižují primární produkci, čímž dochází k přesměrování toku živin a tím ke změnám v potravních řetězcích koloběžích organických látek. Intenzivně je zkoumána virová aktivita při výskytu sinicových vodních květů v řekách, jezerech, rybnících a vegetačního zákalu způsobeného převážně řasami v mořích. Zvýšený počet virů ve vodních květech a vegetačním zákalu byl mnohokrát dokázán a jejich zánik je s viry často spojován. Narůstající zájem o viry ve vodním prostředí napovídá, že se jedná o důležité biologické agens, které ovlivňují ekologicky významné děje i hostitele samotné.

V bakalářské práci byla přítomnost virů detekována ve vzorcích obsahující sinice a řasy původem z České Republiky a Spojených států amerických. Byla využita nested PCR s primery AVS 1, AVS2 a POL. Sekvence pozitivních vzorků byly porovnány s dostupnými sekvencemi v databázi GenBank. Ve vzorcích z vodního prostředí byl potvrzen výskyt dvou virů. Ukázalo se, že použité primery jsou nespecifické, protože amplifikují i nevirovou DNA.

## **SUMMARY**

Viruses are ubiquitous and essential part of the aquatic environment where they are involved in many important processes. The concentration of viral particles found in water is very high in marine and freshwater ecosystems. Their probably the most important hosts are algae and cyanobacteria. Since these major producers are ecologically important organisms, their viral infections manifest themselves globally. Viruses reduce primary production, thereby redirecting the flow of nutrients and thus it leads to change in food webs and cycling of organic substances. Viral activity in the presence of cyanobacterial blooms in rivers, lakes, ponds and harmful algal blooms caused mainly by algae in the oceans is investigated intensively. Increased number of viruses in water blooms was provided many times and its demise is often associated with viruses. Growing interest in viruses in the aquatic environment suggests that they are important biological agents that affect environmentally important processes as well as their hosts.

In this thesis the viruses were detected in samples containing cyanobacteria and algae originally from the Czech Republic and the United States. Nested PCR with primers AVS1, AVS2 and POL was used. Sequences of positive samples were compared with sequences available in the GenBank database. Two viruses were found and it was confirmed that the used primers are non-specific because they amplify also non-viral DNA.

# OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b> .....	8
<b>2</b>	<b>CÍL PRÁCE</b> .....	9
<b>3</b>	<b>LITERÁRNÍ PŘEHLED</b> .....	10
3.1	VIRY VE VODNÍM PROSTŘEDÍ .....	10
3.1.1	Objev virů řas a sinic .....	10
3.1.2	Výskyt virů ve vodním prostředí .....	11
3.1.3	Vliv virů na hostitelská společenstva a jejich genovou diverzitu.....	11
3.1.4	Vliv virů na vodní ekosystémy .....	12
3.1.5	Rezistence k virové infekci.....	13
3.1.6	Viry ve slaných vodách .....	14
3.1.7	Viry ve sladkých vodách .....	15
3.2	KLASIFIKACE VIRŮ ŘAS A SINIC .....	17
3.2.1	Viry řas .....	17
3.2.1.1	Charakteristika rodu <i>Chlorovirus</i> .....	17
3.2.1.2	Charakteristika rodu <i>Prasinovirus</i> .....	18
3.2.1.3	Charakteristika rodu <i>Prymnesiovirus</i> .....	18
3.2.1.4	Charakteristika rodu <i>Phaeovirus</i> .....	18
3.2.1.5	Charakteristika rodu <i>Raphidovirus</i> .....	19
3.2.1.6	Charakteristika rodu <i>Coccolithovirus</i> .....	19
3.2.2	Viry sinic .....	20
3.3	METODY DETEKCE VIRŮ .....	20
3.3.1	Mikroskopické metody .....	20
3.3.2	Fluorescenční metody.....	21
3.3.3	Molekulární metody .....	22
<b>4</b>	<b>MATERIÁL A METODY</b> .....	23
4.1	BIOLOGICKÝ MATERIÁL .....	23
4.2	IZOLACE DNA ZE VZORKŮ .....	24
4.3	NESTED PCR .....	24
4.4	ELEKTROFORÉZA V 1% AGARÓZOVÉM GELU .....	25
4.5	IZOLACE PCR PRODUKTŮ Z GELU .....	26
4.6	KLONOVÁNÍ PCR PRODUKTU .....	26

4.6.1	Ligace PCR produktu a transformace <i>E. coli</i> bakterií.....	26
4.6.2	Testování pozitivních kolonií pomocí PCR reakce.....	27
4.7	SEKVENCOVÁNÍ A SEKVENAČNÍ ANALÝZA .....	28
4.8	SEZNAM POUŽITÝCH CHEMIKÁLIÍ.....	29
4.9	SEZNAM POUŽITÝCH ROZTOKŮ A JEJICH SLOŽENÍ.....	30
4.10	SEZNAM POUŽITÝCH PŘÍSTROJŮ .....	31
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY</b> .....	<b>33</b>
5.1	DETEKCE VIRŮ VE VZORCÍCH .....	33
<b>6</b>	<b>DISKUZE</b> .....	<b>43</b>
<b>7</b>	<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>46</b>
<b>8</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK</b> .....	<b>47</b>
<b>10</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b> .....	<b>48</b>

# 1 Úvod

V posledních 30 letech byl zvýšen zájem o viry vyskytující se ve vodním prostředí, jelikož se ukazuje, že výrazně ovlivňují ekosystémy slaných i sladkých vod. Významné jsou především viry řas a sinic. Negativní dopad virů na vodní ekosystémy spočívá hlavně v usmrcování bakterií a fytoplanktonu, což vede ke změnám složení v jejich společenstvech a následně k narušení potravních řetězců i koloběhu organických látek. Bylo zjištěno, že viry vyskytující se ve vodním prostředí, jsou schopny ovlivňovat své hostitelské populace a rozšiřovat jejich genovou diverzitu pomocí horizontálního přenosu genů. Většina studií se soustředí na mořské a oceánské vody, avšak málo informací je zatím dostupných o viromech sladkovodních ekosystémů.

Tato bakalářská práce se zabývá problematikou virů napadajících řasy a sinice slaných i sladkých vod. Cílem práce bylo podat podrobnější poznatky o těchto virech s důrazem na jejich výskyt ve sladkých vodách.



## **2 Cíl práce**

Cílem této bakalářské práce bylo vypracovat literární rešerši na téma viry řas a sinic se zaměřením na sladkovodní ekosystémy. V praktické části bylo úkolem detekovat viry sinic a řas ve vzorcích sladkých vod z území České Republiky a Spojených států amerických. Záměrem bylo optimalizovat metodu vhodnou k izolaci virů ze vzorků obsahující řasy a sinice, prokázat jejich přítomnost s využitím PCR reakce a pomocí sekvencování určit jejich identitu.

## 3 Literární přehled

### 3.1 Viry ve vodním prostředí

Voda je nezbytnou podmínkou života na Zemi, jejíž povrch pokrývá ze 71 %. Vodní prostředí je bohaté na nejrůznější makro i mikroorganismy a jejich přirozené parazity - viry. Viry ve vodním prostředí, stejně jako ostatní viry, mají různou morfologickou stavbu a ve svém genomu obsahují jednovláknovou či dvouvláknovou DNA nebo RNA. Vykazují různé životní strategie, které jsou závislé na vnitrobuněčných mechanismech v hostiteli a mohou infikovat členy tří domén buněčného života: *Bacteria*, *Archaea* a *Eukarya* (Sime - Ngando, 2014).

#### 3.1.1 Objev virů řas a sinic

První důkaz, že viry mohou napadat primární producenty ve vodním prostředí, byl podán v práci Safferman *et* Morris (1963), kteří izolovali podovirus LPP-1 napadající vláknité sinice rodu *Lyngbya*, *Plectonema* a *Phormidium* z čistírny odpadních vod v Indianě, USA. V následujících letech byla skupina virů LPP-1 nalezena na mnoha sladkovodních stanovištích a byli izolováni a popsáni další cyanofágové, například myovirus AS-1 infikující jednobuněčné řasy *Anacystis* a *Synechococcus*, a siphovirus S-1 napadající *Synechococcus* (Baker *et al.*, 2006). Později byly objeveny i viry sladkovodních řas, které byly popsány v několika publikacích. Mezi prvními Lee (1971) izoloval a popsal polyhedrické částice velké 50 až 60 nm z červené řasy *Sirodotia tenuissima*. Pickett-Heaps (1972) podal zprávu o nálezu polyhedrické částice s průměrem 240 nm izolované ze zelené řasy *Oedogonium* sp. Následoval objev prvního viru infikujícího mořskou řasu, který izolovali Toth *et* Wilc (1972) ze sporů hnědé řasy *Chorda tomentosa*. Pravděpodobně nejdůležitější událostí bylo charakterizování skupiny virů napadajících sladkovodní, jednobuněčnou zelenou řasu *Chlorella* (Meints *et al.*, 1981). Do současné doby byly viry izolovány z různých sinic a minimálně 44 taxonů eukaryotických řas (Van Etten *et al.*, 1991). Studie s pomocí genetických markerů a virálního genu pro DNA polymerázu ukázaly, že viry řas a sinic jsou různorodé a ve vodním prostředí všudypřítomné (Wilson *et al.*, 2009).

### 3.1.2 Výskyt virů ve vodním prostředí

Výskyt virů ve vodním prostředí je předmětem mnoha studií, které se snaží zjistit přesný počet virových částic, jejich biologickou variabilitu a genetickou diverzitu. Viry jsou běžně považovány za nejpočetnější biologickou složku slaných i sladkých vod. Mezi prvními Chen *et Suttle* (1995) uvedli, že obsah virových částic ve vodě se pohybuje v rozmezí  $10^6$  až  $10^8$  ml<sup>-1</sup>. Podle práce Fuhrman (1999) litr mořské vody obsahuje zhruba deset miliard částic.

Koncentrace virů je vyšší ve sladkých vodách než ve slaných (Maranger *et Bird*, 1995) a obecně stoupá s produktivitou vodního ekosystému. Weinbauer (2004) uvádí, že ve slaných vodách je jejich počet nejnižší v hlubokém moři ( $10^4$ - $10^5$  ml<sup>-1</sup>), nejvyšší v pobřežních oblastech ( $10^6$ - $10^7$  ml<sup>-1</sup>) a v ústí řek či některých velmi produktivních jezerech může být jejich koncentrace až  $10^8$  ml<sup>-1</sup>. Počet virů ve vodním prostředí se zdá být nezávislý na salinitě (Wilhelm *et Matteson*, 2008), ale je pravděpodobně ovlivněn některými biotickými faktory, jako je koncentrace chlorofylu *a*, obsah biomasy primárních a sekundárních producentů nebo zastoupení bakterií ve vodě (Alonso *et al.*, 2001; Cochlan *et al.*, 1993, Leff *et al.*, 1999). Nejvyšší obsah virů ve vodním prostředí ( $9,6 \times 10^8$  ml<sup>-1</sup>) byl naměřen ve vodních květech (Chen *et al.*, 2001). Bylo zjištěno, že sezónní vlivy, speciálně v jezerech, mnohem více ovlivňují počet virů ve sladkých vodách než v mořských (Wilhelm *et Matteson*, 2008). Například v horním toku řeky (Little River) a uměle vytvořeném jezeře (Fort Loudon Lake) v Tennessee, USA, byly pozorovány sezónní změny ve výskytu virů v průběhu roku 2003. V obou případech, byla hustota virů vysoká v průběhu jara a poklesla v chladnějších měsících (Wilhelm *et Matteson*, 2008).

### 3.1.3 Vliv virů na hostitelská společenstva a jejich genovou diverzitu

Viry kontrolují bakteriální produkci a fytoplankton, čímž ovlivňují složení společenstev bakterií i primárních producentů (Berg *et al.*, 1989; Suttle, 1994). Například lýze sinic ve vodním květu eutrofických vod vede ke snížení biomasy napadených sinic a je rovněž doprovázena změnou ve složení společenstev sinic i chemotrofních bakterií (Tijdens *et al.*, 2008). Viry jsou tak v jedinečné pozici, kdy mohou pozměňovat vzájemný poměr různých druhů nebo kmenů v hostitelských společenstvech. Způsobená infekce je závislá na hustotě populace a je taky druhově specifická. Viry difundují náhodně z hostitele na hostitele, proto málo zastoupení hostitelé jsou infikováni viry méně často než ti běžně se vyskytující. Z toho vyplývá, že pokud je konkrétní druh nebo kmen tvořen hustější populací, je více náchylný k virové infekci (Furman, 1999).

Kromě změn ve složení hostitelských společenstev jsou viry odpovědné za zvyšování genové diverzity hostitelů. Vzhledem k přítomnosti fágy-kódovaných biologických funkcí a výskytu rekombinací mezi fágy a hostitelskými geny se předpokládá, že přispívají i k vývojmikrobiálních druhů ve vodních ekosystémech (Sime-Ngando, 2014). Obecně jsou viry považovány za největší rezervoár genetické diverzity na světě (Suttle, 2005). Existují důkazy, že fág z jednoho prostředí může úspěšně napadnout a replikovat se v mořských mikroorganismech pocházejících z různých prostředí (Sano *et al.*, 2004). Tyto výsledky podporují hypotézu, že se viry pohybují v celém světě a přispívají tak k celosvětovému genofondu. Viry ve vodním prostředí mohou ovlivňovat genovou diverzitu a evoluci svých hostitelů tím, že se účastní horizontálního přenosu genů, při němž dochází k výměně genetické informace mezi dvěma nepříbuznými organismy.

