



Středoškolská technika 2011

Setkání a prezentace prací středoškolských studentů na ČVUT

ROSTLINNÉ VIRY, CHARAKTERIZACE X VIRU BRAMBORU

Terezie Svobodová

Mensa gymnázium, o.p.s. Praha 6 - Řepy Španielova 1111/19

Anotace

Tato práce si dává za úkol shrnout základní poznatky o životním cyklu a metodách detekce rostlinných virů. Práce se zaměřuje na X-virus bramboru (PVX) jako zástupce rostlinných virů a zkoumá jeho reakce s některými vybranými rostlinnými hostiteli. Práce se také zabývá využitím rostlinných virů pro biotechnologické účely a obraně rostlin proti virovým chorobám.

Klíčová slova

Rostlinné viry; metody detekce; X-virus bramboru

Anotation

The aim of present work is to gather basic knowledge about life cycle and methods of detection of plant viruses. The work has been focused at potato X-virus (PVX) as a representant of plant viruses and it has studied its reaction with some elected plant hosts. The work presents also use of plant viruses for biotechnological aims and the defense of plants against viruses deseases.

Key words

Plant viruses; methods of detection; potato X-virus

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně a všechny použité prameny, které jsou citovány, jsou uvedeny v seznamu citovaných prací. Postup při zpracování a dalším nakládání s prací je v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) v platném znění.

V Praze dne:Podpis:

Poděkování

Děkuji Tomáši Kočímu za podnětné připomínky při vedení práce. Noemi Čerovské a Heleně Plchové děkuji za hodnotné rady a obětavou pomoc a Renatě Hadámkové za vedení v laboratořích Ústavu experimentální botaniky AV ČR.

Obsah

1.	ÚVOD.....	7
2.	CHARAKTERISTIKA ROSTLINNÝCH VIRŮ.....	8
2.1.	ZAŘAZENÍ ROSTLINNÝCH VIRŮ.....	8
2.2.	STRUKTURA VIRIONU FYTOVIRŮ.....	9
2.3.	VIROIDY, SATELITY.....	13
3.	EXPRESE VIRIONŮ.....	14
3.1.	ROZMNOŽOVÁNÍ.....	14
3.2.	ŠÍŘENÍ VIRŮ Z BUŇKY DO BUŇKY.....	16
3.3.	MUTACE VIRŮ.....	16
4.	ROSTLINNÝ VIRUS JAKO PATOGEN.....	18
4.1.	PŘENOS VIROVÝCH CHOROB.....	18
4.2.	INFEKCE A PŘÍZNAKY.....	19
4.3.	OBRANA ROSTLIN PROTI VIRŮM.....	22
4.4.	REZISTENCE NAVOZENÁ PATOGENY.....	23
4.5.	OZDRAVOVÁNÍ.....	23
5.	BIOTECHNOLOGICKÉ VYUŽITÍ ROSTLINNÝCH VIRŮ.....	25
5.1.	GENOM VIRU JAKO EXPRESNÍ VEKTOR.....	25
5.6.	NAVOZENÍ REZISTENCE PROTI VIRŮM.....	27
6.	PVX – X VIRUS BRAMBORU.....	29
7.	CÍL.....	31
7.1.	ČÁST PRVNÍ: INFIKACE ROSTLIN VIREM PVX.....	31
7.2.	ČÁST DRUHÁ: PURIFIKACE PVX.....	31
7.3.	ČÁST TŘETÍ: PCR.....	31
8.	MATERIÁLY.....	32
8.1.	CHEMIKÁLIE.....	32
8.2.	LABORATORNÍ VYBAVENÍ.....	33
8.3.	ROSTLINNÝ MATERIÁL.....	34
9.	METODY.....	35
9.1.	PĚSTOVÁNÍ HOSTITELSKÝCH ROSTLIN.....	35
9.2.	OČKOVÁNÍ ROSTLIN A INFIKACE VIREM.....	35
9.3.	ELISA (ENZYMOVÁ IMUNOANALÝZA).....	36
9.4.	PURIFIKACE PVX.....	39

