

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
PEDAGOGICKÁ FAKULTA
KATEDRA BIOLOGIE

**Okrasné parkové dřeviny
zásobárnou virů čeledi
Rhabdoviridae**

Lucie Pecková

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Karel Petržík, CSc.

České Budějovice 2012

Prohlašuji, že jsem svoji diplomovou práci na téma „**Okrasné parkové dřeviny zásobárnou virů čeledi Rhabdoviridae**“ vypracovala samostatně pouze s využitím konzultací s vedoucím diplomové práce, pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě Pedagogickou fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam průběhu a výsledky obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 20. 4. 2012

.....
Pecková Lucie

ABSTRAKT:

Pecková L., 2012: Okrasné parkové dřeviny zásobárnou virů čeledi Rhabdoviridae.

Magisterská diplomová práce, Pedagogická fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, České Budějovice. 39 s.

Viry čeledi Rhabdoviridae napadající rostlinné hostitele, byly dosud popisovány pouze u krytosemenných rostlin. V této práci byla poprvé studována rhabdovirová infekce u nahosemenné rostliny – jinanu dvoulaločného. Přestože na žádném z náhodně vybraných rostlinných materiálech nebyly evidentní symptomy infekčního napadení, byla prostřednictvím molekulárních metod a detekčních primerů prokázána rhabdovirová infekce u šesti odebraných vzorků rostlinného materiálu. Získané nukleotidové a aminokyselinové sekvence porovnané se sekvencemi v GenBank potvrzují výskyt viru(ů) rodu Rhabdovirus. Sekvence vykazovaly určitou analogii s *Strawberry crinkle virus* řazeným mezi Cytorhabdoviry. Z analýz vyplynulo, že vzájemná homologie nukleotidových sekvencí jednotlivých izolátů je rozdílná a s velkou pravděpodobností byla ve vzorcích z jinanu dvoulaločného poprvé prokázána přítomnost dvou zatím neidentifikovaných virů. Definitivní zařazení bude záviset na získání a porovnání dalších sekvencí z genomu izolátů a na zjištění jejich některých biologických vlastností.

Klíčová slova: Jinan dvoulaločný (*Ginkgo biloba*), virová infekce, rostlinné rhabdoviry, *Strawberry crinkle virus*, nukleotidové sekvence

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Karel Petržík, CSc.

ABSTRACT:

Pecková L., 2012: The ornamental park tree species as a resource of the Rhabdoviridae family viruses.

Master's Thesis, Faculty of Education, University of South Bohemia in České Budějovice, České Budějovice. 39 pp.

Rhabdoviridae family viruses attacking the plant hosts were only described at the angiosperms. In this work, a gymnosperm rhabdoviridae infection was described for the first time ever – specifically at *Ginkgo biloba*. Even though there were not observed any kinds of obvious infection symptoms on any of randomly chosen plant samples, through the molecular methods and detection primers the rhabdoviridae infection was proved at six of the plant samples. The acquired nucleotide and amino acid sequences, which were compared with the GenBank sequences, confirm the Rhabdoviridae family viruses occurrence. These given sequences demonstrated a certain analogy with a *Strawberry crinkle virus* assigned to the genus of Cytorhabdoviruses. The analyses proved a different reciprocal homology among the nucleotide sequences of the individual isolates, and in all likelihood an occurrence of two up to now unknown viruses in the *Ginkgo biloba* samples was proved for the first time. A definite categorization will be dependent on an acquisition and comparison of other sequences from the isolates genome and also on certain biological characteristics observation.

Keywords: *Ginkgo biloba*, viral infection, plant rhabdoviruses, *Strawberry crinkle virus*, nucleotide sequences

The supervisor: Doc. RNDr. Karel Petrzik, CSc.

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu své diplomové práce Doc. RNDr. Karlu Petrzikovi, CSc. za odborné vedení, trpělivost a vstřícný přístup.

Dále bych ráda poděkovala kolektivu laboratoře Ústavu molekulární biologie rostlin, zvláště pak paní Olze Kubešové za cenné rady při zpracovávání materiálu v laboratoři a Mgr. Tatianě Sarkisové za podporu.

Národnímu památkovému ústavu a odborům životního prostředí příslušných měst za pomoc při získávání informací o vysazených stromech, ze kterých byly odebírány rostlinné vzorky pro výzkum.

Děkuji své rodině, která mě v práci podporovala a pomáhala mi se sběrem jednotlivých vzorků.

OBSAH:

1 ÚVOD	7
2 LITERÁRNÍ PŘEHLED	8
2.1 VIRY	8
2.2 INTERAKCE VIRŮ S ROSTLINNÝM HOSTITELEM	10
2.3 GINKGO BILOBA – JINAN DVOULALOČNÝ	12
2.3.1 Škůdci a choroby	15
2.4 VIRY ČELEDI RHABDOVIRIDAE	16
2.4.1 Klasifikace	16
2.4.2 Struktura a organizace virionu	18
2.4.3 Hostitelé a vektory rostlinných rhabdovirů	22
3 MATERIÁL A METODY	24
3.1 ROSTLINNÝ MATERIÁL	24
3.2 METODY	26
3.2.1 Izolace RNA	26
3.2.2 Reverzní transkripce: RT-PCR	27
3.2.3 Návrh univerzálních primerů pro polymerázovou řetězovou reakci (PCR)	28
3.2.4 Polymerázová řetězová reakce (PCR)	28
3.2.5 Elektroforetické vyhodnocení reakce	29
3.2.6 Extrakce DNA z gelu	29
3.2.7 Sekvenování DNA a analýza sekvencí	29
3.3 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	30
4 VÝSLEDKY	31
5 ZÁVĚR A DISKUSE	35
5.1 DIDAKTICKÉ VYUŽITÍ PRÁCE V PEDAGOGICKÉ PRAXI	36
6 SEZNAM LITERATURY	37

1 ÚVOD

Celá staletí byla pozorována a studována virová onemocnění, aniž by byl odhalen jejich virový původ. Od významného objevu virů uběhlo jedno století. Za tuto krátkou dobu nám, díky moderním technologiím, tento „nový“ svět nebuněčných forem života odhaluje tisíce druhů infikujících různé hostitele, jejich vlastnosti a projevy.

Dosavadní studie se ještě nikdy nezabývaly spojením viru, napadajícím převážně rostliny krytosemenné, z čeledi Rhabdoviridae a dřeviny ze skupiny nahosemenných, která je považována za nejstarší dřevinu na světě, známou pod názvem *Ginkgo biloba*. A právě myšlenka propojení dvou prastarých forem, na jedné straně nejjednodušších biologických systémů na hranici živé hmoty a na straně druhé za nejstarší považované dřeviny, se stala námětem pro zpracování této diplomové práce. Základní otázkou bylo, zda je vůbec možná rhabdovirová infekce u nahosemenné rostliny.

Hlavním cílem diplomové práce bylo, prostřednictvím uvedených metod a laboratorních postupů, zjistit, prokázat a identifikovat rhabdovirovou infekci u dlouhověké parkové dřeviny – jinanu dvoulaločného (*Ginkgo biloba*).

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Viry

Viry představují vůbec nejjednodušší biologické systémy, které nedosahují buněčné úrovně. Izolovaný virus, jednotlivá infekční částice viru – virion, obsahuje genom ve formě DNA nebo RNA a obvykle postrádá metabolické enzymy, ribozomy a další proteiny a faktory potřebné pro proteosyntézu. Na základě těchto poznatků, můžeme říci, že virus je vnitrobuněčný parazit. Virový genom se skládá z jedné nebo více nukleových kyselin uzavřených v bílkovinném obalu – kapsidě, a v některých případech (u řady živočišných virů a rostlinných rhabdovirů) ještě obklopených vnějším lipidovým obalem (Navrátil, 2007).

Virová kapsida se u rostlinných virů skládá z jednoho až tří druhů proteinových molekul (protomerů). Uspořádání proteinového obalu určuje symetrii virionu, která může být helikální nebo ikosahedrická. Jen ve výjimečných případech byly nalezeny viry, které netvoří kapsidy (mnohé obalené viry, např. poxviry) (Walkey, 1991) a na druhou stranu pouze viry čeledi Rhabdoviridae, na které se práce zaměřuje, mají typický lipidový obal.