Horizontální přenos genů, kterého se účastní viry, se označuje jako transdukce (Sime-Ngando, 2014). Podle Rohwer *et Thurber* (2009) je možné, že více než  $10^{24}$  genů ve světových oceánech je přenášeno transdukci z virů do hostitelů každý rok. Většina studií zabývajících se touto problematikou vyzdvihuje pouze negativní dopad virů, kdy se mění fyziologie jejich hostitelů. Nicméně virová infekce může rozšířit metabolismus, imunitu, distribuci a evoluci virových hostitelů v neočekávaných a potenciálně pozitivních směrech. Bylo zjištěno, že viry ve svém genomu mohou obsahovat i některé geny ze svých hostitelů. Je možné, že zhruba 10% z celkové fotosyntézy na planetě je zapříčiněno činností genů sinic rodu *Synechococcus* a *Prochlorococcus*, které jsou původem z fágů (Rohwer *et Thurber*, 2009). Dalším způsobem přenosu genetické informace zprostředkovaným viry je uvolněná DNA lyzovaných buněk, která může být zakomponována do jiného organismu přirozenou transformací (Fuhrman, 1999). Ve volné přírodě může tedy přenos genů pomocí virů představovat důležitý evoluční mechanismus (Sime-Ngando, 2014).

### **3.1.4 Vliv virů na vodní ekosystémy**

Většina virů ve vodním prostředí napadá mikroorganismy, jako jsou bakterie a archea (Weitz *et Wilhelm*, 2012). Takovými virům se v posledních letech věnuje největší pozornost, jelikož se ukazuje, že viry skrz své mikrobiální hostitele ovlivňují globální koloběh uhlíku a živin. Úmrtnost mikrobů vyvolaná viry má přímý vliv na funkci ekosystému. Lýze buněk způsobuje uvolňování organického uhlíku a dalších živin zpět do okolního prostředí. Toto přesměrování je známo jako „viral shunt“ a označuje stav, kdy buněčný materiál uvolněný jako částice nebo rozpuštěný organický materiál není využíván organismy na vyšších trofických úrovních (např. plankton a ryby), ale je primárně využit heterotrofními

bakteriemi (Weitz *et* Wilhelm, 2012). Celý proces vede k recyklaci živin v mikrobiálních smyčkách a také ovlivňuje složení heterotrofických bakteriálních společenstev (Tijdens *et al.*, 2008). Lýze organismů a uvolňování jejich obsahu do vody má další potenciální geochemické účinky díky fyzikálním a chemickým vlastnostem těchto částic (Furman, 1999). Ve většině sladkovodních ekosystémů je limitujícím faktorem rychlosti fotosyntetické fixace uhlíku fosfor. V anorganické formě je fosfor dostupný pro většinu primárních producentů a heterotrofů v pelagické vrstvě. Nicméně pokud je tento element uvolňován z mrtvých buněk virovou lýzí, jeho většina je vázána v organických komplexech, které vyžadují přítomnost enzymů (např. alkalické fosfytázy) k tomu, aby byl prvek re-asimilován (Wilhelm *et* Matteson, 2008).

Viry významně ovlivňují dominantní primární producenty řasy a sinice, kteří jsou považováni za základ většiny vodních potravních řetězců, podporují rybníkářství po celém světě, pomocí fotosyntézy uvolňují kyslík do atmosféry a vytváří ozónovou vrstvu (Gachon *et al.*, 2010). Potenciální vliv virů na vodní primární producenty vyplývá z pozorování interakcí mezi virem a hostitelem (Bratbak *et al.*, 1993). Bylo zjištěno, že mořská voda obohacená o 20% koncentrát nativních virů vede k redukci fytoplanktonové biomasy o 50 % a snížení primární produkce až o 78 % (Suttle *et al.*, 1990). Přesto je zánik fytoplanktonu zásluhou virů zkoumán méně než zánik bakterií (Gachon *et al.*, 2010).

### **3.1.5 Rezistence k virové infekci**

Hostitelé a patogeny přetrvávají v životním prostředí především díky molekulárním závodům ve zbrojení, přičemž viry mohou mít různý vliv na své hostitele, od posílení hostitelského fitness po smrt. Rezistence k virové infekci spočívá v mutacích strukturních receptorů, snížení jejich počtu nebo ve ztrátách receptorových míst (Sime-Ngando, 2014). Virové receptory na buněčném povrchu jsou komplexní rodiny proteinů, sacharidů nebo lipidů, které slouží pro normální fyziologické funkce buněk a jsou využity viry k jejich adsorbci. Existuje tzv. „Cheshire cat“ strategie, kdy rezistentní haploidní fáze řasy *Emiliana huxleyi* nekalcifikuje a je proto „neviditelná“ pro viry, narozdíl od diploidní fáze (Frada *et al.*, 2008). Podobně jsou chráněny řasy patřící mezi prymnesiophyta *Phaeocystis pouchetii*, které jsou rezistentní k virům, jelikož jsou obklopeny vnějším pláštěm, narozdíl od jednotlivých buněk (Brussaard *et al.*, 2007).

U bakterií, sinic a archeí je známo, že předcházejí virové replikaci získáváním „imunitního“ systému složeného z krátkých fragmentů cizí nukleové kyseliny rozmístěných do krátkých vmezeřených palindromatických repeticí (CRISPRs) v jejich

genomu. CRISPRs spacery mají homologii s mobilními genetickými elementy, jako jsou bakteriofágy či plazmidy a zajišťují rezistenci k virové infekci (Horvath *et* Barrangou, 2010; Thomas *et al.*, 2011). Celkově lze říci, že viry nutí hostitelská společenstva k rezistenci, kde výsledkem je koexistence vnímavých a rezistentních hostitelských buněk zajištěná kompromisem mezi konkurenceschopností a mortalitou (Sime-Ngando, 2014).

### 3.1.6 Viry ve slaných vodách

V mořských vodách jsou viry součástí virioplanktonu, což je dynamická složka planktonu, u které se rychle mění počet částic v závislosti na geografické poloze a prostředí. Předpokládá se, že virioplanktonová společenstva obsahují hlavně bakteriofágy a viry řas (Wommack *et* Colwell, 2000). Z toho vyplývá, že virová infekce významně ovlivňuje mořský fytoplankton složený převážně z řas a sinic. Nadměrná eutrofizace slaných vod může vést k přemnožení fytoplanktonu, které je spojeno se zhoršením kvality vody, toxicitou nebo úhynem organismů. Tento nežádoucí jev by mohl být kontrolován pomocí specifických mořských virů, které napadají fytoplankton. Řasa *Heterosigma akashiwo* rostoucí v pobřežních vodách subarktického a mírného pásu na severní i jižní polokouli často vytváří vegetační zákal tzv. „rudý příliv“. Její přemnožení, ačkoliv není nebezpečné pro člověka, vede však k úhynu ryb včetně lososa a pražmy v jejich chovech a tím k ekonomickým ztrátám. Nagasaki *et al.* (1999) v laboratorních podmínkách úspěšně použili klon *Heterosigma akashiwovirus* (HaV01) k usmrcení čtyř řas mořského fytoplanktonu (*H. akashiwo* H93616, *Chattonella antiqua*, *Heterocapsa triquetra*, *Ditylum brightwellii*). Při využití HaV01 na přírodní vzorky byla pozorována pouze malá inhibice růstu řas, jejímž pravděpodobným vysvětlením byla přítomnost rezistentních buněk, která by mohla být vyřešena přípravou dalších virových klonů. I když je HaV možné mikrobiální činidlo, pokud uvažujeme náklady a bezpečnost, účinky různých HaV klonů na přírodní populace *H. akashiwo* musí být posouzeny podrobněji, než bude tento virus použit k odstranění „rudého přílivu“. Další mořskou řasou, jejíž přemnožení má ekologické následky je *Emiliana huxleyi*, patřící mezi *Prymnesiophyceae*. Tyto řasy tvořící schránky ze šupinek kalcitu jsou schopné ovlivnit globální teplotu díky zvyšování Zemského albeda, což je míra odrazlivosti povrchu. U čerstvého sněhu je albedo až 90%, zatímco u oceánu je nízké. Zvýšení odrazu paprsků v oblasti oceánů má za následek snížení jeho teploty, navíc zvýšená produkce schránek z kalcitu (CaCO<sub>3</sub>) a jejich následné usazování na dně oceánů vede ke změnám v koloběhu uhlíku. *E. huxleyi* způsobuje masivní vegetační zákal na mořích, jež je díky odrazu světla ze schránek viditelný i ze satelitu. Tento zákal občas rapidně zmizí,

což je dááno do spojení svirovou infekcí, která se může na úmrtích podílet až 100 % (Bratbak *et al.*, 1993).

Brum *et al.* (2013) se ve své práci zabývali viry a jejich rozšířením v rámci světových moří a oceánů (Středozevní moře, Rudé moře, Arabské moře, Indický oceán, Atlantický oceán, Pacifický oceán). Zjistili, že morfologické vlastnosti virů se nemění v souladu s hloubkou ani lokalitou odběru vzorku, ale mění se v závislosti na teplotě, salinitě vody a koncentraci kyslíku. Viry bez bičíků, které se u pozorovaných vzorků nacházely v zastoupení 51 až 92 %, byly početnější. To je v rozporu s dřívějšími studiemi, které tvrdily, že většinové zastoupení mají viry s bičíkem (Ackermann, 2007; Wommack *et Colwell*, 2000). Společně tyto výsledky dokumentují globální charakteristiku mořských virů, jejichž variabilita je vysvětlena spíše podmínkami prostředí než geografickou oblastí výskytu a napovídají, že viry bez bičíku reprezentují ekologicky důležitý cíl.

### 3.1.7 Viry ve sladkých vodách

Bylo zjištěno, že viry se vyskytují v různých sladkovodních prostředích, zahrnující řeky (Farnell-Jackson *et Ward*, 2003), oligotrofní jezera (Klut *et Stockner*, 1990), mezotrofní jezera (Hennes *et Simon*, 1995), eutrofní jezera (Fischer *et Velimirov*, 2002) a další. Stejně jako viry v mořských vodách se i viry ve sladkých vodách seskupují ve virioplanktonu. Wilhelm *et Matteson* (2008) tvrdí, že tyto viry mají stejný globální význam jako ty mořské. Sladkovodním virům bylo zatím věnováno méně pozornost než virům ve slaných vodách, nicméně oblasti jejich výzkumu jsou velmi podobné. Je zkoumána jejich koncentrace ve vodě, diverzita a jejich vliv na ekosystém s důrazem na viry infikující fytoplankton (Maranger *et Bird*, 1995).

Van Etten *et al.* (1985) dokázali, že viry řas jsou zastoupeny ve sladkovodních ekosystémech ve vysoké koncentraci. Viry infikující *Chlorella*-like řasy byly detekovány ve 37 % sladkovodních vzorků. Vzorky vody byly odebírány po osm měsíců zhruba každý měsíc, což ukázalo kolísání obsahu virových částic v čase. Leff *et al.* (1999) studovali zastoupení virů v podzemních vodách Erijského jezera (USA). Zajímavým zjištěním bylo, že koncentrace virů byla o dva řády nižší ( $1,05 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ ) než ve většině sladkých vod ( $1,1 \times 10^8 \text{ ml}^{-1}$ ), ale byla podobná koncentraci virů ve většině mořských vod ( $1,05 \times 10^7 \text{ ml}^{-1}$ ).

Genetická diverzita sladkovodních virů z čeledi *Phycodnaviridae* byla zkoumána v práci Short *et Short* (2008) pomocí PCR a analýzou sekvencí. Ze vzorků získaných z řeky, dvou nádrží (Colorado, USA) a dvou různých jezer (Ontario, Kanada) bylo získáno množství sekvencí, které byly analyzovány. Bylo zjištěno, že genetická variabilita virů se liší mezi

vzorky odebranými z různých míst a mezi vzorky odebranými ze stejných lokalit v jiný čas. Fylogenetická analýza ukázala, že získané sekvence byly více podobné sekvencím mořských phycodnavirů, které patří do rodu *Prasinovirus*, než sladkovodním phycodnavirům patřícím do rodu *Chlorovirus*. Celkově sekvence izolovaných phycodnavirů z této studie nebyly odlišné od těch získaných z mořských phycodnavirů. Baker *et al.* (2006) využili PCR na detekci sladkovodních cyanofágů infikujících řasy *Anabaena* a *Nostoc*. Použití již existujících primerů (CPS1/2, CPS1/8, g20D2/CPS2), které byly navrženy pro detekci mořských cyanofágů nebylo úspěšné. Proto byly navrženy nové primery MCPF5 a MCPR5 amplifikující oblast genu kódujícího kapsidový protein (Major Capsid Protein - MCP) specifické pro sladkovodní cyanofágy. Ze studie vyplývá, že sladkovodní cyanomyoviry napadající vláknité sinice jsou velmi odlišné od mořských cyanomyovirů, které infikují jednobuněčné sinice a že MCP gen je u skupiny sladkovodní virů *Cyanomyoviridae* konzervován, nicméně v nukleotidové sekvenci dostatečně variabilní, aby mohl sloužit jako genetický marker při studiu diverzity cyanofágů.

Přestože sesladkovodní symbiotické řasy *Chlorella* vyskytují v symbióze s různými organismy živočišné říše, byly doposud viry izolovány jen z kmenů řas, které mají symbiotický vztah s *Paramecium bursaria* a *Hydra viridis*. Bubeck *et Pfitzner* (2005) izolovali a popsali dva viry náležící k phycodnavirům (*Acanthocystis turfacea Chlorellavirus 1* a *Acanthocystis turfacea Chlorellavirus 2*) z kmene řasy *Chlorella* SAG 3.83 izolované ze symbiotického organismu *Acanthocystis turfacea*. Bylo tím dokázáno, že nové phycodnaviry mohou být izolovány i z kmenů, které nemají symbiózu s *P. bursaria* a *H. viridis*. Ačkoliv má ATCV (*Acanthocystis turfacea Chlorella virus*) velmi podobnou morfologii částice s virem PBCV-1 (*Paramecium bursaria Chlorella virus 1*), jejich podobnost na úrovni genomu je poměrně nízká a údaje naznačují, že i když některé geny pocházejí ze stejného předka, vyvíjely se oba viry nezávisle na sobě.