9.5.	REVERZNÍ ZPĚTNÁ TRANSKRIPCE (RT).....	40
9.6.	POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE (PCR).....	41
9.7.	GELOVÁ ELEKTROFORÉZA.....	43
10.	VÝSLEDKY.....	44
10.1.	ČÁST PRVNÍ: INFIKACE ROSTLIN VIREM PVX.....	44
10.2.	ČÁST DRUHÁ: PURIFIKACE PVX.....	46
10.3.	ČÁST TŘETÍ: PCR.....	48
11.	ZÁVĚR.....	49
12.	POUŽITÉ ZKRATKY.....	51
13.	SEZNAM CITOVANÝCH PRACÍ.....	52

1. Úvod

Rostlinné viry jsou významnými patogeny v oblasti zemědělství. Některé stabilní druhy virů nebo směsná infekce dvou virů dokáží způsobit velké ztráty na úrodě. Výzkum virů nám dovoluje zefektivnit zemědělskou výrobu. Díky vědomostem o virech víme, jak preventivně postupovat ještě před vysazením rostlin. Víme, které druhy rostlin jsou odolnější vůči infekcím, a též známe různé strategie, které rostliny proti virovým infekcím uměle chrání. To může mít velký přínos zvláště v rozvojových zemích, kde je každá neúroda tragédií.

Další přínos rostlinných virů je bezpochyby ve zdravotnictví. Tyto organismy jsou používány jako expresní vektory při přípravě různých biologických látek – často antigenů závažných lidských chorob.

Mimoto nám výzkum virů, jakožto výzkum jednoduchých nitrobuněčných parazitů, pomáhá lépe pochopit základní funkce buněčného aparátu.

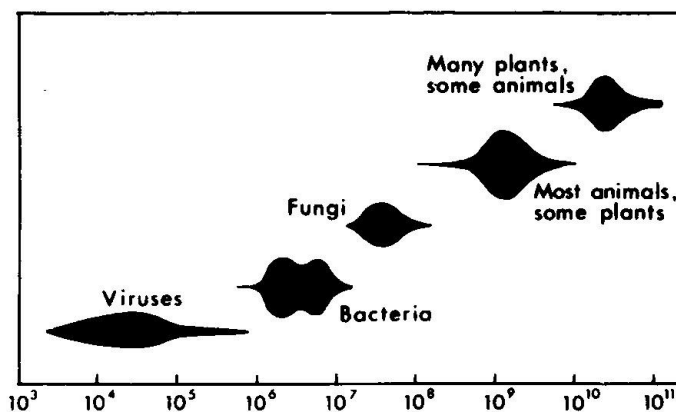
Ve své práci se pokusím shrnout základní poznatky o rostlinných virech. Budu se věnovat jejich morfologii a jejich rozmnožování. Uvedu, jaké choroby dokážou viry způsobit a jak se proti infekci rostliny brání. Představím některé metody, které vědci vyvinuli na obranu rostlin. Pokusím se ukázat, jaké je možné využití rostlinných virů. Následně se zaměřím na X virus bramboru. S tímto virem budu dále pracovat v praktické části, ve které představím některé základní metody práce s virem. Pokusím se zjistit, jaký druh infekce a o jaké intenzitě se vyvinul u vybraných pokusných rostlin. Také zjistím do jaké koncentrace se PVX v nejnáchylnějším druhu z vybraných rostlin namnožil.

Laboratorní práce jsem uskutečnila pod dohledem pracovníků v Ústavu experimentální botaniky AV ČR.