Podle druhu nukleové kyseliny, která tvoří virový genom, jsou viry rozdělovány na DNA-viry nebo RNA-viry. Nikdy však neobsahují oba druhy nukleových kyselin současně. V obou případech je genom běžně uspořádán jako jediná lineární nebo kružnicová molekula. DNA genom nacházíme jen u několika desítek rostlinných virů. Nukleová kyselina může být jednořetězcová RNA/DNA (ssRNA, ssDNA) nebo dvouřetězcová RNA/DNA (dsRNA, dsDNA). Pokud je nukleová kyselina virové částice jednořetězcová, může mít polaritu pozitivní(+) nebo negativní (-). Polarita má význam z hlediska strategie replikace a transkripce virového genomu. Většina rostlinných virů má genom tvořený (+)RNA. Ta se chová bezprostředně po infekci hostitelské buňky jako mRNA, tzn. podle ní se na ribozomech v buňce přepisuje genetická informace do sekvence aminokyselin. Narozdíl od (+)RNA nemůže být (-)RNA přímo překládána do sekvence aminokyselin v polypeptidovém řetězci. Za pomoci RNA-dependentní RNA polymerázy je přepsána do komplementárního řetězce (+)RNA, který až poté funguje jako mRNA a stává se templátem pro syntézu nových virových (-)RNA (Navrátil, 1997).

Po více než stech letech, kdy Dmitrij Ivanovskij popsal první virové agens, se dosud eviduje více než 3 600 virových druhů (Bos, 1999). Navíc neustále jsou popisovány nové druhy a izoláty virů. Současný taxonomický systém virů se zakládá na arbitrárním hierarchickém uspořádání do řádů (přípona -virales), čeledí (přípona -viridae), podčeledí (-virinae), rodů (-virus) a jednotlivých druhů podle typu nukleové kyseliny, tvaru kapsidu, uspořádání genomu a replikační strategie virů (Španielová, 2000).

Pro přehledové uspořádání se používá i nadále dělení virů do skupin dle hostitelů: viry infikující bezobratlé, obratlovce, rostliny, prvoky, houby a bakterie (Navrátil, 2007).

2.2 Interakce virů s rostlinným hostitelem

Mezi rostlinné viry zařazujeme takové viry, které jsou schopné infikovat rostlinné buňky a množit se v nich. Při pronikání do hostitelských buněk stojí, na rozdíl od živočišných virů a bakteriofágů, před rostlinnými viry překážka v podobě kutikuly a buněčné stěny. Přímá interakce mezi virem a cytoplazmatickou membránou hostitelské buňky je zprostředkována jen díky poškozeným místům na buněčné stěně, nikoliv prostřednictvím aktivního vstupu přes receptory jako je tomu u živočišných virů. K poškození buněčné stěny může dojít dvěma zásadními mechanismy: mechanickým porušením buněčné stěny, nebo za porušení může jiný organismus tzv. přenašeč (vektor) – hmyz, parazitické houby, háďátka. Jednotlivé druhy virů se pak mezi hostiteli šíří pro ně charakteristickou cestou. Nejčastěji se setkáváme s přenosem savým a bodavým hmyzem – mšicemi, křísy, molicemi. Mnohem méně rozšířený je přenos háďátky, půdními houbami, pylem a semenem. Významným vektorem rostlinných virů je i člověk, který šíří viry vegetativním množением infikovaných rostlin, roubováním a agrotechnikou. Díky mezibuněčnému spojení rostlinných buněk plasmodesmaty se viry šíří z místa poškození z buňky do buňky a dále je vodivým systémem – cévními svazky zajištěno rozšíření infekce do celé rostliny. Pouze malá část rostlinných virů se specializuje na určitý typ pletiv (Čeřovská, 2010).

Virová infekce může prakticky porušit všechny fyziologické funkce a nepřímo tedy celou morfologii a anatomii rostlin. Každý příznak napadené rostliny pomáhá diagnostikovat virové onemocnění. Mezi pozorovatelné symptomy patří například dekolizace (žloutnutí listů nebo celých rostlin, mozaiky listů), nekrotické léze na listech, nekrózy celých rostlin, nebo habituální změny (svíjení listů a jejich deformace). Mnohé viry však symptomy onemocnění nevyvolávají a jejich přítomnost v rostlině zůstává skryta (Matthews, 1991).

Náš pohled na viry se různí, obecně jsou však viry chápány jako škodlivé. Mnohá onemocnění, která způsobují, mají negativní dopad na kvalitu i kvantitu (výnosy) zemědělských plodin, a tedy nepřímo negativně ovlivňují ekonomiku. Na druhé straně některé virové enzymy se využívají v biochemii, molekulární biologii a některých dalších unikátních vlastností virů (samosestavování kapsidů, schopnost rychlého množení) se využívá v biotechnologiích (Bos, 1999).

K ochraně rostlin před riziky zavlečení a rozšiřování nejen rostlinných virů, ale i jiných významných škodlivých organismů rostlin a rostlinných produktů do nových oblastí, se dnes uplatňují fyto-sanitární opatření (Bartoš, 1968). U nás je jejich prováděním pověřena Státní rostlinolékařská správa (SRS), která vychází z opatření Evropské unie nařízených Evropským parlamentem a Radou. Respektive SRS vyhláší tato opatření podle § 11 odst. 3 a § 72 odst. 5 písm. j) zákona č. 326/2004 Sb., o rostlinolékařské péči a o změně některých souvisejících zákonů. V ČR jsou tato opatření závazná pro fyzické a právnické osoby podle § 3 odst. 2 zákona č. 326/2004 Sb. (Navrátilová, 2012; Státní rostlinolékařská správa online).

Tato opatření se týkají současných dovozů rostlin a rostlinného materiálu. Mnohé viry k nám byly nepochybně v minulosti zavlečeny s okrasnými rostlinami (např. viry tabáku, virus bronzovitosti rajčete se rozšířil spolu se zavlečením účinného vektora), šlechtitelským nebo množitelským materiálem apod. O řadě zavlečených virů samozřejmě nevíme.

2.3 Ginkgo biloba – jinan dvoulaločný

Ginkgo biloba, u nás známý pod názvem jinan dvoulaločný, je jediným zástupcem rodu z čeledi Ginkgoaceae – jinanovité nahosemenných rostlin. Jinan dvoulaločný je považován za nejstarší strom, jeho fosilie se datují do období permu, tj. do období před 280 miliony let. Na základě četných nálezů z období Jury (před 213 mil. lety) se vědci domnívají, že rod Ginkgo (a rody příbuzné – *G. coriacea*, *G. adiantoides*, *G. tigrensis*, *G. apodes*, *G. digitata*, *G. yimaensis*, *G. gardneri*) byl v té době nejrozšířenějším stromem (Asie, Evropa a Severní Amerika) (Jindráček, 2008). Z této druhově bohaté skupiny se dochoval pouze jediný reliktní druh rodu Ginkgo. Díky své mimořádné odolnosti vůči klimatickým změnám a přírodním živlům se během posledních 150 milionů let téměř nezměnil. Dnes se jeho původní endemický výskyt pouze odhaduje. Před 2000 lety byl jinan objeven v jihovýchodní Číně, kde jej lidé začali využívat (na dřevo, jako potravu, ve farmakologii) a uctívat. A to i přesto, že byl po řadu století považován za vyhynulý (Kwant, 1999).

Teprve při svém pobytu v Japonsku (v letech 1690 – 1692), kam jinan přinesli buddhističtí kněží, jej poprvé pro „západní svět“ popsal německý botanik Engelbert Kaempfer (1651 – 1716) ve své knize *Amoenitatum exoticarum* (1712). Právě on dal stromu nový název Ginkgo, které v původním znění „vinxing“ znamená „stříbrná meruňka“. Z Evropy jinan zmizel asi před 3 miliony lety, ale Kaempfer tuto tradici obnovil. Přivezl mnoho semen, z nichž byl roku 1730 vysazen první strom v botanické zahradě v Utrechtu v Holandsku. Jak se později ukázalo, jednalo se o samčího jedince tak jako většina dovezených semen. První samičí strom byl nalezen roku 1814 v Ženevě (Pilát, 1964).

Ačkoliv se řadí mezi nahosemenné rostliny, pro které jsou typické jehlicovité listy přetrvávající na stromě více než rok, jinany disponují listy opadavými. Na obrázku 1 jsou znázorněny střídavě vyrůstající listy ve svazečcích na brachyblastech se štíhlými řapíky a čepelí kosodelníkovitě vějířovitou. Čepel je uprostřed rozdělena zářezem ve dva laloky, jak je patrné z obrázku 2, nebo jsou nepravidelně vícelaločnaté s žilnatinou skoro rovnoběžnou vidličnatě větvenou (Musil, 2007).