## 3.2 Klasifikace virů řas a sinic

### 3.2.1 Viry řas

Viry napadající řasy patří do čeledi *Phycodnaviridae*, která obsahuje různorodé zástupce obalených virů ikozahedrického tvaru s dvouvláknovou DNA infikující mořské i sladkovodní řasy. Tato stará monofyletická čeleď je členěna do šesti rodů (*Chlorovirus*, *Prasinovirus*, *Prymnesiovirus*, *Phaeovirus*, *Raphidovirus*, *Coccolithovirus*) zahrnující konkrétní viry podle toho, jakou skupinu řas napadají (Wilson *et al.*, 2009).

Viriony phycodnavirů jsou velké vrstvené struktury 100 až 220 nm v průměru, obsahující genom o velikosti 160 až 560 kb. Nesou dsDNA s obsahem G + C párů v rozmezí 40 až 50 % (Wilson *et al.*, 2009). Phycodnaviry mají různou strukturu genomu: některé obsahují velké nekódující sekvence, jiné mají regiony s jednovláknovou DNA. Genomy některých zástupců rodů *Chlorovirus*, *Phaeovirus*, *Coccolithovirus* byly osekvenovány a zjistilo se, že obsahují více než 1000 unikátních a jen 14 homologních genů. Což značí, že jejich genetická variabilita je obrovská (Dunigan *et al.*, 2006). Je však zřejmé, že phycodnaviry tvoří jednu skupinu. Jejich společný evoluční původ se odráží nejen v jejich morfologii, ale také v jejich genovém obsahu (Wilson *et al.*, 2009). Genomy zástupců obsahují tzv. „core geny“, které jsou zodpovědné za hlavní funkce viru, jako například replikace DNA, transkripce a složení virionu. Tyto „core geny“ byly v rámci čeledi zděděny z prapředka a k velké diverzitě zbytku genomu došlo až v průběhu následující evoluce za účelem přežití v různých biotopech.

Zástupci *Phycodnaviridae* značně ovlivňují koloběh uhlíku, což z nich dělá důležité organismy pro zachování status quo života na planetě. Je pravděpodobné, že viry infikují všechny řasy a předpokládá se, že většinu z nich budeme moci zařadit mezi phycodnaviry. Proto je nutné věnovat těmto nebuněčným organismům další pozornost (Wilson *et al.*, 2009).

#### 3.2.1.1 Charakteristika rodu *Chlorovirus*

Chloroviry jsou všudypřítomné viry, které byly izolovány ze sladkých vod celého světa. Zástupci rodu *Chlorovirus* napadají malé, jednobuněčné zelené řasy rodu *Chlorella*. Chloroviry infikují pouze symbiotické kmeny řas, často označované jako *Zoochlorellae*, které jsou spojené s prvoky. V současné době je nejlépe prostudován chlorovirus *Paramecium bursaria Chlorella virus 1* (PBCV-1), který infikuje řasu *Chlorella* NC64A (Wilson *et al.*, 2009). PBCV-1 je lytický virus napadající jednobuněčné, endosymbiotické sladkovodní zelené *Chlorella*-like řasy (Van Etten *et al.*, 2002). Genom PBCV-1

je lineární 331 kb velký, kóduje 366 proteinů a polycystronický gen tRNA pro 11 transferových RNA (Agarkova *et al.*, 2006). Jeho virion má glykoproteinový plášť obklopený lipidovou dvouvrstvou.

#### 3.2.1.2 Charakteristika rodu *Prasinovirus*

O prasinovirech je pouze málo informací, přestože mají velký globální a ekologický význam. Dodnes byly popsány pouze viry napadající řasu *Micromonas pusilla* a výzkum se převážně soustředil na jejich ekologickou roli a genetickou rozmanitost. Bylo zjištěno, že viry rodu *Prasinovirus* mohou denně lyzovat až 25 % z populace řasy (Evans *et al.*, 2003). Virus napadající řasu *M. pusilla* z rodu *Prasinovirus* byl prvním virem přiřazeným k čeledi *Phycodnaviridae*. (Mayer *et Taylor*, 1979).

#### 3.2.1.3 Charakteristika rodu *Prymnesiovirus*

Hostitelé virů rodu *Prymnesiovirus* jsou řasy třídy *Prymnesiophyceae*. Jsou to převážně mořské řasy často spojovány s výskytem vegetačního zákalu. Dosud byly prymnesioviry izolovány ze zástupců rodu *Chrysochromulina* a *Phaeocystis*. Rod *Chrysochromulina* je kosmopolitní a tvoří vegetační zákal, který většinou není toxický, v pobřežních oblastech. *Phaeocystis* spp. způsobuje hustý a nepropustný vegetační zákal. Po napadení řas virem dochází k rychlému posunu složení bakteriálního společenstva v důsledku masivního toku uvolněných živin. Řasy rodu *Phaeocystis* mají dopad na koloběh oxidu uhličitého a síry, což v konečném důsledku ovlivňuje klima a virová infekce tento proces často zhoršuje (Wilson *et al.*, 2009).

#### 3.2.1.4 Charakteristika rodu *Phaeovirus*

Zástupci phaeovirů napadají ekonomicky významné hnědé řasy třídy *Phaeophyceae*. Tyto řasy jsou mnohobuněčné a tvoří vlákna. Je známo, že phaeoviry infikují volně plovoucí gamety zástupců rodů *Ectocarpus*, *Feldmannia*, *Hincksia*, *Myriotrichia*, a *Pilayella* (Wilson *et al.*, 2009). Genom viru je při infekci integrován do genomu hostitelské buňky a viriony se objevují až v reprodukčních orgánech napadené řasy (Müller *et al.*, 1998). Dobře prozkoumaným zástupcem je *Ectocarpus siliculosus virus 1* (ESV-1).

### 3.2.1.5 Charakteristika rodu *Raphidovirus*

Viry tohoto rodu napadají ekonomicky důležitou řasu *Heterosigma akashiwo*, která v pobřežních oblastech způsobuje rozsáhlý vegetační zákal, který svou toxicitou zpříčiňuje úhyn ryb (Nagasaki *et al.*, 1999). Podle této řasy jsou raphidoviry označovány HaV - *Heterosigma akashiwo virus* (Nagasaki *et Yamaguchi*, 1997).

### 3.2.1.6 Charakteristika rodu *Coccolithovirus*

Rod *Coccolithovirus* napadá skupinu jednobuněčných, kalcifikujících mořských řas skupiny *Coccolithophorida*. Tato stará skupina má bohatý fosilní záznam, protože se díky svým zkalcifikovaným schránkám podílela na tvorbě sedimentu. Nejvýznamnějším zástupcem těchto řas je *Emiliana huxleyi*, jejíž přemnožení způsobuje vegetační zákal, který se významně podílí na koloběhu uhlíku v přírodě. Rozsáhlé populace občas náhle zmizí, což je dnes již připisováno virové infekci (Wilson *et al.*, 2009).

### 3.2.2 Viry sinic

Viry infikující sinice (cyanofágové) patří do řádu *Caudovirales*. Je pravděpodobné, že se vyvinuly před více než třemi miliardami let, když se sinice oddělovaly od jiných prokaryot (Suttle, 2000). Svou morfologickou stavbou připomínají bakteriofágy a ve svém genomu nesou dvouvláknovou DNA. Pojmenovávány a seskupovány bývají podle spektra svých hostitelů (Bancroft *et* Smith, 1988). Cyanofágy řadíme do tří čeledí podle morfologie bičíku: *Myoviridae* mají kontraktilní bičík, který je oddělený od kapsidy krčkem; *Podoviridae*, jejichž zástupci mají krátký nekontraktilní bičík a *Siphoviridae* mající dlouhý nekontraktilní bičík. Zástupci cyanofágů jsou široce rozšíření a mohou být izolováni z mořských i sladkovodních ekosystémů. V mořských vodách jsou nejhojnější geneticky rozmanití *Myoviridae*, kteří infikují zástupce rodu *Synechococcus*. Zástupci čeledí *Siphoviridae* a *Podoviridae* jsou nejčastěji izolováni ze sladkých vod (Suttle, 2000).

### 3.3 Metody detekce virů

Studium virů se v posledních 20 letech stalo populárním a pokrok v zobrazovacích a sekvenčních metodách i bioinformatice nám umožnil poodhalit jejich rozmanitý svět (Weitz *et* Wilhelm, 2012). Mezi základní metody při práci s viry patří metody mikroskopické, fluorescenční a molekulární. Techniky používané k detekci virů nám umožňují zkoumat v první řadě přítomnost či nepřítomnost virových částic, ale také jejich morfologický vzhled nebo jejich zastoupení ve vzorku.

#### 3.3.1 Mikroskopické metody

Viry mohou být vizualizovány pomocí transmisní elektronové mikroskopie (TEM), která slouží k jejich přímé detekci. První přímé počítání virů provedli Torrella *et* Morita (1979) ve frakci ze vzorků planktonu shromážděných z Yaquina Bay, Oregon. Nejčastěji používaným postupem při práci s TEM je přímá sedimentace volných virových částic z nefiltrovaného vzorku na měděnou síťku potaženou formvarovou folií. Nicméně ve vzorcích vody, které obsahují velké množství částic, se viry na síťce překrývají a nemohou být spočítány (Wommack *et* Colwell, 2000). V případě, že je koncentrace virů ve vzorku nízká, můžeme k jejich zakoncentrování použít ultracentrifugaci. Pozorování virů pod transmisním elektronovým mikroskopem je běžně používáno při zjišťování koncentrace virů ve vzorcích z mořských i sladkých vod. Mikroskopické pozorování nám dává poměrně přesné informace o morfologii virových částic i jejich zastoupení ve vzorku. Nevýhodou je, že počítání virů pod TEM je zdlouhavé a může vést k falešně pozitivním výsledkům

díky úlomkům z rozbitých buněk, které mohou vypadat jako virové částice (Chen *et al.*, 2001). Další nevýhodou je nutnost drahého přístrojového vybavení zahrnujícího transmisní elektronový mikroskop a ultracentrifugu.

### 3.3.2 Fluorescenční metody

Fluorescenční metody jsou relativně jednoduché a rychlé. Pro zviditelnění virů se v tomto případě používají fluorescenční barvy, které se vážou na nukleové kyseliny ve vzorku, jež je poté pozorován pod epifluorescenčním mikroskopem nebo je vyhodnocen pomocí průtokového cytometru. Jako první fluorescenční barvivo bylo využito DAPI (Sieburth, 1988), které se k fluorescenčnímu barvení virových částic používá již řadu let. Fluorescence DAPI je slabá, je proto nutné vysoké rozlišení mikroskopu, hlavně při pozorování malých virů. Problémem může být také autofluorescence chlorofylu hostitelské buňky, ta se však dá odstranit pomocí filtru. Kvůli nedostatkům DAPI bylo vyvinuto zeleně fluoreskující barvivo Yo-Pro-1. Poprvé bylo použito v práci Hennese *et al.* (1995) při studiu mořských virů. Silnější fluorescence tohoto barviva sice zlepšila vizualizaci virů, ale díky časově náročným postupům při přípravě vzorků barvivo nepřineslo výrazné zlepšení. Změnu přinesly až barviva nové generace SYBR, mezi které patří SYBR Green I, SYBR Green II a SYBR Gold. SYBR Green I má jasnější fluorescenční signál než DAPI, nicméně tato fluorescence slábne do 30 sekund a je proto nutné pracovat rychle. Jako nejvhodnější pro počítání virů se jeví SYBR Gold, které má stabilnější signál než SYBR Green I. SYBR barviva se mohou používat i na fixované preparáty, jejich doba působení na vzorek je krátká a dnes se díky svým výhodám staly nejvyužívanějšími fluorescenčními barvivy pro detekci virů ve vodním prostředí (Chen *et al.*, 2001).

Stejně jako u mikroskopických může i u fluorescenčních metod docházet k chybám způsobených člověkem, který vyhodnocuje pozorované vzorky. Práce Forterre *et al.* (2013) upozorňuje na problém počítání virů značených fluorescenčními barvivy. DNA spojená s „membrane-derived“ vezikulami nebo rozbité části buněk produkují v některých případech fluorescenční tečky, které mohou být považovány za virovou částici. Může tak docházet k nadhodnocení počtu virů nebo dokonce mohou naznačovat jejich přítomnost ve vzorcích, kde se žádné viry nenachází.

### 3.3.3 Molekulární metody

V současné době pomocí metod molekulární biologie a genetiky můžeme dokazovat přítomnost či nepřítomnost virů ve vzorcích a analyzovat genetickou diverzitu virů ve vodním prostředí. Jejich využívání umožnilo získat sekvence genomů mnohých virů napadající řasy. Jako první na PCR založenou techniku k detekci virů infikujících eukaryotické řasy využili Chen *et Suttle* (1995). Byly navrženy virově specifické primery AVS1, AVS2 a POL na základě sekvence aminokyselin unikátních progen kódující DNA polymerázu. Tento gen je ve virech napadajících řasy vysoce konzervativní, proto můžeme díky využití metody předpokládat jejich detekci. Další dvojice primerů sloužící k detekci a zkoumání diverzity virů řas je mcp Fwd a mcp Rev, které jsou cílené na geny kapsidového proteinu MCP (Larsen *et al.*, 2008). Bylo také navrženo několik primerů pro cyanofágy, které umožňují studovat jejich rozmanitost a výskyt ve vodním prostředí. Např. primery způsobující amplifikaci sekvence genu kódujícího protein, který zajišťují skládání virové kapsidy (Capsid Assembly Protein - CPS) (Weinbauer, 2004).

## 4 Materiál a metody

### 4.1 Biologický materiál

Přítomnost virů byla zjišťována v 8 jednodruhových kmenových kulturách sinic (vzorky K1-8), které byly izolovány z přírodních vzorků odebraných z jezer v okolí města Jacksonville státu Florida, USA a v 16 přírodních směsných vzorcích (K10-25) odebraných ze stanovišť sladkých vod České Republiky (Tabulka 1), které byly poskytnuty doc. RNDr. Petrem Hašlerem, Ph.D. (Katedra Botaniky, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc).