2. Charakteristika rostlinných virů

2.1. Zařazení rostlinných virů

Viry jsou jednoduché nebuněčné organismy, které můžeme označit jako částice. Jsou složeny zejména z nukleové kyseliny a proteinů, ale mohou obsahovat i anorganické složky. Velikost jejich nukleové kyseliny se pohybuje od 10^3 až 10^6 nukleotidů (nebo párů nukleotidů), a to je vůbec nejmenší velikost mezi všemi živými soustavami. Toto rozmezí se částečně překrývá s rozmezím velikosti genomu bakterií. Většina virů má ale délku nukleové kyseliny od 10^4 do 10^5 nukleotidů, což nemá žádná bakterie. Jednoduchý způsob života virů je založen na vnitrobuněčném parazitismu. Z atributů pro klasifikaci živých organismů splňují viry mimo buňku hostitele pouze přítomnost makromolekul biopolymerů. Nejsou schopné vlastního metabolismu, dráždivosti ani autoreprodukce. Pokud ovšem vstoupí do buňky, jsou jim jejím prostřednictvím propůjčeny prostředky k rozmnožování a vir získává schopnost dědičného předávání znaků i schopnost vývoje a evoluce [9,3]. Evoluce může u virů probíhat pouze díky mutacím a rekombinacím [8]. Z těchto důvodů, řadí mnoho odborníků viry na rozmezí živé a neživé přírody.



Obr. 1 (Hinegardner, 1976 in Matthews)

Obr.1 Počet nukleotidů nebo párů nukleotidů jednotlivých skupin živých soustav. Dole: počet nukleotidů, zleva doprava: viry, bakterie, houby, většina živočichů a některé rostliny, mnoho rostlin a někteří živočichové.

Viry nám mohou připadat podobné dalším dvou skupinám. První z nich jsou vnitrobuněční bakteriální parazité (např. chlamýdie), které jsou virům podobné jak velikostí svého genomu, svou velikostí, tak i způsobem života. Zásadní rozdíl mezi nimi

je však ten, že virům chybí schopnost vlastní syntézy proteinů. Druhou skupinou jsou transpozony – genetické mobilní elementy. Do skupiny genetických mobilních elementů můžeme zařadit například plazmidy. Podobně jako viry nejsou schopné vlastního metabolismu ani autoreprodukce. Viry jsou ale schopné samostatně opustit buňky a šířit se, mají složitě organizovaný genom se specifickými virovými funkcemi a běžně fyzicky chrání své genetické informace, což mobilní genetické elementy nedokážou [6]. Částice, které později dostaly název rostlinné viry (fytoviry), byly objeveny při pokusech, které měly objasnit pohyb mízy v rostlinách. Již dříve se jich však nechtěně využívalo v pěstitelství. Tulipány, jejichž květy trpěly mozaikovitostí a proužkovitostí způsobenou viry, byly pokládány za okrasné [6].

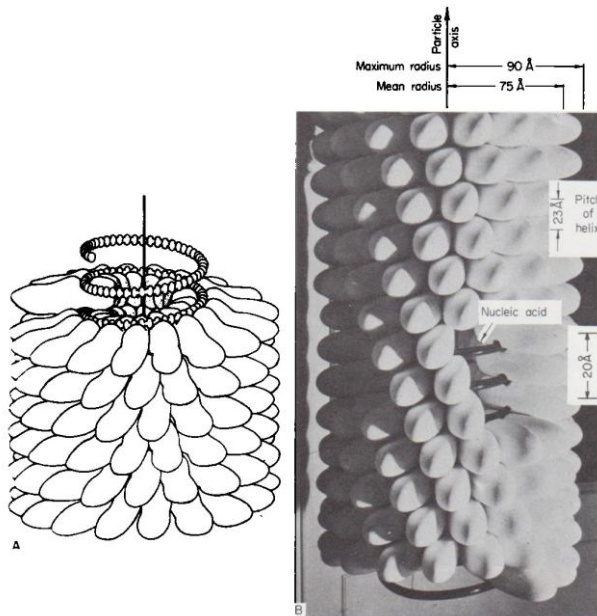
Vlastnosti, kterými se od sebe liší rostlinné viry, viry živočišné a viry bakteriální, jsou závislé na vlastnostech jejich hostitelů. Fytoviry jsou takové viry, které jsou schopny infikovat rostlinné buňky. Ty jsou chráněny buněčnou stěnou a na rozdíl od buněk živočišných nemají receptory, přes které by mohly viry aktivně pronikat do buňky. Rostlinné viry pronikají do buněk přes poranění a poškození buněčné stěny [2]. Nepotřebují proto žádné proteiny rozeznávající specificky buněčnou stěnu [6]. Zatímco u bakteriálních virů vstupuje do buňky pouze nukleová kyselina a obal zůstává vně, u virů rostlinných přes volný vstup poraněním vstupuje celý virus, který je později rozvolněn specifickými bílkovinami. (Výjimkou je čeleď *Phycodnaviridae*.) Z mechanismu šíření, kdy rostlinné viry neopouštějí buňku přes plazmatickou membránu, vyplývá i fakt, že rostlinné viry postrádají membránový obal, který je typický pro viry živočišné. Další rozdíly jsou také ve složitosti kapsidu, v čemž vynikají viry bakteriální. Konkrétnější odlišnosti hledejme spíše mezi jednotlivými druhy [11].