Obrázek 1: Uspořádání listů jinanu do brachyblastů



Obrázek 2: List jinanu dvoulaločnatého

Jinan je dvoudomý, anemogamní (tj. větrosnubný). Jehnědovité samčí květy mají na tenké stopce prašná pouzdra uspořádaná po dvou. Samičí květy jsou dlouze stopkaté, obvykle se dvěma vajíčky. Semeno je tvořené exotestou na povrchu, pod ní je dužnatá zápachající vrstva – sarkotesta a tvrdá „peckovitá“ sklerotesta, která uzavírá „jádru“. Embryo má dvě dělohy (Musil, 2007). V důsledku příliš malé přírodní populace je jinan zařazen jako ohrožený druh do Červené knihy IUCN (Hoskovec, 2007) (online: <http://www.iucnredlist.org/apps/redlist/details/32353/0>). Dnes se s ním můžeme setkat poměrně hojně v parcích i zahradách, kde se uměle vysazuje. Do Čech byl dovezen a vysazen v roce 1809 v zámeckém parku v Hlubošti, ale bohužel se do dnešní doby nezachoval (Pilát, 1964). V České republice se od roku 1844 eviduje v soupisu dřevin Jiřího Braula – *Ginkgo biloba*

pod tehdy platným názvem *Salisbura adiantifolia*. Najdeme ho v Praze v Královské oboře v areálu bývalého zahradnictví u letohrádku. V roce 1993 byl obvod jeho kmene, měřený ve výšce 130 cm nad zemí, 345 cm. Nejmhutnější exemplář, jehož stáří se odhaduje kolem 170 – 200 let, se nachází v Brně na Mendlově náměstí v areálu Augustiniánského kláštera. Tento exemplář je zároveň považován za jeden z největších stromů tohoto druhu v Evropě (Taraba a kol., 2005). Nejznámějším českým jinanem je *Ginkgo biloba* “*Pragense*” (forma *pendula*), který roste v botanické zahradě Karlovy university v Praze. Kromě této varianty se můžeme setkat s okrasnými formami *fastigiata*, *laciniata*, *variegata* nebo *aurea*, které se liší barvou, stavbou listů a celkovým vzezřením stromu (Pilát, 1964).

2.3.1 Škůdci a choroby

Jinan, dlouhověká dřevina, se vyznačuje výjimečnou rezistencí vůči onemocněním, škůdcům, ohni a znečištěnému prostředí. Této vlastnosti se využívá především ve městech, kde většina stromů není schopna pro zhoršené životní podmínky přežít.

Přestože bylo prokázáno, že někteří zástupci z taxonomických skupin brouků (tesaříkovití) a motýlů (zavíječovití) mohou napadat mladé stromy, plody jinanu, stal se jinan předmětem bádání v boji proti hmyzím škůdcům (mšice bavlníková, mšice broskvoňová, sviluška chmelová, molice). Extrakt z listů se osvědčil jako účinný repelentní a pesticidní přípravek (Lee a kol., 2005).

Poprvé připustili a prokázali napadení jinanu bakteriemi v Sacramentu v Kalifornii. *Pseudomonas syringae* (gramnegativní, aerobní, bičíkatá tyčinka) se projevuje skvrnitostí na listech a nekrotzách na kmeni. Obecně se jedná o velmi závažné onemocnění, které má za následek parciální až totální úhyn stromů.

Zcela ojedinělý je výzkum využití extraktu z jinanu jako ochrany proti viru lidské imunitní nedostatečnosti – HIV-1 (z angl. Human immunodeficiency virus), respektive Tat proteinu kódovaném v HIV-1 (Wei a kol., 2007).

Dosavadní publikované výzkumy ještě nikdy nebyly zaměřeny na možnost jakékoliv virové infekce u jinanu dvoulaločnatého.

2.4 Viry čeledi Rhabdoviridae

2.4.1 Klasifikace

Mezinárodní komise pro taxonomii virů (ICTV – The International Committee on Taxonomy of Viruses, 2011) zařazuje čeleď Rhabdoviridae do řádu Mononegavirales (viz tabulka 1). Řád zahrnuje čtyři čeledě: Bornaviridae, Filoviridae, Paramyxoviridae a Rhabdoviridae (v tabulce zvýrazněna oranžově), které spojují následující znaky: uspořádání genomu, mechanismus genové exprese a morfologie částic (Dietzgen a kol., 2012).

Tabulka 1: Taxonomické rozdělení řádu Mononegavirales (ICTVdb, 2011)

Řád	Čeleď	Podčeleď	Rod	
Mononegavirales	Bornaviridae		Bornavirus	
	Filoviridae		Ebolavirus	
			Marburgvirus	
	Paramyxoviridae	Paramyxovirinae	Aquaparamyxovirus	
			Avulavirus	
			Ferlavirus	
			Henipavirus	
			Morbillivirus	
			Respirovirus	
			Rubulavirus	
			Pneumovirinae	Metapneumovirus
				Pneumovirus
			Rhabdoviridae	
		Ephemerovirus		
		Lyssavirus		
	Novirhabdovirus			
	Nucleorhabdovirus			
	Vesiculovirus			
	Unassigned			

Jak naznačuje tabulka 1 je čeleď Rhabdoviridae rozdělena do šesti rodů. Zástupci rodů Vesiculovirus, Lyssavirus, Ephemerovirus a Novirhabdovirus napadají zejména obratlovce (v tabulce podbarveny zeleně). Zástupci dalších dvou rodů Nucleorhabdovirus a Cytorhabdovirus infikují spíše rostlinné hostitele (v tabulce podbarveny žlutě). Přesto řada zástupců vesiculovirů, nukleorhabdovirů a cytorhabdovirů může zároveň napadat i vektory z kmene Arthropoda (Členovci) (Jackson a kol., 2005).

Následující části popisu čeledi Rhabdoviridae se týkají pouze virů infikujících rostlinné hostitele, tj. z rodu nukleorhabdovirus a cytorhabdovirus. Z dosavadních výsledků elektronové mikroskopie a dat genomových sekvencí bylo zjištěno, že základním rozdílem je umístění procesu maturace a replikace virionu v hostitelské buňce. U cytorhabdovirů probíhá v cytoplazmě, kdežto u nukleorhabdovirů je umístěna do jádra (Žemla a kol., 1998). Význam této vlastnosti nebyl dosud upřesněn (Jackson a kol., 2005).

Celkový počet zástupců obou rodů s vyznačenými prototypovými druhy (zvýrazněny červeně) jsou znázorněny níže v tabulkách 2 a 3.

I přes nejnovější výzkumy existuje více než 75 částečně charakterizovaných rhabdovirů, které zatím nebyly zařazeny do žádného z nich (Jackson a kol., 2005).

Tabulka 2: Seznam zástupců rodu *Cytorhabdovirus* (ICTVdb, 2011)

Rod	Druh
Cytorhabdovirus	<i>Barley yellow striate mosaic virus (BYSMV)</i>
	<i>Broccoli necrotic yellows virus (BNYV)</i>
	<i>Festuca leaf streak virus (FLSV)</i>
	<i>Lettuce necrotic yellows virus (LNYV)</i>
	<i>Lettuce yellow mosaic virus (LYMV)</i>
	<i>Northern cereal mosaic virus (NCMV)</i>
	<i>Sonchus virus (SonV)</i>
	<i>Strawberry crinkle virus (SCV)</i>
	<i>White American striate mosaic virus (WASMV)</i>

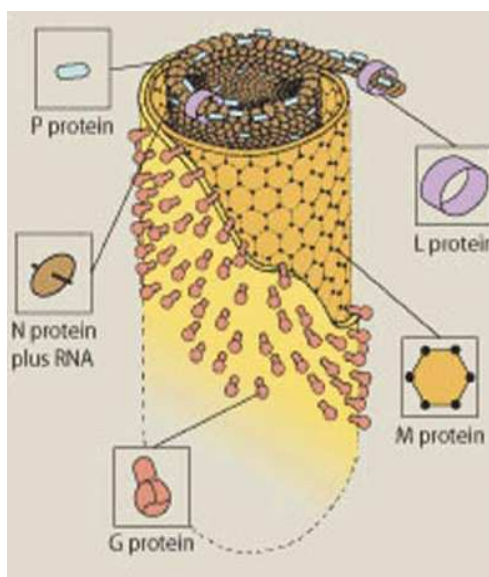
Tabulka 3: Seznam zástupců rodu *Nucleorhabdovirus* (ICTVdb, 2011)