**Tabulka 1:** Seznam vzorků a jejich charakteristika

Vzorek	Země původu	Místo odběru	Datum odběru	Druh vzorku
<b>K1</b>	Florida, USA	M. Lynch Pond, Jacksonville	IX/2012	sinice, rod <i>Geitlerinema</i>
<b>K2</b>	Florida, USA	Oneida Lake, Jacksonville	IX/2012	sinice, rod <i>Geitlerinema</i>
<b>K3</b>	Florida, USA	Eventine Pond, Jacksonville	IX/2012	sinice, rod <i>Arthrospira</i>
<b>K4</b>	Florida, USA	Eventine Pond, Jacksonville	IX/2012	sinice, rod <i>Pseudanabaena</i>
<b>K5</b>	Florida, USA	Eventine Pond, Jacksonville	IX/2012	sinice, rod <i>Pseudanabaena</i>
<b>K6</b>	Florida, USA	Eventine Pond, Jacksonville	IX/2012	sinice, rod <i>Synechococcus</i>
<b>K7</b>	Florida, USA	Crossroad Church, Jacksonville	IX/2012	sinice, rod <i>Phormidium</i>
<b>K8</b>	Florida, USA	Waterpond Park, Jacksonville	IX/2012	sinice, rod <i>Phormidium</i>
<b>K10</b>	ČR	rybník, Zábřeh	IX/2014	směsný fytoplankton
<b>K11</b>	ČR	rybník, Líšnice	IX/2014	směsný fytoplankton
<b>K12</b>	ČR	původ neznámý	IX/2014	řasa, rod <i>Cladophora</i>
<b>K13</b>	ČR	původ neznámý	IX/2014	řasa, rod <i>Spirogyra</i>
<b>K14</b>	ČR	rybník Svět, Třeboň	IX/2014	směsný fytoplankton
<b>K15</b>	ČR	rybník, Opava	IX/2014	směsný fytoplankton
<b>K16</b>	ČR	rybník, Slavoník	IX/2014	směsný fytoplankton
<b>K17</b>	ČR	rybník, Telč	IX/2014	směsný fytoplankton
<b>K18</b>	ČR	rybník č. 1, Litultovice	IX/2014	směsný fytoplankton
<b>K19</b>	ČR	rybník, Lišnice	IX/2014	směsný fytoplankton
<b>K20</b>	ČR	rybník, Štáblovice	IX/2014	směsný fytoplankton

**Tabulka 1:** Seznam vzorků a jejich charakteristika (pokračování)

Vzorek	Země původu	Místo odběru	Datum odběru	Druh vzorku
K21	ČR	rybník č. 2, Litultovice	IX/2014	směsný fytoplankton
K22	ČR	řeka Morava, Olomouc	IX/2014	směsný fytoplankton
K23	ČR	rybník, Doubravice	IX/2014	směsný fytoplankton
K24	ČR	rybník, Újezd	IX/2014	směsný fytoplankton
K25	ČR	rybník, Podolí	IX/2014	směsný fytoplankton

## 4.2 Izolace DNA ze vzorků

Z jednodruhových kmenových kultur sinic a přírodních směsných vzorků bylo odebráno 10 ml suspenze, která byla přefiltrována přes filtrs velikostí pórů 1,2  $\mu\text{m}$  (Glass microfibre filters, GF/C, Whatman). Filtrát byl použit k zakocentrování virových částic ve vzorcích ultracentrifugací (rotor Beckman 50Ti, 1 h, 35000 rpm). Pelet byl resuspendován v 250  $\mu\text{l}$  destilované vody, nechán 2 minuty na ledu, 2 minuty vařen při teplotě 96  $^{\circ}\text{C}$  a zchlazen po dobu 2 minut na ledu. Takto upravené vzorky byly označeny K1-8/U a K10-25/U. Materiál zachycený na filtrech ze vzorků byl seškrábán, resuspendován v 250  $\mu\text{l}$  destilované vody, nechán 2 minuty na ledu, 2 minuty vařen při teplotě 96  $^{\circ}\text{C}$  a zchlazen po dobu 2 minut na ledu. Takto připravené vzorky byly označeny K1-8/F a K10-25/F. Všechny vzorky byly uchovávány v teplotě -80  $^{\circ}\text{C}$ .

## 4.3 Nested PCR

Nested PCR byla provedena ve dvou krocích za v práci Chen *et* Suttle (1995). V prvním kroku použití dvojic degenerovaných primerů AVS1/AVS2 a AVS1/POL (Tabulka 2), které byly navrženy byly použity primery AVS1 a AVS2. Reakční směs PCR reakce byla připravena smícháním pufru, hořčnatých iontů, sterilní deionizované vody, dNTPs, primerů a *Taq* polymerázy ve sterilním boxu (Tabulka 3). Připravená reakční směs byla rozpipetována po 20  $\mu\text{l}$  do PCR zkumavek a bylo přidáno 5  $\mu\text{l}$  vzorku. Zkumavky byly umístěny do termocykléru s nastavenými podmínkami reakce (Tabulka 4). Druhý krok nested PCR reakce byl proveden podle postupu popsánoho výše s tím rozdílem, že byly použity primery AVS1/POL a PCR produkty z předešlé reakce.



**Tabulka 2:** Sekvence primerů AVS1, AVS2, POL

Název primeru	Sekvence primeru
AVS1	5´-GAR GGI GCI ACI GTI YTA GAY GC- 3´
AVS2	5´-GCI GCR TAI CKY TTY TTI SWR TA- 3´
POL	5´-SWR TCI GTR TCI CCR TA- 3´

**Tabulka 3:** Reakční směs PCR pro 1 vzorek s primery AVS1/AVS2, AVS1/POL

Reagencie	Koncentrace pracovního roztoku	Konečná koncentrace	1 test [μl]
pufr	10x	1x	2,5
MgCl <sub>2</sub>	50 mmol/l	1,5 mmol/l	0,8
voda	-	-	13,625
dNTPs	2 mmol/l	160 μmol/l	2
primer F	20 pmol/μl	0,4 μmol/l	0,5
primer R	20 pmol/μl	0,4 μmol/l	0,5
<i>Taq</i> polymeráza	5 U/μl	0,625 U/reakce	0,125
vzorek	-	-	5
<b>Objem reakce</b>	25 μl		

**Tabulka 4:** Podmínky PCR pro primery AVS1/AVS2, AVS1/POL

Krok	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
počáteční denaturace	95	15 min	-
denaturace	95	30 s	35
hybridizace	51	30 s	
elongace	72	45 s	
konečná elongace	72	5 min	-

#### 4.4 Elektroforéza v 1% agarózovém gelu

K vizualizaci PCR produktů byla použita horizontální gelová elektroforéza v 1% agarózovém gelu. Na přípravu gelu bylo naváženo 0,5 g agarózy, která byla zalita 50 ml TAE pufru. Po rozvaření byla agaróza s přídavkem 2 μl barviva GoodView přelita do elektroforetické vaničky s umístěnými hřebínky pro tvorbu jamek. Po ztuhnutí gelu byla elektroforetická vanička zalita po rysku 1x TAE pufrem. Do jamek v gelu bylo pipetováno 5 μl vzorku smíchaného s 2 μl 0,1 % bromfenolové modři ve 30% vodním roztoku glycerinu. Jako standard molekulové váhy byl aplikován GeneRuler 100 bp plus DNA ladder.

Elektroforetická vanička byla připojena ke zdroji stejnosměrného napětí zapnuta na 80 V. Po cca 40 min byla elektroforetická separace zastavena, gel byl vizualizován UV transiluminátorem a dokumentován pomocí programu GeneSnap.

## **4.5 Izolace PCR produktů z gelu**

PCR produkty byly před izolací separovány na 1% agarózovém gelu s přidavkem ethidium bromidu (75 ml rozvařené agarózy v TAE pufru + 4 µl ethidium bromidu o koncentraci 2,5 mg/1 ml). PCR produkt předem smíchaný se 4 µl 0,1% bromfenolové modři ve 30% vodném roztoku glycerinu byl pipetován do dvou jamek po 10 µl. Elektroforetická separace probíhala asi hodinu při 80 V. Po ukončení separace byly PCR produkty vyříznuty pomocí sterilních skalpelů na UV transiluminátoru a umístěny do předem zvážených sterilních zkumavek Eppendorf. Izolace DNA byla provedena s QIAquick Gel Extraction Kitem podle pokynů výrobce. Zkumavky s gelem byly znovu zváženy a byla od nich odečtena váha prázdné zkumavky. Byl přidán QG pufr v poměru 3 díly pufru: 1 díl gelu (v/w) a byly inkubovány 10 min na inkubačním bloku s třepačkou při teplotě 50 °C. Po rozpuštění gelu a zvortexování byl přidán 1 díl izopropanolu. Do kolonky bylo přepipetováno 700 µl vzorku (při objemu nad 700 µl byl krok opakován), kolonky byly centrifugovány na stolní centrifuze při 13000 otáčkách po dobu 1 min. Filtrát byl odstraněn a bylo přidáno 500 µl QG pufru. Kolonky se centrifugovaly při 13000 otáčkách po dobu 1 min, filtrát byl vylit a bylo přidáno 750 µl PE pufru. Kolonky byly centrifugovány při stejném nastavení, filtrát byl odstraněn a znovu byly centrifugovány při stávajícím nastavení. Poté byly kolonky umístěny do nových 1,5ml zkumavek, bylo přidáno 30 µl sterilní destilované vody a zkumavky byly centrifugovány. Koncentrace izolované DNA byla stanovena pomocí fluorimetru. Pokud byl obsah DNA nízký, byly vzorky zakoncentrovány vysušením ve SpeedVacu a rozpuštěny v menším objemu destilované vody. Vzorky byly uchovávány při teplotě -20 °C.

## **4.6 Klonování PCR produktu**

### **4.6.1 Ligace PCR produktu a transformace *E. coli* bakterií**

PCR produkty byly zaklonovány do kompetentních bakterií *Escherichia coli* DH5α pomocí pGem-T Vector System Kitu. Ligační směs byla připravena podle Tabulky 5. Následně bylo odebráno 50 µl rozmražených kompetentních buněk *E. coli* DH5α a smícháno s 5 µl ligační směsí. Buňky byly inkubovány na ledu 20 min, poté byla provedena

transformace teplotním šokem: inkubace buněk 45 s při teplotě 42 °C, okamžité umístění na led a inkubace minimálně 2 min. Po přidání 850 µl SOC média byly buňky inkubovány 1,5 h při teplotě 37 °C na rotační třepačce. Transformované buňky byly zakoncentrovány centrifugací při 5000 g po dobu 2 min, bylo odpipetováno 850 µl supernatantu a sediment byl resuspendován v cca 50 µl SOC média. Resuspendované bakteriální buňky byly rozetřeny na připravené Petriho misky obsahující LB médium s antibiotikem ampicilin (100 µg ampicilinu/1 ml média), na kterém bylo rozetřeno 40 µl X-Gal (20 µg/µl) a 4 µl IPTG (200 µg/µl). Petriho misky byly inkubovány přes noc při 37 °C, nárůst kolonií byl vyhodnocen následující den. Pozitivní bílé kolonie byly přeinkulovány na nové LB médium s ampicilinem a kultivovány při 37 °C přes noc.

**Tabulka 5:** Ligační směs pro 1 reakci

Reagencie	Množství [µl]
pGEM-T ligační pufr	5
ligáza	1
pGEM-T plazmid	0,5
PCR produkt	3,5
destilovaná voda	doplnit do 10

#### 4.6.2 Testování pozitivních kolonií pomocí PCR reakce

Pozitivní bílé kolonie byly otestovány PCR reakcí s primery M13F/M13R (Tabulka 6). Reakční směs byla připravena podle Tabulky 7 a byla rozpipetována do PCR mikrozkušavek, pomocí bambusových párátek do ní byly přeneseny transformované bakterie zjednotlivých kolonií. Zkušavky byly umístěny do termocykléru s nastaveným programem (Tabulka 8). PCR amplifikace byla vyhodnocena elektroforetickou separací v 1% agarózovém gelu v TAE pufru (postup viz kapitola 4.4). Pro každý PCR produkt byly vybrány tři bakteriální kolonie obsahující inzert, které byly vysušeny, rozpuštěny v 10 µl destilované vody, pročištěny pomocí QIAquick Gel Extraction Kitu (postup viz kapitola 4.5) a použity pro sekvenční značení s primery M13F/M13R.

**Tabulka 6:** Sekvence primerů M13F a M13R

Název primeru	Sekvence primeru
M13F	5´- GTA AAA CGA CGG CCA - 3´
M13R	5´- CAG GAA ACA GCT ATG AC - 3´

**Tabulka 7:** Reakční směs PCR pro 1 vzorek s primery M13F/M13R

Reagencie	Koncentrace pracovního roztoku	Konečná koncentrace	1 test [ $\mu$ l]
pufř	10x	1x	2
MgCl <sub>2</sub>	25 mmol/l	1,5 mmol/l	1,2
voda	-	-	11,8
dNTPs	2 mmol/l	100 $\mu$ mol/l	2
M13F	20 pmol/ $\mu$ l	0,2 $\mu$ mol/l	0,2
M13R	20 pmol/ $\mu$ l	0,2 $\mu$ mol/l	0,2
<i>Taq</i> polymeráza	5 U/ $\mu$ l	1 U/reakce	0,2
<b>Objem reakce</b>	20 $\mu$ l		

**Tabulka 8:** Podmínky PCR pro primery M13F/M13R

Krok	Teplota [ $^{\circ}$ C]	Čas	Počet cyklů
počáteční denaturace	95	5 min	-
denaturace	95	30 s	25
hybridizace	55	30 s	
elongace	72	30 s	
konečná elongace	72	10 min	-

#### 4.7 Sekvencování a sekvenační analýza

Vzorky byly označeny pomocí BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit podle návodu výrobce. Byla připravena reakční směs podle Tabulky 6 s primery AVS1/POL nebo M13F/M13R, která byla rozpipetována po 4  $\mu$ l do PCR zkumavek. Množství přidaného vzorku bylo vypočítáno pro každý zvlášť tak, aby obsahoval mezi 20 až 50 ng DNA. Označené vzorky byly vloženy do termocykléru předem nastavenými podmínkami reakce (Tabulka 7). Sekvencování vzorků bylo provedeno pracovníky na pracovišti Ústavu experimentální botaniky, AV ČR, Olomouc.

Sekvence získané z genetického analyzátoru byly sestaveny skládáním dvou proti sobě jdoucích kontigů pomocí programu SeqMan, DNASTAR (Lasergene). Byly odstraněny sekvence vektoru pGem-T, primerů a získané sekvence byly porovnány s dostupnými sekvencemi v databázi GenBank pomocí programu BLAST ([www.ncbi.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nih.gov/blast)).

**Tabulka 9:** Reakční směs nasekvenační značení pro 1 vzorek a 1 primer (F/R)

Reagencie	Množství [μl]
pufr (Sequencing Buffer 5x)	1
Terminator BigDye®	1
primer	2
vzorek	max 6
destilovaná voda	doplnit do 10
Objem reakce	10 μl

**Tabulka 10:** Podmínky nastavení termocykléru pro sekvenační značení

Krok	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
počáteční denaturace	96	1 min	-
denaturace	96	10 s	40
hybridizace	50	5 s	
elongace	60	4 min	

#### 4.8 Seznam použitých chemikálií

Agar (Duchefa, 009007.03)

Agaróza (Amresco, 0710)

Ampicilin sodium (Duchefa, A0104)

BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies, 4337455)

Bromfenolová modř (Sigma-Aldrich, 114391)

DMF (Serva, 20270)

dNTP Mix 2 mM/1 ml (Fermentas, R0241)

EDTA (Lach-Ner, 30355)

Ethidium bromid (Serva, 21238)

Gene Ruler 100bp plus DNA ladder (Fermentas, SM0321)

Glukóza monohydrát (Duchefa, G0802.1000)

GoodView Nucleic Acid Stain (SBS Genetech Co. Ltd., HGV-II)

IPTG (Thermo Scientific, R1171)

KCl (Lachema, 30547)

Kvasničný extrakt (Duchefa, Y1333.0500)

LB Base (Duchefa, 30802)

Ledová kyselina octová (Lach-Ner)

MgCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O (Lachema)  
MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O (Lachema, 30802)  
NaCl (Lachema, 20584)  
Pepton (Duchefa, P1328.0500)  
pGem-T Vector System Kit (Promega, A3600)  
Platinum *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen, 11708021)  
QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, 28706)  
TRIS (Serva)  
X-Gal (Thermo Scientific)  
30% glycerin

#### 4.9 Seznam použitých roztoků a jejich složení

##### ampicilin (100 µg/µl)

ampicilin sodium	1 g
destilovaná voda	10 ml

##### LB médium

LB Base	6,2 g
agar	4,5 g
destilovaná voda	250 ml

##### SOC médium

pepton	2 g
kvsičný extrakt	0,5 g
1 mol/l NaCl	1 ml
1 mol/l KCl	0,25 ml
2 mol/l Mg <sup>2+</sup> roztok	1 ml
2 mol/l glukóza	1 ml
destilovaná voda	do 100 ml

##### 2 mol/l Mg<sup>2+</sup> roztok

MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	20,33 g
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	24,65 g

##### TAE pufr 5x

TRIS	24,2 g
ledová kyselina octová	5,71 ml
0,5 mol/l EDTA	10 ml
pH 8 (upraveno pomocí kyseliny octové)	
destilovaná voda	do 1000 ml

<u>TAE pufr 1x</u>	
5x TAE pufr	200 ml
destilovaná voda	800 ml
<u>TNE 10x</u>	
TRIS	12,1 g
EDTA	3,7 g
NaCl	116,8 g
pH 7,4 (upraveno pomocí HCl)	
destilovaná voda	do 1000 ml
<u>TRIS 1 mol/l</u>	
TRIS	12,1 g
pH 7,5 (upraveno pomocí HCl)	
destilovaná voda	do 100 ml
<u>X-Gal (20 µg/µl)</u>	
5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranosid	20 mg
N,N'-dimethylformamid	1 ml

#### **4.10 Seznam použitých přístrojů**

Autokláv PS 20A (Vipo)  
 Elektroforetická komůrka HU10 (Scie-Plas)  
 Fluorimetr Hoefer DyNA Quant 200 (Amersham Biosciences)  
 Genetický analyzátor ABIPRISM 3730 (Applied Biosystems)  
 Inkubátor TH30 + SM30 (Edmund Buhler GmbH)  
 Minicentrifuga Spectrafuge Mini (Labnet)  
 Rotační třepačka Multi Bio RS-24 (Biosan)  
 SpeedVac SPD 111V (ThermoSavant)  
 Sterilní box PV-100 Telstar (Progen Scientific)  
 Stolní centrifuga Biofuge Pico (Heraeus)  
 Termocyklér T100 (BIO-RAD)  
 Ultracentrifuga Himac CP 90WX (Hitachi)  
 UV transiluminátor G:Box (Syngene)  
 UV transiluminátor UVT-14L (Herolab)  
 Váhy EK-200G (A&D)  
 Vortex TTS 2 Yellowline (Maneko)

Zařízení pro inkubaci a třepání Mixing block MB-102 (Bioer)

Zdroj stejnosměrného napětí Power Station 300 (Labnet)



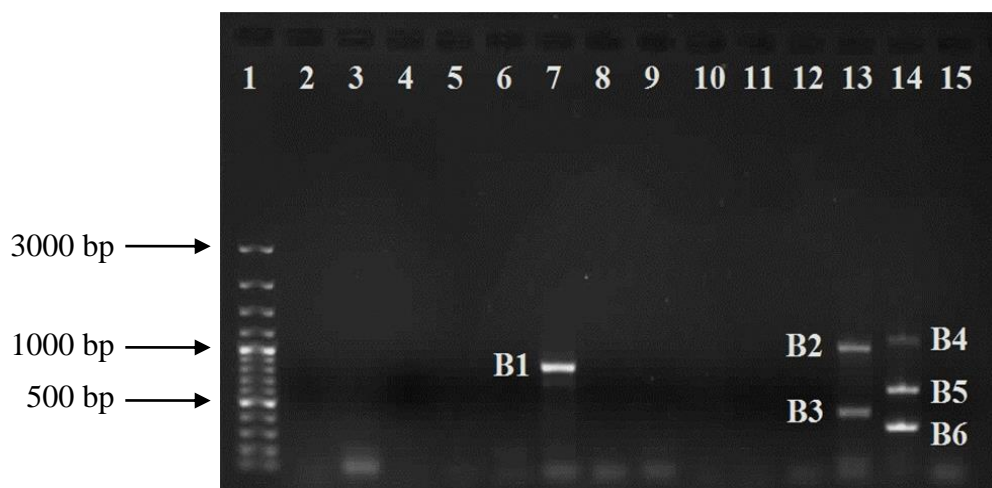
## 5 Výsledky

### 5.1 Detekce virů ve vzorcích

Osm jednodruhových kmenových kultur sinic a 16 přírodních směsných vzorků bylo testováno na přítomnost virů pomocí nested PCR s virově specifickými primery AVS1, AVS2 a POL. PCR produkty byly získány u vzorků K1/U, K7/U, K8/U, K12/U, K14/U, K21/U, K22/U a K25/U. Na rozdíl od očekávaného jednoho PCR produktu, který vytvořil pouze vzorek K1/U, byly získány PCR produkty různé velikosti (Obrázek 1, 2, 3), což svědčí o nespecifické amplifikaci. Zbylé vzorky byly negativní. Viry byly detekovány pouze ve vzorcích označených „U“, to je v peletech po ultracentrifugaci. Ze vzorků označených „F“, které představovaly buněčnou frakci zachycenou na filtru, ani v jednom případě nebyly získány PCR produkty. Získané PCR produkty byly izolovány, klonovány a sekvenovány.

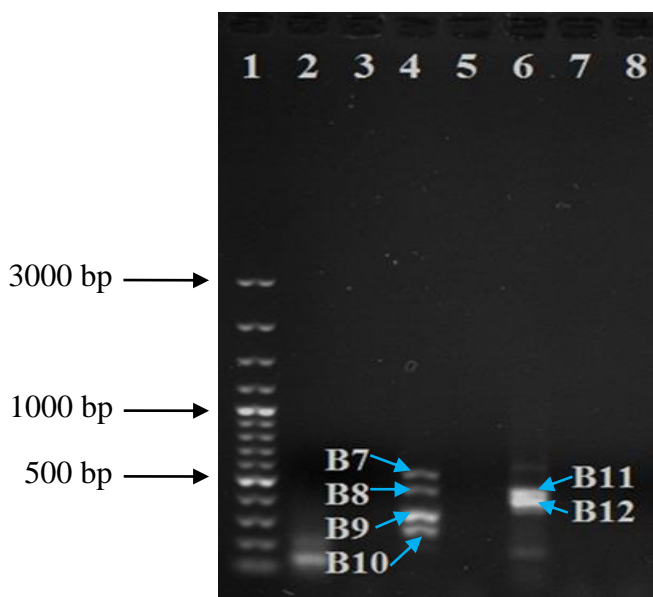
Celkem bylo izolováno a pro sekvenování připraveno 21 PCR produktů různé délky (Tabulka 12). Ze vzorku K1/U byl získán produkt B1 s přibližnou velikostí 870 bp. Ze vzorku K7/U byly získány produkty B2 s délkou asi 1200 bp a B3 s přibližnou velikostí 500 bp. Ze vzorku K8/U byly izolovány všechny tři vzniklé produkty: B4 s přibližnou velikostí 1500 bp, B5 o velikosti asi 650 bp a B6 s přibližnou velikostí 390 bp. U vzorku K12/U byl získán produkt B7 o velikosti zhruba 590 bp, produkt B8 s přibližnou velikostí 490 bp, produkt B9 s přibližnou velikostí 340 bp a B10 o délce asi 290 bp. U vzorku K14/U byly izolovány produkty B11 s délkou asi 450 bp a B12 s přibližnou velikostí 400 bp. U vzorku K18/U byly vyřezány produkty B13 s délkou asi 490 bp, B14 s přibližnou velikostí 380 bp a B15 o velikosti asi 290 bp. U vzorku K21/U byly vyřezány produkty B16 s přibližnou velikostí 490 bp a B17 o délce asi 350 bp. Ze vzorku K22/U byl izolován pouze nejvýraznější PCR produkt B18 s velikostí asi 500 bp. U vzorku K25/U byly vyřezány produkty B19 s velikostí asi 500 bp, B20 s přibližnou velikostí 420 bp a B21 o délce zhruba 380 bp. Protože množství DNA ve vyizolovaných produktech bylo nízké pro sekvenační značení, byly všechny produkty B1-21 reamplifikovány pomocí primerů AVS1/POL. Reamplifikované PCR produkty byly opět izolovány z gelu, pročištěny a označeny pro sekvenování.

**Obrázek 1:** PCR produkty vzorků K1/U, K7/U, K8/U



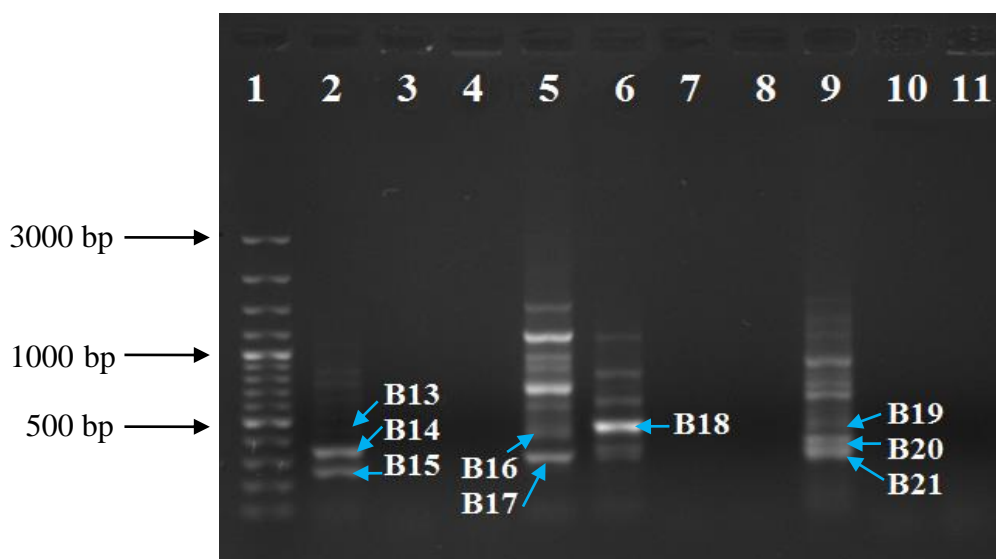
1 – Gene Ruler 100 bp plus DNA ladder; 2 – vzorek K1/F; 3 – vzorek K2/F; 4 – vzorek K3/F; 5 – vzorek K4/F; 6 – vzorek K5/F; 7 – vzorek K1/U (produkt B1); 8 – vzorek K2/U, 9 – vzorek K3/U; 10 – vzorek K4/U; 11 – vzorek K5/U, 12 – vzorek K6/U; 13 – vzorek K7/U (produkty B2, B3); 14 – vzorek K8/U (produkty B4, B5, B6), 15 – vzorek K6/F

**Obrázek 2:** PCR produkty vzorků K12/U, K14/U



1 – Gene Ruler 100 bp plus DNA ladder; 2 – vzorek K10/U; 3 – vzorek K11/U; 4 – vzorek K12/U (produkt B7, B8, B9, B10); 5 – vzorek K13/U; 6 – vzorek K14/U (produkt B11, B12), 7 – vzorek K15/U, 8 – vzorek K16/U