Rod	Druh
Nucleorhabdovirus	<i>Datura yellow vein virus (DYVV)</i>
	<i>Eggplant mottled dwarf virus (EMDV)</i>
	<i>Maize fine streak virus (MFSV)</i>
	<i>Maize Iranian mosaic virus (MIMV)</i>
	<i>Maize mosaic virus (MMV)</i>
	<i>Potato yellow dwarf virus (PYDV)</i>
	<i>Rice yellow stunt virus (RYSV)</i>
	<i>Sonchus yellow net virus (SYNV)</i>
	<i>Sowthistle yellow vein virus (SYVV)</i>
	<i>Taro vein chlorosis virus (TaVCV)</i>

2.4.2 Struktura a organizace virionu

Čeď získala svůj název z řeckého rhabdos – znamenající tyč, hůl. Odvození názvu pochází z baciliformního někdy až kulovitěho tvaru částic s délkou 130 až 350 nanometrů a šířkou 45 až 100 nanometrů, podobně rozměry uvádějí Francki (1985) i Dijkstra (2006).

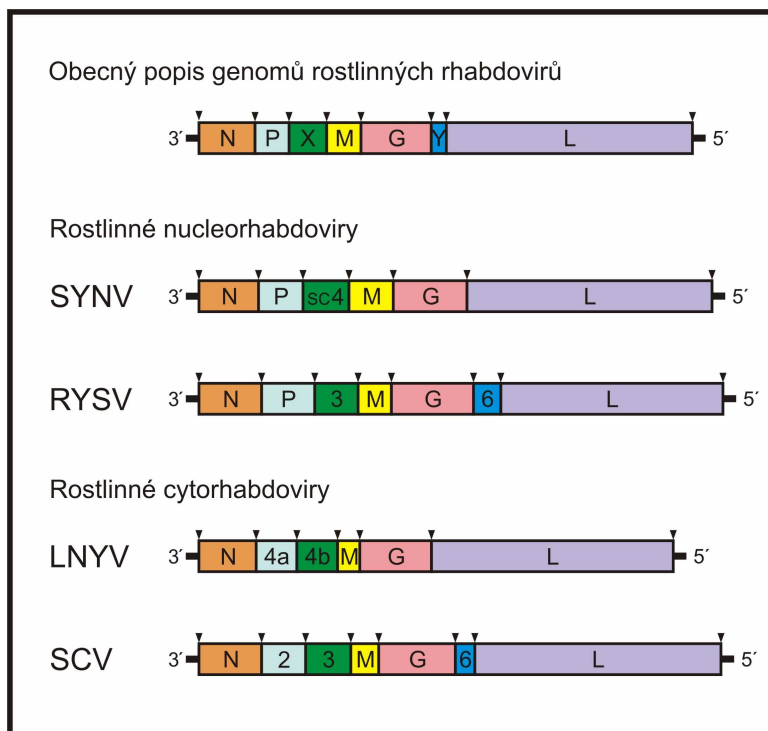
Genom zástupců čeďi Rhabdoviridae tvoří jednořetězcová ribonukleová kyselina s negativní polaritou (–ssRNA). Z obrázku 3 je patrný tvar virové částice, který je tvořen pěti strukturálními proteiny. V těsné blízkosti nukleové kyseliny se nachází bílkoviny N (nucleocapsid protein), P (phosphoprotein) a L (large polymerase protein – RNA polymeráza), které jsou zformovány do helikálně uspořádané ribonukleoproteinové dřeně. Nad ní je vnější obal z lipidové dvojvrstvy a z membránových bílkovin M1 a M2 (matrix protein). Právě bílkoviny M1 a M2 se podílí na spirálovitém uspořádání nukleokapsidu. Na povrchu částice vyčnívají hroty tvořené bílkovinou G (glycoprotein) (Khan, 2006).



Obrázek 3: Architektura virionu (Jackson a kol., 2005)

Kromě těchto pěti strukturálních proteinů byl v genomu všech rostlinných rhabdovirů identifikován ještě šestý protein, který je nezbytný pro pohyb virionu z buňky do buňky. Konkrétně u *Sonchus yellow net virus* byl označen jako tzv. sc4, u ostatních nebyl podobný protein blíže prozkoumán (Dietzgen a kol., 2012).

Genom rostlinných rhabdovirů o délce 11 000 – 14 000 nukleotidů má u osmi kompletně osekvenovaných šest až devět otevřených čtecích rámců (ORF). Ty jsou odděleny krátkými sekvencemi, jakými jsou „mezerníky“, označovanými jako „gene-junction regions“ (Dietzgen a kol., 2012). Pět strukturálních proteinů je v genomu uspořádáno v pořadí genů od 3'-N, P, M, G, L-5' konec (viz obrázek 4). Do pořadí genomu všech rostlinných rhabdovirů obvykle zasahují další jeden až čtyři geny, respektive otevřené čtecí rámce. Ty jsou rozestavené v poloze X mezi ORF kódující proteiny P a M. Kromě dosud nespecifikovaných genů, které jsou dočasně označeny číslicí 3 zde mohou být umístěny i geny, které pravděpodobně kódují nestrukturní proteiny zprostředkávající pohyb virové částice z buňky do buňky. U *Sonchus yellow net virus* kódují již zmíněný sc4 protein. Pouze u *Strawberry crinkle virus* a *Rice yellow stunt virus* jsou do polohy Y, mezi ORF kódující proteiny G a L, umístěny geny určující bílkoviny dosud neznámého významu, dočasně označené číslicí 6. Poslední ORF kóduje L protein, který má funkci RNA-dependentní RNA polymerázy a zároveň je zodpovědný za polyadenylaci a modifikaci virové mRNA čepičkou (Poch a kol., 1990). Tyto kódující oblasti jsou ohraničeny na 3'- a 5'-konci nekódujícími oblastmi, tzn. nejsou na 5'-konci upraveny čepičkou a na 3'-konci polyadenylovány (Jackson a kol., 2005).



Obrázek 4: Schéma uspořádání genomu rostlinných rhabdovirů s vyznačenými „gene-junction“ oblastmi (Jackson a kol., 2005)

SYNV= *Sonchus yellow net virus*; RYSV= *Rice yellow stunt virus*; LNYV= *Lettuce necrotic yellows virus*; SCV= *Strawberry crinkle virus*. N (ORF1): kódující nukleokapsidový protein vázající RNA; P (ORF2): kódující fosfoprotein; X (ORF3): nespecifikované geny nebo geny zprostředkovávající pohyb virové částice z buňky do buňky; M (ORF4): kódující matrix protein; G (ORF5): kódující glykoprotein; Y (ORF6): úsek nedefinovaných genů u různých rostlinných a živočišných rhabdovirů; L (ORF7): kódující RNA polymerázu.

Krátké sekvence mezi ORF jsou rozděleny do tří částí. Úsek I se nachází na 3'-konci každého genu templátu genomu a je tvořen poly U (obecně 3'-AUUNUUU-5'; kde N je G, C, A nebo U). Pořadí bází v úseku I u *Sonchus yellow net virus* (3'-AUUCUUUUU-5') je totožné s analogickými úseky u některých zástupců z řádu Mononegavirales (př. virus eboly, paramyxoviry, Bornaviridae). Úsek II je krátký nepřepisovaný úsek oddělující jednotlivé geny. Úsek III je konzervovaný úsek, který je umístěn k 5'-konci. Ukázalo se, že tyto úseky mezi geny mají významné postavení v replikaci a transkripci mRNA (Jackson a kol., 2005).

Jackson (2005) i Francki (1985) podobně uvádějí chemické složení virových částic: 70 % proteinů, 15 – 25 % lipidů, 1 – 2 % RNA a přibližně 3 % sacharidů. Výsledky výzkumů ukázaly, že složení lipidů je u rhabdovirů rozdílné. Mastné

kyseliny a estery mastných kyselin (steroly) se odvozují během morfogeneze z hostitelských buněk a závisí na specifické membráně. Čtyři steroly u *Sonchus yellow net virus* (Nucleorhabdovirus) se blížily složením sterolů jaderného obalu, kdežto u *Northern cereal mosaic virus* (Cytorhabdovirus) více sterolům na cytoplazmatické membráně.