**Obrázek 3:** PCR produkty vzorků K18/U, K21/U, K22/U, K25/U



1 – Gene Ruler 100 bp plus DNA ladder; 2 – vzorek K18/U (produkt B13, B14, B15); 3 – vzorek K19/U; 4 – vzorek K20/U; 5 – vzorek K21/U (produkt B16, B17); 6 – vzorek K22/U (produkt B18); 7 – vzorek K23/U; 8 – vzorek K24/U; 9 – vzorek K25/U (produkt, B20, B21); 10 vzorek K16/F, 11 – vzorek K17/F

**Tabulka 12:** PCR produkty pozitivních vzorků a jejich přibližná velikost

Vzorek	Produkt	Délka produktu [bp]
K1/U	B1	870
K7/U	B2	1200
	B3	500
K8/U	B4	1500
	B5	650
	B6	390
K12/U	B7	590
	B8	490
	B9	340
	B10	290
K14/U	B11	450
	B12	400

**Tabulka 12:** PCR produkty pozitivních vzorků a jejich přibližná velikost (pokračování)

Vzorek	Produkt	Délka produktu [bp]
<b>K18/U</b>	B13	490
	B14	380
	B15	290
<b>K21/U</b>	B16	490
	B17	350
<b>K22/U</b>	B18	500
<b>K25/U</b>	B19	500
	B20	420
	B21	380

Pro sekvenační značení s primery AVS1/POL byly nejdříve připraveny PCR produkty B1-12. Při jejich přímém sekvenování byla sekvence získána pouze z produktu B11. Sekvence byla dlouhá 457 nt. Výstupy přímého sekvenování PCR produktů B1-10 a B12 nebyly čitelné, což svědčí o nespecifické anebo směsné amplifikaci. PCR produkty B1-10 a B12 byly proto klonovány a tři klony pro každý produkt byly osekvenovány s primery M13F/M13R. Produkt B1 byl při práci ztracen. Navíc byly pro sekvenační značení s primery AVS1/POL připraveny nerozklonované zbylé PCR produkty B13-21.

Na základě podobnosti získaných sekvencí se sekvencemi dostupnými v databázi GenBank byla přítomnost virů (*Phycodnaviridae*, *Mycobacteriophage*) potvrzena ve vzorku K12/U (produkt B9, B10) a ve vzorku K14/U (produkt B11). Vzorek K12 obsahoval směsný fytoplankton s převahou řasy rodu *Cladophora* a byl odebrán na blíže neurčeném místě ze stojaté vody v ČR. Vzorek K14 obsahoval směsný fytoplankton a byl odebrán z rybníku Svět v ČR. Ostatní vzorky obsahovaly směsné produkty a vykazovaly podobnost s různými sekvencemi odlišných organismů. Nicméně i přes velkou podobnost sekvencí bylo překrytí ve většině případů velmi nízké (10-35 %), což neumožnilo průkaznou identifikaci získaných sekvencí. Za potvrzenou považujeme přítomnost některých bakterií: gram-pozitivní *Amphibacillus xylanus*, *Hydrogenophaga* sp., gram-negativní, earobní a všudypřítomná bakterie *Variovorax paradoxus*, *Acidovorax ebreus* a gram-negativní *Alicyclophilus denitrificans* nacházející se v odpadních vodách a půdě.

Následuje rozpis sekvencí získaných z jednotlivých PCR produktů a jejich klonů, které byly porovnány s databází GenBank pomocí programu BLAST. Stručný souhrn

získaných sekvencí, jejich přiřazení ke vzorkům a nejpodobnější sekvence je uveden v Tabulce 13. Některé sekvence byly nečitelné a nejsou proto uvedeny.

Ze vzorku K14/U (smesný fytoplankton z rybníku Svět, ČR) produktu B11 byla získána sekvence dlouhá 457 nt. Při porovnání se sekvencemi dostupnými v databázi GenBank pomocí algoritmu BLAST vykazovala 81% identitu s genem pro DNA polymerázu klonu phycodnaviru 399-P7.13. Druhá největší podobnost byla nalezena s genem pro DNA polymerázu klonu phycodnaviru CRb-38, se kterou vykazovala sekvence 79% podobnost. V pořadí třetí nejpodobnější sekvence byla pro gen DNA polymerázy klonu phycodnaviru CRb-12, se kterou měla porovnávaná sekvence 79% identitu.

Ze vzorku K12/U (směsný fytoplankton z blíže neurčeného místa odběru, ČR) produktu B9 byly získány sekvence ze 3 klonů. Z klonu I byla získána sekvence dlouhá 215 nt, která vykazovala největší 67% podobnost s virem *Mycobacteriophage Daenerys* (KF017005.1). Druhá největší podobnost byla zjištěna s virem *Mycobacterium phage YungJamal* (KJ829260.1), která se sekvencí vykazovala 81% identitu. Na třetím místě byla sekvence viru *Mycobacterium phage Dylan* (KF024730.1), která vykazovala shodu 81 %. Z klonu II byla získána sekvence dlouhá 457 nt. Při porovnání programem BLAST byla nalezena nejpodobnější sekvence kamutu – *Triticum turgidum* subsp. *turanicum* (GQ451817.1) s identitou 100 %. Na druhém místě byla sekvence pro mRNA domény transkripčního faktoru GGM6 *Gnetum gnemon* (AJ132212.2) vykazující 100% podobnost. Třetí nejpodobnější sekvence byla z expresního vektoru pCMH411 (AY122058.1), která vykazovala 99% podobnost. Z klonu III byla získána sekvence o velikosti 546 nt. Nejpodobnější sekvence byla sekvence proteinu lamy alpaka – *Vicugna pacos* (JN122622.1), která vykazovala 100% identitu. Druhá nejpodobnější sekvence byla sekvence klonovacího vektoru pDuExAc6 (GU370778.1), která vykazovala 99% shodu. V pořadí třetí nejpodobnější byla sekvence rostlinného vektoru pDuExP (EF565883.1) se shodou 99 %. Z produktu B10 vzorku K12/U byly získány 3 klony. Z klonu I byla získána sekvence dlouhá 194 nt. Nejvyšší 73% podobnost vykazovala sekvence viru *Mycobacterium phage 32HC* (KJ028219.1). Na druhém místě byla sekvence bakterie *Achromobacter xylosoxidans* (CP002287.1) se 72% identitou. Třetí v pořadí byla sekvence viru *Mycobacteriophage Daenerys* (KF017005.1) s podobností 80 %. Z klonu II byla získána sekvence 378 nt, která při porovnání s databází GenBank vykazovala největší podobnost se sekvencí proteinu lamy alpaka – *Vicugna pacos* (JN122622.1) se 100% identitou. Druhá nejpodobnější byla sekvence klonovacího vektoru pDuExAc6 (GU370778.1) s identitou 99 %. Třetí nejpodobnější byla sekvence rostlinného vektoru pDuExP (EF565883.1) s 99% shodou.

Z klonu III byla získána sekvence dlouhá 79 nt vykazující největší 93% podobnost s chromosomem 1 bakterie *Burkholderia* sp. (CP000151.1). Na druhém místě největší podobnost vykazovala sekvence předpokládaného genu myši domácí – *Mus musculus* (XR\_397657.2) s identitou 96 %. Třetí v pořadí byla sekvence předpokládaného genu *Mus musculus* (XR\_883736.1) s identitou 96 %. U vzorku K12/A produktu B7 byly získány sekvence ze tří kolonií. Z klonu I byla porovnávána sekvencí sdělkou 382 nt, která vykazovala 100% podobnost s mRNA hypotetické proteinu topolu chlupatoplodého *Populus trichocarpa* (XM\_002298229.1). Na druhém místě byla sekvence bakterie *Frankia* sp. (CP000820.1) vykazující shodu 85 %. Na třetím místě byla sekvence hraboše prériového *Microtus ochrogaster* (XM\_005351586.1) s podobností 94 %. Z klonu II byla získána sekvence dlouhá 585 nt vykazující 80% shodu s bakterií *Runella slithyformis* (CP002859.1). Druhá nejpodobnější byla sekvence mRNA hypotetické proteinu *Populus trichocarpa* (XM\_002298229.1) se shodou 100 %. Třetí v pořadí byla sekvence s podobností 80 % bakterie *Amycolatopsis japonica* (CP008953.1). Z kolonie III byla izolována sekvence velká 405 nt. Nejvyšší 100% podobnost vykazovala se sekvencí mRNA hypotetické proteinu stromu *Populus trichocarpa* (XM\_002298229.1). Druhá nejpodobnější byla sekvence bakterie *Streptomyces albulus* (XM\_00229829.1) vykazující 86% shodu. Třetí nejpodobnější sekvence byla sekvence bakterie *Frankia* sp. (CP000820.1) se shodou 85 %. Vzorek K12/U produkt B8 poskytl sekvence ze tří kolonií. Z klonu I byla získána sekvence s délkou 696 nt. Největší podobnost vykazovala sekvence pravděpodobné 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenázy antilopy tibetské – *Pantholops hogsonii* (XM\_005977915.1) s identitou 84 %. Na druhém místě byla sekvence půdní bakterie *Comamonas testosteroni* (CP006704.1) s 82% podobností. Třetí v pořadí byla sekvence bakterie *Delftia* sp. (CP002735.1) s podobností 82 %. Z kolonu II byla získána sekvence dlouhá 608 nt vykazující 77% shodu se sekvencí bakterie *Hydrogenophaga* sp. (FR720598.2). Druhá nejpodobnější sekvence byla sekvence proteinu *Vicugna Pacos* (JN122622.1), která vykazovala identitu 100 %. Třetí nejpodobnější sekvence byla sekvence klonovacího vektoru pDuExAc6 (GU370778.1) s 99% identitou. Z klonu III byla získána sekvence 499 nt dlouhá. Nejvyšší 84% podobnost měla s pravděpodobnou 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenázou *Pantholops hogsonii* (XM\_005977915.1). Druhá v pořadí byla sekvence půdní bakterie *Comamonas testosteroni* (CP006704.1) s podobností 83 %. Další byla sekvence bakterie *Delftia* sp. (CP002735.1) s identitou 83 %.

U vzorku K7/U (sinice z rodu *Phormidium*, Florida, USA) produktu B2 byly získány sekvence ze dvou klonů, které byly porovnány s databází GenBank programem BLAST.

Z klonu I byla izolována sekvence dlouhá 1164 nt, která při porovnání s databází vykazovala největší podobnost s bakterií *Variovorax paradoxus* (CP002417.1) shodující se v 71 %. Druhá nejpodobnější sekvence byla z bakterie *Alicycliphilus denitrificans* (CP002449.1) se 71% shodou. Třetí v pořadí byla sekvence bakterie *Acidovorax ebreus* (CP001392.1) s identitou 71 %. Z klonu II byla získána sekvence dlouhá 622 nt. Nejpodobnější sekvence byla sekvence bakterie *Variovorax paradoxus* (CP002417.1) se shodou 70 %. Další nejpodobnější sekvence pocházela z bakterie *Acidovorax* sp. (CP003872.1) a vykazovala 70% podobnost. Třetí nejpodobnější byla sekvence chromozómu B4 bakterie *Variovorax paradoxus* (CP003911.1) s podobností 70 %. Vzorek K7/U produkt B3 poskytl sekvence ze tří klonů. Z klonu I byla získána sekvence dlouhá 564 nt vykazující největší 94% shodou s bakterií *Acidovorax ebreus* (CP001392.1) a s identitou 71 %. Druhá nejpodobnější byla sekvence vykazující 94% shodu s bakterií *Alicycliphilus denitrificans* (CP002449.1). Třetí nejpodobnější sekvence byla z bakterie *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* (CP00252.1) a vykazovala identitu 92 %. Z klonu II byla získána sekvence dlouhá 544 nt. Nejvíce podobná jí byla sekvence bakterie *Alicycliphilus denitrificans* (CP002449.1) vykazující shodu 94 %. Další nejpodobnější sekvence pocházela z bakterie *Acidovorax ebreus* (CP001392.1) a vykazovala 94% identitu. Třetí v pořadí byla sekvence vykazující 93% podobnost s bakterií *Alicycliphilus denitrificans* (CP002657.1). Z klonu III byla získána sekvence dlouhá 589 nt. Největší 94% shoda byla nalezena s bakterií *Alicycliphilus denitrificans* (CP002449.1). Druhá největší podobnost byla s bakterií *Acidovorax ebreus* (CP001392.1) vykazující 94% identitu. Další nejpodobnější sekvence byla s bakterií *Alicycliphilus denitrificans* (CP002657.1) vykazující 93% podobnost.

Ze vzorku K8/U (sinice z rodu *Phormidium*, Florida, USA) produktu B4 byla získána sekvence z klonu I dlouhá 373 nt, která vykazovala nejvyšší 79% podobnost s bakterií *Haliscomenobacter hydrosis* (CP002691.1). Druhá nejpodobnější byla sekvence archea *Methanothermobacter marburgensis* (CP001710.1) s identitou 73 %. Třetí nejpodobnější sekvence pocházela z chromozómu 7 šimpanze učenlivého – *Pan troglodytes* (AC193513.3) a vykazovala identitu 100 %. Z produktu B5 vzorku K8/U byla získána sekvence klonu I s délkou 247 nt vykazující nejvyšší 88% podobnost s krevničkou *Schistosoma margrebowiei* (LL880782.1). Další nejpodobnější byla sekvence *Angiostrongylus costariensis* (LK939734.1) s 89% identitou. Třetí nejpodobnější sekvence byla *Schistosoma curassoni* (LM078873.1) s 85% podobností. Z produktu B6, vzorku K8/U byly získány tři klony. Z klonu I byla získána sekvence 364 nt dlouhá, která byla porovnána s databází sekvencí GenBank. Nejvyšší 85% podobnost vykazovala sekvence mořské bakterie *Myxococcus fulvus*

(CP002830.1). Na druhém místě byla sekvence bakterie *Myxococcus xanthus* (CP000113.1) vykazující shodu 85 %. Třetí nejpodobnější sekvencí byla sekvence BAC klonu *Homo sapiens* (AC018890.13). Sekvence z klonu II byla dlouhá 234 nt a vykazovala nejvyšší 86% podobnost se sekvencí mRNA kinesinu těžkého řetězce trubénky *Salpingoeca* sp. (XM\_004991046.1). Druhá nejpodobnější sekvence byla z plazmidu pRmeGR4c bakterie *Sinorhizobium melioli* (CP003936.1) s podobností 91 %. Třetí nejpodobnější sekvence pocházela z bakterie *Pseudomonas cremoricolorata* (CP009455.1) a vykazovala 85% identitu. Sekvence z klonu III byla dlouhá 124 nt a vykazovala 84% podobnost s mRNA hypotetického proteinu bakterie *Capsaspora owczarzaki* (XM\_004365943.1). Další nejpodobnější sekvence byla sekvence bakterie *Thermus* sp. (CP003126.1) a vykazovala 78% identitu. Třetí nejpodobnější sekvence byla mRNA proteinu řasy *Volvox carteri* (XM\_002955380.1).