2.4.3 Hostitelé a vektory rostlinných rhabdovirů

Rhabdovirové infekce jsou známy u celé řady krytosemenných a jednoděložných rostlin v mírném, subtropickém a tropickém klimatickém pásu. Mnohé z nich napadají do značné míry právě zemědělské plodiny (obiloviny, kukuřici, brambory, salát), což v minulosti vedlo k vážným ekonomickým ztrátám. Poznání interakce mezi virem a hostitelským organismem umožňuje charakterizovat nejen obecné, ale i jedinečné principy životních projevů virů. Znalost rozmezí hostitelských organismů má tedy velký význam nejen pro virology, ale například i pro zemědělce, kterým se v důsledku infekce snižují výnosy. Jedná se především o vynaložení úsilí v navozování rezistence vůči infekcím. Výzkumy se zaměřují na hledání rezistentních genů, jakási genová terapie. V případech, kde nebyly identifikovány rezistentní geny, je snaha vyšlechtit rezistentní rostliny (Jackson a kol., 2005).

Jednotliví zástupci rostlinných rhabdovirů vyvolávají v hostitelských rostlinách různé symptomy. Mezi nejčastěji pozorovatelné patří krnění, žloutnutí žilek listů, kropenatost, mozaikovitost až samotná nekróza rostlinných pletiv. Přesto příznaky nemusí být na rostlině vůbec patrné. Na projev symptomů, vývoj onemocnění a nárůst virových částic infikované rostliny může mít vliv stáří rostliny, teplota i intenzita světla (Dietzgen a kol., 2012).

Celá řada rhabdovirů je závislá na přenosu fytopatogenním hmyzem. Jejich geografické rozšíření se objevuje pouze v souvislosti s rozšířením hmyzího vektoru. Ačkoliv u některých rostlinných rhabdovirů zatím nejsou známy jejich vektory, pro většinu je typický způsob přenosu prostřednictvím zástupců hmyzu z čeledi Aphididae (mšicovití, konkrétně podčeď Aphidinae – vlastní mšice, biolib.cz), Cicadellidae (křískovití) nebo Delphacidae (ostruhovníkovití). Konkrétně u všech rhabdovirů napadajících rostliny z čeledi Poaceae (lipnicovité) byl přenos prokázána skrz zástupců mšic nebo zástupců ostruhovníkovitých. Ostatní prokázané rhabdoviry infikují zástupce krytosemenných rostlin, kteří jsou přenášeny pouze mšicemi. Výjimku tvoří nukleorhabdoviry *Potato yellow dwarf virus* a *Eggplant mottled dwarf virus*, jejichž hostitelskou rostlinou jsou druhy z čeledi Solanaceae (lilkovitých), u kterých jsou přenašečem křísy. Vztahy mezi vektory a rhabdoviry jsou vysoce specifické a jsou předmětem neustálého pozorování (Jackson a kol., 2005).

Vzhledem k tomu, že na jinanu nebyly dosud pozorovány žádné příznaky infekčního napadení, nebyl důvod k objevování možných přenašečů.

Výsledky elektronové mikroskopie, sérologické detekce a rodově specifické infekce v tkáni hmyzu poskytly důkazy o možnosti replikace rhabdovirů uvnitř těla jejich vektorů. Během života přenašeče je virus v těle skryt a transovariálně přenášen (Jackson a kol., 2005). To znamená, že virová částice pronikne až do vaječníku (ovarií) samičky vektora, která poté klade rovnou infikovaná vajíčka nebo larvy (nymfy). Latentní doba je různě dlouhá a závisí na teplotě okolního prostředí. Délka života infikovaných vektorů je v porovnání se zdravými přenašeči kratší (Žemla a kol., 1998).

Na rozsah rozšíření má, kromě vektorové specifiky, také vliv potravní strategie vektora. Z výzkumů těchto vztahů vyplývá, že v důsledků změny potravní strategie by mohly některé rhabdoviry napadat i jiné rostlinné hostitele, kteří disponují zcela odlišnými vlastnostmi než jejich přirození hostitele (Jackson a kol., 2005).

Rhabdovirové částice některých zástupců byly nalezeny v hlízách bramboru nebo u zástupců parazitických kokotic. Nicméně mechanický způsob inokulace (přenos z rostliny na rostlinu) nemá v ekologii a epidemiologii těchto patogenů zásadní význam. Přenos semeny ani pylem nebyl doposud popsán (Jackson a kol., 2005).

3 MATERIÁL A METODY

3.1 Rostlinný materiál

Pro identifikaci rhabdovirové infekce byly použity listy ze stromu jinanu dvoulaločného. Vzorke rostlinného materiálu byly náhodně vybrány z různých lokalit České republiky, především parkových dřevin (viz tabulka 4.). Sběr proběhl ve vegetativním období v sezóně roku 2009. Na žádném ze stromů nebyly patrné symptomy virové infekce.

Listy byly po odběru usušeny a vylisovány. Pro potřeby výzkumu byla využita část čepele přibližně o velikosti 1,0 cm².

Rostlinný vzorek 1 pochází z Dolní zahrady zámeckého parku Hluboká nad Vltavou. Jedná se o jediný vzorek samičí rostliny. Přesné stáří stromu není známo. Na základě informací poskytnutých Národním památkovým ústavem se jmenovitě výsadba stromů nezapsala. Nejrozsáhlejší výsadby probíhaly v roce 1851. Dle soupisu divokých a exotických stromů a keřů knížecího zahradníka Rudolfa Wáchy z roku 1854 není jinan uveden. Můžeme se domnívat, že strom mohl být vysazen ve 2. polovině 19. století, jelikož v roce 1856 bylo v hlubocké zámecké zahradě vysazeno 2 264 kusů exotů.

Rostlinný vzorek 2 pochází z areálu Augustiniánského kláštera sv. Tomáše na Starém Brně. Patří mezi nejstarší exempláře na území naší republiky, který zřejmě pamatuje zakladatele genetiky J.G. Mendela (1822 – 1884), jež tam od roku 1843 s přestávkami působil až do své smrti. Je považován za největší jinan ve střední Evropě. Dne 21. 4. 1979 byl vyhlášen památným stromem Radou Národního výboru města Brna.

Rostlinný vzorek 3 pochází z krajinného prvku „Park Háječek a Krumlovské aleje“ z areálu Hvězdárny a Planetária v Českých Budějovicích.

Rostlinný vzorek 4 pochází ze sběru v Lannově loděnici v Českých Budějovicích na levém břehu řeky Vltavy u Dlouhého mostu. V roce 1998 byl orgány ochrany přírody vyhlášen památným stromem. Předpokládány věk je 80 – 100 let.

Rostlinný vzorek 5 pochází ze středočeského zámeckého parku v Radimi.

Rostlinný vzorek 6 pochází ze zámeckého parku Nové Hrady. V roce 1989 byl vyhlášen památným stromem. Předpokládány věk je přibližně 130 let.

Rostlinný vzorek 7 pochází z jihomoravského zámeckého parku ve Višňovém. Park je evidován jako kulturní památka ve smyslu zákona č. 20/ 1987 Sb., o státní památkové péči.

Rostlinný vzorek 8 pochází z hlavního města Prahy z Královské obory (Praha 7 – Bubeneč). Jedná se o samčí exemplář z areálu bývalého zahradnictví při Místodržitelském letohrádku. Dne 7. 3. 1998 byl vyhlášen památným stromem. Odhadované stáří stromu je zhruba 116 let.

Rostlinný vzorek 9 byl nasbírán opět v Dolní zahradě zámeckého parku Hluboká nad Vltavou. V tomto případě jde o samčí exemplář.

Tabulka 4: Lokalizace rostlinných vzorků Ginkgo biloba

Vzorek	Místo odběru	GPS souřadnice
1	Hluboká nad Vltavou	49°03' 01.8" N 14°26' 27.8" E
2	Brno	49°11' 27.3" N 16°35' 39.7" E
3	České Budějovice	48°58' 20.6" N 14°28' 14.2" E
4	České Budějovice	48°58' 45.9" N 14°27' 50.3" E
5	Radim	50°04' 18.3" N 15°00' 37.7" E
6	Nové Hrady	48°47' 25.7" N 14°46' 55.2" E
7	Višňové	48°58' 52.5" N 16°08' 54.8" E
8	Praha 7- Bubeneč	50°06' 16.1" N 14°24' 45.5" E
9	Hluboká nad Vltavou	49°03' 02.7" N 14°26' 25.4" E

Zdroj: Vlastní výzkum

3.2 Metody

3.2.1 Izolace RNA

K izolaci RNA byla použita souprava NucleoSpin RNA Plant (Macherey Nagel, Německo). Provedení izolace bylo po konzultaci provedeno podle doporučeného návodu s drobnými změnami.