Ze vzorku K14/U (směsný fytoplankton z rybníku Svět, ČR) produktu B12 byly získány sekvence ze dvou klonů o velikosti 473 nt a 479 nt, které vykazovaly identitickou shodu u prvních tří nejpodobnějších sekvencí. Nejvyšší 87% podobnost byla u obou klonů zjištěna s *Mycobacterium* sp. (CP009914.1), 83% shoda byla zjištěna s jakem divokým – *Bos mutus* (XM\_005904871.1) a 83% shoda se sekvencí *Bos mutus* (XM:005226882.1).

U vzorku K18/U (směsný fytoplankton z rybníku č. 1 v Litultovicích, ČR) byla získána sekvence z produktu B13 dlouhá 221 nt. Při porovnání s databází GenBank ukázala 83% podobnost s motolicí jaterní – *Fasciola hepatica* (LM668941.1). Další nejvyšší 93% podobnost byla zjištěna s tasemnicí dětskou – *Hymenolepis nana* (LM398010.1). Na třetím místě byla sekvence okonovce nilského – *Oreochromis niloticus* (XR\_266747.1) vykazující 86% identitu.

U vzorku K21/U (směsný fytoplankton z rybníku č. 2 v Litultovicích, ČR) produktu B16 byla získána sekvence dlouhá 198 nt, která při porovnání s databází dostupných sekvencí vykazovala nejvyšší 87% podobnost se třemi různými geny pro trichohyalin kočkodana zeleného *Chlorocerebus sabaues* (XM\_008018109.1; XM\_008018108.1; XM\_008018107.1).

Ze vzorku K25/U (směsný fytoplankton z rybníku v Podolí, ČR) byly získány skvence z produktů B19 a B22. U produktu B19 byla s databází GenBank pomocí programu BLAST porovnávána sekvence dlouhá 365 nt vykazující nejvyšší 84% podobnost se sekvencí těžkého řetězce aligátora čínského – *Alligator sinensis* (JQ479335.1). Druhá nejvyšší podobnost 85 % byla se sekvencí mRNA hypotetického proteinu *Dictyostelium purpureum* (XM\_003291111.1). Třetí nejvyšší shoda byla s motolicí jaterní – *Fasciola hepatica* (LM656993.1) vykazující 89% shodu. Z produktu B21 byla získána sekvence o velikosti 106 nt, která vykazovala nejvyšší 93% shodu s mRNA globulinu blahovičnicku



*Eucalyptus grandis*. Druhá nejvyšší podobnost 86 % byla nalezena s mRNA ataxinu *Diaphorina citri* (XM\_010026098.1). Třetí sekvence v pořadí s 86% podobností pocházela z bakterie *Streptomyces hygrosopicus* subsp. *jinggangensis* (CP003720.1).

**Tabulka 13:** Identifikace získaných sekvencí pomocí algoritmu BLAST

Vzorek	Produkt	Klon	Nalezený organismus	Shoda [%]	Překrytí [%]	Accession number
K7/U	B2	I	<i>Variovorax paradoxus</i>	71	95	CP002417.1
		II	<i>Variovorax paradoxus</i>	70	93	CP002417.1
	B3	I	<i>Acidovorax ebreus</i>	94	82	CP001392.1
		II	<i>Alicyclophilus denitrificans</i>	94	91	CP002449.1
		III	<i>Alicyclophilus denitrificans</i>	94	84	CP002449.1
K8/U	B4	I	<i>Haliscomenobacter hydrosis</i>	73	78	CP002691.1
	B5	I	<i>Schistosoma margrebowiei</i>	88	16	LL880782.1
	B6	I	<i>Myxococcus fulvus</i>	85	11	CP002830.1
		II	<i>Salpingoeca</i> sp.	86	19	XM_004991046.1
		III	<i>Capsaspora owczarzaki</i>	84	29	XM_004365943.1
K12/U	B7	I	<i>Populus trichocarpa</i>	100	6	XM_002298229.1
		II	<i>Runella slithyformis</i>	80	15	CP002859.1
		III	<i>Populus trichocarpa</i>	100	6	XM_002298229.1
	B8	I	<i>Pantholops hogsonii</i>	84	30	XM_005977915.1
		II	<i>Hydrogenophaga</i> sp.	77	60	FR720598.2
		III	<i>Pantholops hogsonii</i>	84	41	XM_005977915.1
	B9	I	<b><i>Mycobacteriophage Daenerys</i></b>	<b>67</b>	<b>89</b>	<b>KF017005.1</b>
		II	<i>Triticum turgidum</i>	100	17	GQ451817.1
		III	<i>Vicugna pacos</i>	100	25	JN122622.1
	B10	I	<b><i>Mycobacterium phage 32HC</i></b>	<b>73</b>	<b>42</b>	<b>KJ028219.1</b>
II		<i>Vicugna pacos</i>	100	26	JN122622.1	
III		<i>Burkholderia</i> sp.	93	35	CP000151.1	

**Tabulka 13:** Identifikace získaných sekvencí pomocí algoritmu BLAST (pokračování)

Vzorek	Produkt	Klon	Nalezený organismus	Shoda [%]	Překrytí [%]	Accession number
K14/U	B11	-	<i>Phycodnavirus</i>	81	96	KF008032.1
	B12	I	<i>Mycobacterium</i> sp.	87	8	CP009914.1
		II	<i>Mycobacterium</i> sp.	87	8	CP009914.1
K18/U	B13	-	<i>Fasciola hepatica</i>	83	18	LM668941.1
	B14	-	-	-	-	-
	B15	-	-	-	-	-
K21/U	B16	-	<i>Chlorocerebus sabaeus</i>	87	19	XM_008018109.1
	B17	-	-	-	-	-
K22/U	B18	-	-	-	-	-
K25/U	B19	-	<i>Aligator sinensis</i>	84	13	JQ479335.1
	B20	-	-	-	-	-
	B21	-	<i>Eucalyptus grandis</i>	93	25	XM_010026098.1

## 6 Diskuze

Viry jsou podstatnou součástí vodního prostředí, ve kterém se účastní mnoha biologických-chemických a ekologických dějů. Jejich vliv na vodní ekosystém a organismy, hlavně mikroorganismy, je v posledních letech intenzivně zkoumán. Klíčovým zájmem většiny studií je zjistit přesný počet virových částic ve vodě, dále je zkoumán vliv virů na koloběh látek ve vodních ekosystémech, zvyšování genové diverzity virových hostitelů pomocí horizontálního přenosu genů, rezistence k virové infekci nebo úmrtnost bakterií a fytoplanktonu zapříčiněná viry.

Klíčovým cílem této práce bylo zjistit, zda vzorky obsahující řasy a sinice odebrané ze stojatých sladkých vod ČR a USA jsou infikovány viry a o jaké viry se jedná. Pro experimenty bylo použito celkem 24 vzorků (8 jednodruhových kmenových kultur sinic a 16 přírodních vzorků se směsným fytoplanktonem). Nejdříve byla izolována DNA, které byla amplifikována pomocí nested PCR, získané produkty byly osekvenovány a porovnány s dostupnými sekvencemi v databázi GenBank programem BLAST. Viry byly nalezeny pouze ve dvou vzorcích: vzorek K12 (směsný fytoplankton neznámého původu s obsahem řasy rodu *Cladophora*, ČR) vykazoval shodu s mykobakteriofágy a u vzorku K14 (směsný fytoplankton z rybníku Svět, Třeboň, ČR) byl potvrzen nález blíže neurčeného phycodnaviru.

Mykobakteriofágové jsou viry napadající mikrobiální hostitele. Všichni dosud charakterizovaní zástupci patří do řádu *Caudovirales*, mají dsDNA a řadí se do morfotypu *Siphoviridae* nebo *Myoviridae*. Jejich genomová variabilita je obrovská, doposud bylo izolováno více než 3600 mykobakteriofágů, z nichž bylo zhruba 600 osekvenováno a rozděleno do 21 klastrů a dalších subklastrů (Franceschelli *et al.*, 2014). Vzorek K12/U, produkt B9 vykazoval 67% podobnost s *Mycobacteriophage Daenerysa* produkt B10 ze stejného vzorku K12/U vykazoval 73% podobnost s *Mycobacterium phage* 32HC. Oba nalezené viry byly teprve nedávno popsány a informace o nich jsou sporadické. *Mycobacterium phage Daenerys* se nachází v půdě a byl izolován z bakterie *Mycobacterium smegmatis*. Jeho genom byl publikován Megan Schlegemilch v roce 2012 na databázi GenBank, virus patří do čeledi *Siphoviridae*, klastru F, subklastru F1 ([www.phagesdb.org/phages/Daenerys/](http://www.phagesdb.org/phages/Daenerys/)). *Mycobacterium phage* 32HC byl poprvé popsán v práci Franceschelli *et al.* (2014) a patří do čeledi *Siphoviridae*. Mykobakteriofágové nenapadají řasy a sinice, narozdíl od phycodnavirů. Jejich nález ve vzorcích svědčí pravděpodobně o kontaminaci vody způsobené splachem z půdy.

Vzorek K14/U vykazoval 81% shodu s genem DNA polymerázy klonu phycodnaviru 399-P7.13, jehož sekvenci publikovali Rozon *et* Short (2013). Vir byl spolu s dalšími izolován ze zátoky Quinte v Kanadě. Čeleď *Phycodnaviridae* pod sebou zahrnuje viry napadající sladkovodní a mořské řasy. Jedná se pravděpodobně o první důkaz nálezu virů řas z čeledi *Phycodnaviridae* na českém území.

Nález pouze jednoho viru napadající řasy ve 24 vzorcích může mít více vysvětlení. Jako nejpravděpodobnější se jeví hypotéza, že použité degenerované primery AVS1, AVS2, POL jsou vysoce nespecifické a amplifikují i neviróvé segmenty DNA, převážně bakteriální. Výše zmíněné primery byly navrženy ve studii Chen *et* Suttle (1995) pro amplifikaci a identifikaci genu DNA polymerázy (*pol*) virů, které napadají tři rody microalgae (*Chlorophyceae*, *Prasinophyceae*, *Prymnesiophyceae*). Virově specifické primery AVS1, AVS2 byly navrženy na základě skupiny aminokyselin specifické pro *pol* geny virů PBCV-1 a NY-2A napadajících endosymbiotické *Chlorella*-like řasy a viru MpV-SP1 napadající fotosyntetického bičíkovce *Micromonas pusilla*. Nested primer POL byl navržen na základě vysoce konzervativní sekvence aminokyselin YGDTDS nalezené ve většině genů kódujících DNA polymerázu z rodiny B. Studie potvrdila, že nested PCR s uvedenými primery je vhodnou metodou pro detekci virů napadajících výše vyjmenované rody řas a jim příbuzné a naopak prokázala, že pro viry napadající rody *Phaeophyceae* (hnědé mořské řasy) a jim příbuzné tato metoda vhodná není. Teorii o nespificičnosti primerů potvrzuje délka PCR produktů vzniklých amplifikací DNA s primery AVS1/POL, která by měla být ~700 bp (Chen *et* Suttle, 1995; Short *et* Short, 2008). PCR produkty vzniklé u pozitivních vzorků použitých v této práci vytvářely na agarózovém gelu „žebřík“ a měly délku mezi 200 až 1500 bp. Délku okolo 700 bp měl z izolovaných produktů pouze vzorek K8/U (sinice, Florida), u kterého nebyl žádný vir dokázán. Vzorek navíc pocházel z jednokmenové kultury sinice, proto by u něj primery neměly fungovat. Chen *et* Suttle (1995) uvádí, že jejich metoda je vhodná pro viry napadající mořské microalgae a že specifita primerů je zachována, ikdyž jsou vysoce degenerované. Vzorky použité v této práci byly výhradně sladkovodní, což mohlo výsledky také ovlivnit. Nicméně v jiných studiích virů sladkovodních řas byl jejich postup úspěšně zopakován (Clasen *et* Suttle, 2009; Rozon *et* Short, 2013; Short *et* Short, 2008). Nejen podle těchto prací jsou tedy primery AVS1, AVS2 a POL navrženy vhodně pro identifikaci většiny virů napadajících sladkovodní i mořské řasy a problém, který nastal v této práci, nebyl úspěšně vysvětlen.

Dalším důvodem, proč viry nebyly izolovány z více vzorků, by mohly být nevhodně zvolené primery v závislosti na druhu zkoumaných vzorků. Vzorky použité v této práci

zahrnovaly převážně jednodmenové kultury sinic různých rodů a smíšený fytoplankton, u kterého nebylo zjištěno, co přesně obsahuje. Je tedy možné, že vybrané primery určené k detekci virů řas nebyly vhodně zvoleny a možným řeším aspoň pro jednodmenové kultury sinic by bylo využití primerů určených pro detekci virů sinic.

Poslední vysvětlení zahrnuje změny v obsahu virů ve vodním prostředí. Jak již bylo uvedeno v literární rešerši, koncentrace virů ve vodním prostředí není vždy stejná a mění se. I když je všeobecně přijmaným faktem, že viry jsou ve vodě nejhojnějšími biologickými zástupci, mohl být obsah virů v konkrétním místě a čase odběru nízký nebo se zde viry vůbec vyskytovaly.

## 7 Závěr

V práci byla vypracována literární rešerše na téma viry řas a sinic se zaměřením na sladké vody. V experimentální části byla testována přítomnost virů ve 24 vzorcích obsahujících řasy a sinice pocházejících ze sladkovodních rybníků a řeky České Republiky a jezer státu Florida, USA. Byla použita nested PCR s virově specifickými primery AVS1, AVS2 a POL sloužícími k amplifikaci virového genu pro DNA polymeráza následně byla provedena sekvenační analýza. Prokázán byl nález virů ve dvou vzorcích, z toho jeden virus pocházel z čeledi *Phycodnaviridae*, jejíž zástupci napadají řasy. Druhý nalezený virus patřil do řádu *Caudovirales*, jehož zástupci mohou způsobovat infekce sinic. V našem případě se však jednalo o virus napadající mykobakterie (mykobakteriofág).

## 8 Seznam použitých zkratek

ATCV	<i>Acanthocystis turfacea Chlorella virus</i>
BAC	bacterial artificial chromosome
BLAST	basic local alignment search tool
bp	pár bází (base pair)
C	cytosin
CPS	capsid assembly protein
CRISPRs	clustered regularly interspaced short palindromic repeats
DAPI	4'6-diamidino-2-phenylindol
DNA	deoxiribonukleová kyselina
dNTPs	deoxyribonukleozid trifosfáty
dsDNA	dvouvláknová deoxiribonukleová kyselina (double stranded)
ESV-1	<i>Ectocarpus siliculosusvirus 1</i>
G	guanin
HaV	<i>Heterosigma akashiwovirus</i>
HaV01	<i>Heterosigma akashiwovirus</i> klon 1
LB médium	Lauria-Bertrani médium
MCP	major capsid protein
MpV-SP1	<i>Micromonas pusillavirus SP1</i>
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
nt	nukleotidy
PBCV-1	<i>Paramecium bursaria Chlorellavirus 1</i>
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
RNA	ribonukleová kyselina
rpm	počet otáček za minutu
sp.	druh ( <i>species</i> )
spp.	druhy ( <i>species</i> )
subsp.	poddruh ( <i>subspecies</i> )
TEM	transmisní elektronová mikroskopie
tRNA	transferová ribonukleová kyselina
Yo-Pro-1	{4-[3-methyl-2,3-dihydro-(benzo-1,3-oxazol)-2-methylmethylen]-1 (3'-trimethylammoniumpropyl)-quinoliniumdiodid}

## 10 Seznam použité literatury

- Ackermann H. W. (2007):** 5500 Phages examined in the electron microscope. *Arch. Virol.* 152: 227-243.
- Alonso M. C., Jimenez-Gomez F., Rodriguez J., Borrego J. J. (2001):** Distribution of virus-like particles in an oligotrophic marine environment (Alboran sea, Western Mediterranean). *Microb. Ecol.* 42: 407-415.
- Baker A. C., Goddard V. J., Davy J., Schroeder D. C., Adams D. G., Wilson W. H. (2006):** Identification of a diagnostic marker to detect freshwater cyanophages of filamentous cyanobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 2713-2719.
- Bancroft I., Smith F. J. (1998):** The isolation of genomic DNA from cyanophages infecting *Nostoc* and *Anabaena* species of cyanobacteria. *New Phytol.* 110: 233-239.
- Berg O, Børsheim K. Y., Bratbak G., Heldal M. (1989):** High abundance of viruses found in aquatic environments. *Nature* 340: 467-468.
- Bratbak G., Egge J. K., Heldal M. (1993):** Viral mortality of the marine alga *Emiliania huxleyi* (Haptophyceae) and termination of algal blooms. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 93: 39-48
- Brum J. R., Schenck R. O., Sullivan M. B. (2013):** Global morphological analysis of marine viruses shows minimal regional variation and dominance of non-tailed viruses. *ISME J.* 7: 1738-1751.
- Brussaard C. P. D., Bratbak G., Baudoux A. C., Ruardij P. (2007):** Phaeocystis and its interaction with viruses. *Biogeochemistry* 83: 201–215.
- Bubeck J. A., Pfitzner J. P. (2005):** Isolation and characterization of a new type of chlorovirus that infects an endosymbiotic *Chlorella* strain of the heliozoon *Acanthocystis turfacea*. *JVG* 86: 2871-2877.
- Clasen J. L., Suttle C. A. (2009):** Identification of freshwater *Phycodnaviridae* and their potential phytoplankton hosts, using DNA *pol* sequence fragments and a genetic-distance analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 991-997.
- Cochlan W. P., Wikner J., Steward G. F., Smith D. C., Azam F. (1993):** Spatial distribution of viruses, bacteria and chlorophyll *a* in a neritic, oceanic and estuarine environments. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 92: 77-87.
- Dunigan D. D., Fitzgerald L. A., Van Etten J. L. (2006):** *Phycodnaviridae*: a peek at genetic diversity. *Virus Res.* 117: 119-132.



- Evans C., Archer S. D., Jacquet S., Wilson W. H. (2003):** Direct estimates of the contribution of viral lysis and microzooplankton grazing to the decline of a *Micromonas* spp. population. *Aquat. Microb. Ecol.* 30:207–219.
- Farnell-Jackson E. A., Ward A. K. (2003):** Seasonal patterns of viruses, bacteria and dissolved organic carbon in a riverine wetland. *Freshw. Biol.* 48:841–851.
- Fischer U. R., Velimirov B. (2002):** High control of bacterial production by viruses in a eutrophic oxbow lake. *Aquat. Microb. Ecol.* 27:1–12.
- Forterre P., Soler N., Krupovic M., Marquet E., Ackermann H. W. (2013):** Fake virus particles generated by fluorescence microscopy. *Trends Microbiol.* 21: 1-5.
- Frada M., Probert I., Allen M. J., Wilson W. H., Vargas C. (2008):** The "Cheshire Cat" escape strategy of the coccolithophore *Emiliana huxleyi* in response to viral infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 15944-15949.
- Franceschelli J. J., Suarez C. A., Terán L., Raya R. R., Morbidoni H. R (2014):** Complete genome sequences of nine mycobacteriophages. *Genome Announc.* 2: e00181-14.
- Fuhrman J. A. (1999):** Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. *Nature* 399: 541-548.
- Gachon C. M. M., Sime-Ngando T., Strittmatter M., Chambouvet A., Kim G. H. (2010):** Algal diseases: spotlight on a black box. *Trends Plant Sci.* 15: 633-640.
- Hennes K. P., Simon M. (1995):** Significance of bacteriophages for controlling bacterioplankton growth in a mesotrophic lake. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 333- 340.
- Hennes K. P., Suttle C. A., Chan A. M. (1995):** Fluorescently labeled virus probes show that natural virus populations can control the structure of marine microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3623-3627.
- Horvath P., Barrangou R. (2010):** CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science* 327: 167-170.
- Chen F., Lu J. R., Binder B. J., Liu Y. C., Hodson R. E. (2001):** Application of digital image analysis and flow cytometry to enumerate marine viruses stained with SYBR Gold. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 539–545.
- Chen F., Suttle C. A. (1995):** Amplification of dna polymerase gene fragments from viruses infecting microalgae. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1274-1278.
- Klut M. E., Stockner J. G. (1990):** Virus-like particles in an ultraoligotrophic lake on Vancouver Island, British Columbia. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 47:725–730.

- Larsen J. B., Larsen A., Bratbak G., Sandaa R. -A. (2008):** Phylogenetic analysis of members of the *Phycodnaviridae* virus family, using amplified fragments of the major capsid protein gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 3048–3057.
- Lee R. E. (1971):** Systemic viral material in the cells of the freshwater red alga *Sirodotia tenuissima* (Holden) Skuja. *J. Cell. Sci.* 8: 623-631.
- Leff A. A., Leff L. G., Lemke M. J., Heath R. T., Gao X. (1999):** Abundance of planktonic virus-like particles in lake Erie subsurface waters. *Ohio J. Sci.* 99: 16-18.
- Maranger R, Bird D. F. (1995):** Viral abundance in aquatic systems: a comparison between marine and fresh waters. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 121: 217–226.
- Mayer J. A., Taylor F. J. R. (1979):** A virus which lyses the marine nanoflagellate *Micromonas pusilla*. *Nature* 281:299–301.
- Meints R. H., Van Etten J. L., Kuczmarski D., Lee K., Ang B. (1981):** Viral infection of the symbiotic *Chlorella*-like alga present in *Hydra viridis*. *Virology* 113: 698-703.
- Müller, Malin, G., Wilson, W. H., Bratbak, G., Liss, P. S., Mann, N. H. (1998):** Elevated production of dimethylsulfide resulting from viral infection of cultures of *Phaeocystis pouchetii*. *Limnol. Oceanogr.* 43:1389–1393.
- Nagasaki K., Tarutani K., Yamaguchi M. (1999):** Growth characteristics of *Heterosigma akashiwo* virus and its possible use as a microbial agent for red tide control. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 898-902.
- Nagasaki K., Yamaguchi M. (1997):** Isolation of a virus infectious to the harmful bloom causing microalga *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae). *Aquat Microb Ecol.* 13:135–140. *Nature* 459: 207-12.
- Pickett-Heaps J. D. (1972):** A possible virus infection in the green alga *Oedogonium*. *J. Phycol.* 8: 44-47.
- Rohwer R., Thurber R. V. (2009):** Viruses manipulate the marine environment. *Nature* 459: 207-212.
- Rozon R. M., Short S. M. (2013):** Complex seasonality observed amongst diverse phytoplankton viruses in the Bay of Quinte, an embayment of Lake Ontario. *Freshw. Biol.* 58: 2648-2663.
- Safferman R. S., Morris M. E. (1963):** Algal virus: Isolation. *Science* 140: 679-680.
- Sano E., Carlson S., Wegley L., Rohwer F. (2004):** Movement of viruses between biomes. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 5842–5846.
- Short S. M., Short C. M. (2008):** Diversity of algal viruses in various North American freshwater environments. *Aquat. Microb. Ecol.* 51: 13-21.

- Sieburth J. M., Johnson P. W., Hargraves P. E. (1988):** Ultrastructure and ecology of *Aureococcus anophagefferens* gen. et sp. nov. (Chrysophyceae): the dominant picoplankton during a bloom in Narragansett Bay, Rhode Island, summer 1985. *J. Phycol.* 24: 416-425.
- Sime-Ngando T. (2014):** Environmental bacteriophages: viruses of microbes in aquatic ecosystems. *Front. Microbiol.* 5: 1-14
- Suttle C. A. (2005):** Viruses in the sea. *Nature.* 437: 356-361.
- Suttle C. A. (1994):** The significance of viruses to mortality in aquatic microbial communities. *Microb. Ecol.* 28: 237-243.
- Suttle C. A. (2000):** Cyanophages and their role in the ecology of cyanobacteria. In: Whitton, A., Potts, M., (ed): *The ecology of cyanobacteria*, pp. 563-589, Kluwer Academic publishers, Amsterdam.
- Suttle C. A., Chan A. M., Cottrell M. T. (1990):** Infection of phytoplankton by viruses and reduction of primary productivity. *Nature* 347: 467-469.
- Thomas R., Grimsley N., Escande M. L., Subirana L., Derelle E., Moreau H. (2011):** Acquisition and maintenance of resistance to viruses in eukaryotic phytoplankton populations. *Environ. Microbiol.* 13: 1412-1420.
- Torrella F., Morita R. Y. (1979):** Evidence by electron micrographs for a high incidence of bacteriophage particles in the waters of Yaquina Bay, Oregon: ecological and taxonomical implications. *Appl. Environ. Microbiol.* 37: 774-778.
- Toth R., Wilce R. T. (1972):** Viruslike particles in the marine alga *Chorda tomentosa* Lyngbye (Phaeophyceae). *J. Phycol.* 8:126-130.
- Tijdens M., Hoogveld H. L., Kamst-van Agterveld M. P., Simis S. H. G., Baudoux A. C., Laanbroek H. J., Gons H. J. (2008):** Population dynamics and diversity of viruses, bacteria and phytoplankton in a shallow eutrophic lake. *Microb. Ecol.* 56: 29-42.
- Van Etten J. L., Van Etten C. H., Jonson J. K., Burbank D. E. (1985):** A survey for viruses from fresh water that infect a eucaryotic *Chlorella*-like green alga. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 1326-1328.
- Van Etten J. L., Graves M. V., Müller D. G., Boland W., Delaroque N. (2002):** *Phycodnaviridae* – large DNA algal viruses. *Arch. Virol.* 147: 1479-1516.
- Van Etten J. L., Lane L. C., Meins R. H. (1991):** Viruses and viruslike particles of eukaryotic algae. *Microbiol. Rev.* 55: 586-620.
- Weinbauer M. G. (2004):** Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiol. Rev.* 28: 127-181.

- Weitz J. S., Wilhelm S. W. (2012):** Ocean viruses and their effects on microbial communities and biogeochemical cycles. *Biol. Rep.* 4: 17.
- Wilhelm S. W., Matteson A. R. (2008):** Freshwater and marine viroplankton: a brief overview of commonalities and differences. *Freshw. Biol.* 53: 1076–1089.
- Wilson W. H., Van Etten J. L., Allen H. J. (2009):** The *Phycodnaviridae*: the story of how tiny giants rule the world. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 328: 1-42.
- Wommack K. E., Colwell R. R. (2000):** Viroplankton: viruses in aquatic ecosystems. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64: 69-114.