1. Homogenizace vzorku:

- Z každého vzorku bylo odebráno přibližně 100,0 mg listového pletiva, které bylo rozdrčeno za pomoci malého množství skleněného prášku v třecí misce.

Homogenát byl přenesen do zkumavky (Ependorf).

2. Lyze buňky

- K homogenátu ve zkumavce bylo přidáno 350,0 μ l RA1 a celé promícháno.

3. Filtrace homogenátu

- Homogenát byl centrifugován po dobu 1 minuty při 11 000 g přes kolonku NucleoSpin filter, která odstředila buněčný materiál.

4. Byla odebrána horní vodná fáze, přidán stejný objem 70% etanolu a promícháno.

5. Zachycení RNA

- Supernatant byl přenesen na kolonku NucleoSpin RNA plant a centrifugován po 30 sekund při 11 000 g.

6. Odsolení membrány

- Membrána byla promyta 350,0 μ l MDB a zbavena solí při centrifugaci po 1 minutu a 11 000g.

7. Odstranění DNA

- Na střed membrány kolonky bylo pipetou aplikováno 95,0 μ l roztoku DNasy a při pokojové teplotě (20 °C – 25 °C) po dobu 15 minut inkubováno.

8. Promývání a sušení silikátové membrány

První promytí:

- Inaktivace rDNasy byla provedena přidáním 200,0 μ l pufru RA2 a centrifugací po 30 sekund při 11 000 g.

Druhé promytí:

- Na kolonku bylo přidáno 600,0 μ l pufru RA3 centrifugováno po 30 sekund při 8 000 g.

Třetí promytí:

- V posledním kroku bylo přidáno 250,0 μ l pufru RA3 a centrifugováno po 2 minuty při 11 000 g.

9. Extrakce RNA

- Do zkumavky byla RNA z membrány extrahována do 35,0 μ l H₂O centrifugací po 1 minutu a 11 000 g.

3.2.2 Reverzní transkripce: RT-PCR

Pro přípravu cDNA byla použita souprava „iScript cDNA Synthesis Kit“ (Bio-Rad, USA). Sada obsahuje reverzní transkriptázu Rnase H⁺.

Reakční směs:

Izolovaná RNA	7,5 μ l
5x iScript reakční směsi	2,0 μ l
iScript reverzní transkriptáza – Rnase H ⁺	0,5 μ l
<hr/>	
Celkem	10,0 μ l

Průběh reakce:

25 °C/ 5 minut + 45 °C/ 45 minut + zastavení transkripce zahřátím na 95 °C/ 5 minut.

3.2.3 Návrh univerzálních primerů pro polymerázovou řetězovou reakci (PCR)

Tabulka 5: Přehled použitých primerů (Petrzik, nepublikované údaje)

Primer	Sekvence 5'- 3'
HRI	AYAGRATHHTGGGGICAYCC
RKD	ATCTTTCTCATGTGTCCGTTCC
DF	GAYTTYGARAARTGGAAYGG
LV	GAGIACYTGRTTRTCICC

Y = Cytosin nebo Thymin, R = Adenin nebo Guanin, H = Adenin nebo Cytosin nebo Thymin,
I = Inosin.

3.2.4 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Byly použity navržené primery, DreamTaq™ DNA polymeráza (Fermentas, Litva), dNTP, pufr.

Amplifikační schéma:

Dream taq pufr	2,0 µl
dNTP	0,5 µl
cDNA	2,0 µl
Taq polymeráza	0,5 µl
primery:	
pro vzorky 1-6 použity- HRI + RKD	0,5 µl + 0,5 µl
pro vzorky 7-10 použity- DF + LV	0,5 µl + 0,5 µl
H ₂ O	14,0 µl
Celkem:	20,0 µl

Průběh reakce:

95 °C/ 2 minuty + 40krát (95 °C/ 30 sekund + 50 °C/ 30 sekund + 72 °C/ 30 sekund) + 72 °C/ 10 minut.

3.2.5 Elektroforetické vyhodnocení reakce

Produkty PCR byly analyzovány horizontální gelovou elektroforézou v 1% agarózovém gelu připraveném v 0,5x TBE pufru, který byl po zchlazení nalit do nalévací vany s vhodným hřebínkem. Po ztuhnutí gelu bylo 4,0 µl vzorku aplikováno do jamek a obarveno fluorescenčním barvivem SybrGreen (Abiosystem). Jako marker byl použit FastRuler™ DNA ladder (ThermoScientific) v množství 1,3 µl.

Doba trvání elektroforézy byla při napětí 100 V cca 20 minut. Vizualizace proběhla pod UV lampou.

3.2.6 Extrakce DNA z gelu

Pro extrakci DNA z agarózového gelu byl použit kit NucleoSpin Extrakt II (Macherey Nagel, Německo) podle návodu výrobce.

Proužek DNA o správné velikosti byl z gelu vyřezán a rozpuštěn v činidle NT zahřátím na 55 °C. Roztok byl nanesen na izolační kolonku a centrifugován 1 minutu při 11 000 g. Kolonka byla dvakrát promyta 70% etanolem a vysušena centrifugací. DNA byla z kolonky extrahována 35,0 µl sterilní vody. Vyčištěná část DNA byla označena a uložena při teplotě -20 °C.

Úspěšnost extrakce byla zkontrolována elektroforézou 2,0 µl DNA.

3.2.7 Sekvenování DNA a analýza sekvencí

Pro sekvenování byla použita extrahovaná DNA, primer DF identický s primerem použitým pro amplifikaci a BigDye Terminátor cycle sequencing kit (Applied Biosystems, USA). Analýza byla provedena na kapilárním sekvenátoru ABI Prism 310 sequencer (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Sekvenční data byla kontrolována a upravována v programu FinchTV v.1.4.0. a analyzována v programu MEGA5 (Tamura a kol., 2011).

3.3 Seznam použitých zkratek

DNA – deoxyribonucleic acid (deoxyribonukleová kyselina)

RNA – ribonucleic acid (ribonukleová kyselina)

mRNA – messenger RNA (mediátorová RNA)

IUCN – International Union for Conservation of Nature (Mezinárodní svaz
ochrany přírody)

MDB – membrane desalting buffer

cDNA – complementary DNA (komplementární DNA)

dNTP- deoxyribonucleotide triphosphate (deoxyribonukleosidtrifosfát)

TBE – pufr Tris-borát- EDTA

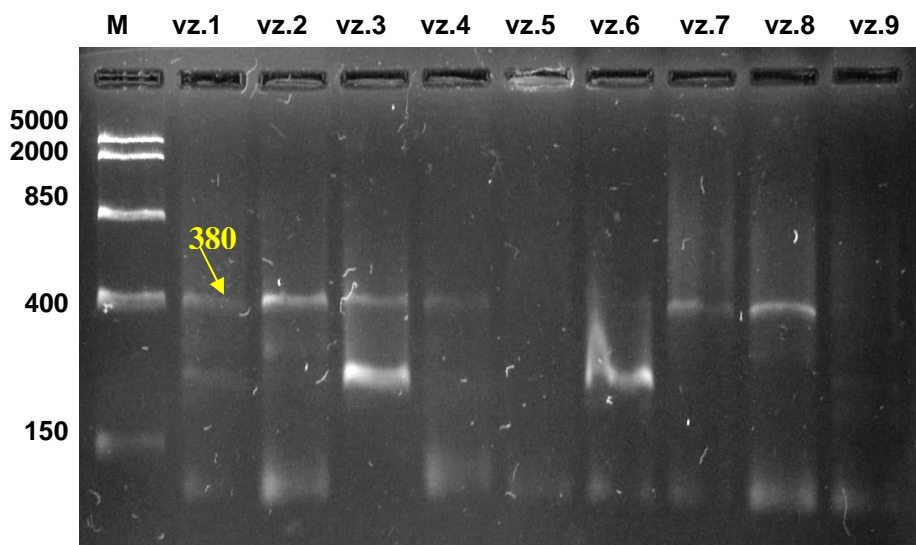
pb – base pair(s) (párů bází)

4 VÝSLEDKY

Z náhodně vybraných deseti vzorků rostlinného materiálu, který nevykazoval žádné symptomy napadení, byla pomocí molekulárních metod zkoumána přítomnost rhabdovirové infekce. Rostlinné vzorky pocházely z různých parků v České republice. Byly sbírány celé svazečky listů vyrůstajících z brachyblastů a usušeny. Ze vzorků byla vyizolována RNA pomocí NucleoSpin RNA Plant (Macherey Nagel, Německo). Z RNA byla připravena pomocí reverzní transkripce cDNA. Úsek na DNA byl ohraničen specifickými primery a poté amplifikován polymerázovou řetězovou reakcí (PCR).

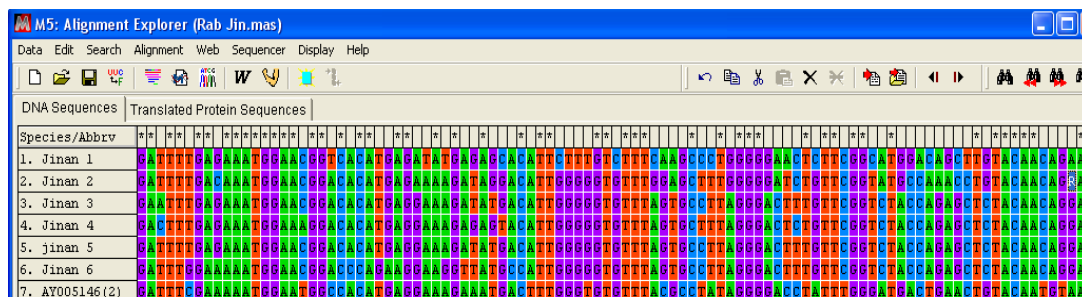
Vzhledem k vysoké diverzitě rhabdovirů nemohly být použity žádné již publikované primery pro detekci lidských nebo hmyzích rhabdovirů (Petrzik, 2010). Dle prokázaných podobností v katalytických oblastech I až V RNA polymeráz L genu u rhabdovirů a paramyxovirů (Poch a kol, 1990) byly navrženy specifické primery pro detekci rostlinných rhabdovirů. Pro vzorky byly k detekci použity specifické primery DF (5'-GAYTTYGARAARTGGAAAYGG-3') a LV (5'-GAGIACYTGRTTRTCICC-3') zachycující dosud všechny známé viry rodů Nucleorhabdovirus a Cytorhabdovirus (Petrzik, nepublikované údaje).

Ke kontrole výsledných produktů byla použita agarózová gelová elektroforéza. Pomocí procesu PCR se podařilo u vzorků 1 – 6 amplifikovat produkt o velikosti 380 bp, který odpovídal očekávané velikosti (viz obrázek 5).



Obrázek 5: Výsledek PCR amplifikace 9- ti vzorků primery DF + LV zviditelněný elektroforézou na agarózovém gelu (Petrzik, 2010). M- marker (FastRuler™ DNA ladder (ThermoScientific)). Očekávaný produkt o velikosti 380 pb se nevytvořil u vzorků nanesených do startů 5, 6 a 9. Produkty o menší velikosti představují nespecifické produkty nebo nepotřebené primery. Velikost proužků v pb.

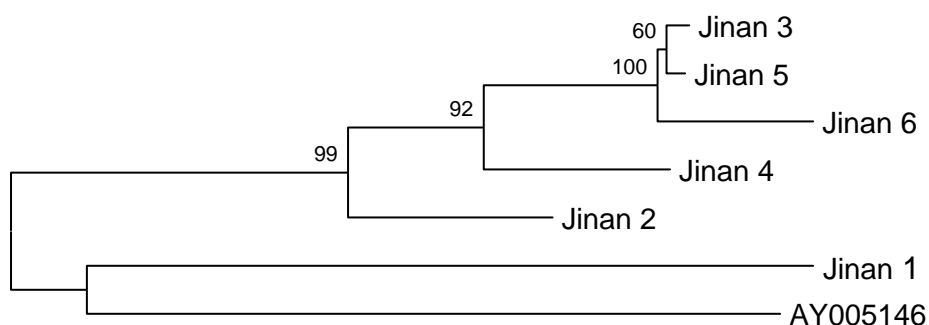
Úseky DNA o správné velikosti byly z gelu extrahovány pomocí kitu NucleoSpin Extrakt II (Macherey Nagel, Německo) a znovu zkontrolovány prostřednictvím elektroforézy. Produkty jsme sekvenovali primerem DF, který byl použit při amplifikaci. Výsledné sekvence byly porovnány se sekvencemi v GenBank. Získané nukleotidové sekvence odpovídaly části genu L RNA polymerázy *Strawberry crinkle viru* (viz obrázek 6).



Obrázek 6.: Ukázka porovnání získaných nukleotidových sekvencí části genu L s referenční sekvencí *Strawberry crinkle viru* (AY005146(2)).

A= adenin, T= tymín, C= cytosin, G= guanin.

Z takto získaných dat nukleotidových sekvencí byl pomocí programu MEGA5 vypočten pravděpodobný fylogenetický strom, který znázorňuje příbuzenské vztahy metodou nejbližšího souseda (Neighbor-Joining) (viz obrázek 7). Jako reference byla použita sekvence Strawberry crinkle cytorhabdoviru (v obrázku 7 vyznačena jako AY005146 dle čísla v GenBank). Spolehlivost větvení byla testována na 100 opakováních dle metodiky (Felsenstein,1985).



Obrázek 7: Dendrogram znázorňující příbuzenské vztahy vypočtené metodou nejbližšího souseda (Neighbor-Joining) v programu MEGA5 dle získaných nukleotidových sekvencí.

AY005146= *Strawberry crinkle virus*.

Z analýzy vyplývá, že nukleotidové sekvence jednotlivých izolátů nejsou identické, vzájemná homologie je znázorněna v tabulce 7. Je patrné, že vytvářejí dvě od sebe oddělené skupiny. Jedna zahrnuje izoláty: 2, 3, 4, 5, 6, jejichž vzájemná podobnost je 84 – 99 %. Přitom identita izolátů 3, 5 a 6 je v rozmezí 88 – 89 % a tvoří kompaktnější skupinu. Izoláty 4 a 2 se od této skupinky odlišují a mohou představovat odlišné viry. Unikátní je zařazení vzorku Jinanu 1, jehož sekvenční podobnost s ostatními izoláty je jen v rozmezí 50 – 67 %. S velkou pravděpodobností se jedná o nový virus, než jaký byl zjištěn u ostatních izolátů.

Tabulka 7: Vzájemná podobnosti nukleotidových sekvencí mezi vzorky a referenční sekvencí uvedené v procentech (%).

	Jinan 1	Jinan 2	Jinan 3	Jinan 4	Jinan 5	Jinan 6
Jinan 1						
Jinan 2	67, 5					
Jinan 3	56, 5	87, 6				
Jinan 4	60, 7	89, 1	92, 0			
Jinan 5	56, 7	87, 6	99, 2	91, 6		
Jinan 6	50, 8	84, 3	96, 2	88, 0	96, 2	
AY005146	60, 4	61, 0	62, 0	58, 7	63, 5	58, 5

5 ZÁVĚR A DISKUSE

Cílem práce bylo zjistit, zda je možné v jinanu dvoulaločném detekovat rostlinné rhabdoviry, o kterých jsou jen sporadické informace. Zcela náhodně vybrané rostlinné vzorky stromů jinanu byly zdánlivě zdravé a nevykazovaly žádné projevy infekčního napadení. Pomocí molekulárních metod a detekčních primerů zaměřených na oblast L genu genomu rhabdovirů se podařil unikátní objev. Rhabdovirová infekce byla prokázána u šesti odebraných vzorků rostlinného materiálu. Porovnáním nukleotidové a aminokyselinové sekvence byla potvrzena přítomnost viru(ů) rodu Rhabdovirus. Všechny sekvence byly podobné rostlinnému *Strawberry crinkle viru*, který je řazen mezi Cytorhabdoviry. Jeden vzorek se významně odlišoval od ostatních a představuje s velkou pravděpodobností jiný virus. Ve vzorcích tak byla poprvé prokázána přítomnost hned dvou dosud neznámých virů. Pro jejich definitivní zařazení bude potřeba zjistit delší úsek genomu a zjistit alespoň některé biologické vlastnosti (velikost částic, lokalizaci v buňce, symptomy na laboratorních hostitelích apod.). Vzhledem k tomu, že jinan je dlouhověká dřevina, může být významným infekčním zdrojem po mnoho let.

5.1 Didaktické využití práce v pedagogické praxi

Didaktika, slovo řeckého původu *didáskein*, může znamenat více významů: vyučovat, poučovat, učit, ale také i být vyučován, poučován, učen. V pedagogické terminologii didaktika označuje teorii vyučování a učení (Průcha, 2009).

Poznatky o těchto, pouhým okem, neviditelných biologických systémech mohou být v pedagogické praxi využity v rámci výkladových hodin. Většinou jsou žákům a studentům představovány jako něco nebezpečného, způsobujícího různá onemocnění (chřipka, opary, neštovice aj.) a to zejména u člověka. Méně už si představí onemocnění u taxonomicky nižších živočichů (ryby, ptáci, hmyz), nebo u rostlin. Fotografie napadených organismů by, v rámci projekce při výkladové metodě, mohly sloužit pro dokreslení představ o možných hostitelích a jejich infekčních projevech. Obvykle jsou tato témata v učebnicích zakončována způsoby, jakými lze proti virům bojovat. Domnívám se, že bychom studentům měli předkládat úplné informace a vzhledem k pokrokům ve virologii jim vysvětlit i kladný přínos.

Studentům bychom zároveň mohli, v rámci výchovy ke zdravý, vysvětlit, že i na první pohled zdravý organismus může být infikován. Takovýto organismus pak uniká naší pozornosti a infekce se může šířit dál, dokladem je právě tato práce.

Při popisu listu jinanu jako jediné listnaté nahosemenné dřeviny by mohly být využity uvedené fotografie, případně poskytnut surový vzorek, který by si studenti mohli sami prohlédnout a osahat. V tomto případě bychom mohli připravit i laboratorní praktikum k ověření, zda jinan skutečně patří mezi nahosemenné rostliny.

Použité metody přesahují možnosti využití v pedagogické praxi. Nicméně mnou nabyté zkušenosti z práce v laboratoři, i práce s odbornou cizojazyčnou literaturou, bych mohla studentům předat a využít je k formování a rozvoji jejich klíčových kompetencí.

Svou prací bych chtěla nejen středoškolské studenty, ale i ostatní studenty vysokých škol motivovat k neustálému rozšiřování svých vědomostí a dovedností.

6 SEZNAM LITERATURY

BARTOŠ J., 1968: Ochrana rostlin. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 598 s.

BOS L., 1999: Plant viruses, unique and intriguing pathogens- a textbook of plant virology. Leiden: Backhuys Publishers, 358 s.

DIETZGEN R. G., CALISHER C. H., KURATH G., KUZMIN I. V., RODRIGUEZ L. L., STONE D. M., TESH R. B., TORDO N., WALKER P. J., WETZEL T., WHITFIELD A. E., 2012: Rhabdoviridae. In: C.M. Fauquet, M.A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger, L.A. Ball (eds) Virus taxonomy, Classification and nomenclature of viruses, ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, Amsterdam, str. 686 – 713.

ČEŘOVSKÁ N., 2010: Biochemická a molekulárně biologická charakterizace rostlinných virů a jejich biotechnologické využití. Habilitační práce, Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, 34 s. [cit. 19.10.2010]
Dostupné z: http://oldwww.upol.cz/fileadmin/user_upload/PrF-dokumenty/Vedecka_rada/Habilitace_a_profesury/ukon_hab_prof/Cerovska_Noemi/Habilitacni_prace_NCerovska-cast1.pdf

FELSENSTEIN J., 1985: Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783 – 791s.

HOSKOVEC L., 2007: GINKGO BILOBA L.- jinan dvoulaločný. [cit. 6.12.2010]
Dostupné z: <http://botany.cz/cs/ginkgo-biloba/>

HULL R., FELLOW E., 2009: Comparative plant virology. Norwich: Elsevier Academic Press, 400 s.

International Committee on Taxonomy of viruses, ICTV.

Dostupné z: [ww.ictvdb.org](http://www.ictvdb.org)

JACKSON A.O., DIETZGEN R.G., GOODIN M.M., BRAGG J.N., DENG M., (2005): Biology of plant rhabdoviruses. Annual Review of Phytopathology. Volume 43: s. 623 – 660.

JINDRÁČEK M., 2008: jinan dvoulaločný Ginkgo biloba L. [cit. 30.11.2010]
Dostupné z: <http://www.biolib.cz/cz/taxon/id2305/>

KHAN J. A., DIJKSTRA J., 2006: Handbook of plant virology. New York: Food Products Press, 452 s.

KOBLÍŽEK J., 2006: Jehličnaté a listnaté dřeviny našich zahrad a parků. Brno: Sursum, 178 s.

KWANT C., 1999 – 2012: The ginkgo pages. [cit. 6.12.2010]
Dostupné z: <http://kwanten.home.xs4all.nl/index.htm>

MATTHEWS R.E.F., 1991: Plant virology. London: Academic Press, 835 s.

MUSIL I., HAMRNÍK J., 2007: Jehličnaté dřeviny: přehled nahosemenných i výtrusných dřevin: Lesnická dendrologie 1. Praha: Academia, 352 s.

NAVRÁTIL M., 2011: Základy virologie. Skripta PřF UP Olomouc. [cit. 2.10.2010]
Dostupné z: <http://genetika.upol.cz>

NAVRÁTILOVÁ M., 2012: Prostředky biologické ochrany a jejich uplatnění v systému integrované ochrany. Rostlinolékař, 1, str. 27 – 30.

PETRZIK K., 1999: Molekulární biologie a biotechnologie rostlinných virů. České Budějovice: Ústav molekulární biologie rostlin AV ČR, skripta, 96s.

PETRZIK K., 2010: Molecular detection of rhabdoviruses in new hosts. International Advances in Plant Virology, Arnhem, the Netherlands, nestránkováno

PILÁT A., 1964: Jehličnaté stromy a keře našich zahrad a parků. Praha: Nakladatelství Československé akademie věd, 507 s.

PRŮCHA J., WALTEROVÁ E., MAREŠ J., 2009: Pedagogický slovník. Praha: Portál, 395 s.

POCH O., BLUMBERG B. M., BOUGUELERET L., TORDO N., 1990: Sequence comparison of five polymerases (L proteins) of unsegmented negative-strand RNA viruses: theoretical assignment of functional domains. *Journal of General Virology* 71: str. 1153 – 1162.

ŠPANILOVÁ H., 2000: Klasifikace a taxonomie virů. *Živa*, 6, str. 245 – 248.

TARABA R., NAVRÁTILOVÁ M., 2005: Památné stromy města Brna, Brno: Odbor životního prostředí Magistrátu města Brna. [cit. 30.10.2011] Dostupné z: <http://oko.brno.cz/download/ozp/stromy.pdf>

TÁBOR I., REŠ B., SOUČKOVÁ M., 2005: Záchrana genofondu památných stromů v hlavním městě Praze a ve středočeském kraji. *Acta Průhoniciana*, Průhonice, 78, str. 7, 12, 13. [cit. 8.2.2012] Dostupné z: <http://www.mzp.cz/ris/ekodisk-new.nsf>

TAMURA K., PETERSON D., PETERSON N., STECHER G., NEI M., KUMAR S., 2011: MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28, str. 2731 – 2739.

WEI Z., KIM B.O., ZHOU B.Y., LIU Y., 2007: Protection against Human Immunodeficiency Virus type 1 Tat neurotoxicity by Ginkgo biloba extract EGb 761 involving glial fibrillary acidic protein. *The American journal of pathology*, volume 171, issue. 6, str. 1923 – 1935. [cit. 24.10.2011] Dostupné z: [http://www.journals.elsevierhealth.com/periodicals/ajpa/article/S0002-9440\(10\)62453-4/fulltext](http://www.journals.elsevierhealth.com/periodicals/ajpa/article/S0002-9440(10)62453-4/fulltext)

ŽEMLA J., ČIAMPOR F., LABUDA M., 1998: Špeciálna virológia. Bratislava: Slovak academic press, 226 s.

Státní rostlinolékařská správa [cit. 14.9.2011] Dostupné z: www.srs.cz