2.2. Struktura virionu fytovirů

Jak již bylo naznačeno, virion je složen z kapsidového bílkovinného obalu a z nukleové kyseliny. Podle chemického složení nukleové kyseliny dělíme viry na DNA viry a RNA viry. Ve skupině rostlinných virů početně převažují RNA viry. DNA i RNA viry mohou být jednořetězcové pozitivní, jednořetězcové negativní nebo dvouřetězcové [9, 3]. RNA může být segmentovaná do více úseků. Dle tvaru mohou být cirkulativní (kruhové) nebo lineární. To má vliv na celkový tvar virionu. Zatímco bílkovinný obal slouží jako ochrana, nukleová kyselina kóduje všechny proteiny a enzymy potřebné k expresi viru a ke kompletnímu sestavení virionu. Nukleová kyselina je kompletní genom viru.

Velikost genomu se pohybuje od několika set nukleotidů až po půlmegabasi nukleotidů, na čemž je závislý i počet genů [2,10]. Rostlinné viry jsou schopné kódovat 1-12 proteinů [6]. Podobně jako u každého genoforu fungují některé nukleotidové sekvence jako strukturní geny (*cistronické*) kódující specifické proteiny. Jiné úseky fungují jako regulační oblasti-promotory, které jsou předpokladem pro regulaci (řízení a prosazování) transkripce strukturních genů. Sekvence jsou logicky sestaveny tak, že jejich postupným zapínáním od začátku do konce se v čase vytvářejí genové produkty účelně takovým způsobem, aby byla zajištěna reprodukce viru v buňce. Na začátku čtení jsou tedy geny pro časné proteiny, ke konci pro pozdní proteiny [8].

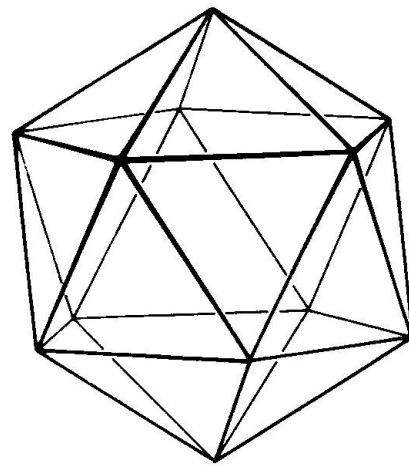
Kapsidový obal (coat protein – CP) je tvořen identickými pravidelně uspořádanými podjednotkami. Tyto makromolekuly se nazývají kapsomery. Kvartérní struktura, která určuje vnější podobu viru, je kapsomerami sestavována autoorganizačním procesem pouze na základě fyzikálních zákonů. Dochází přitom i k vyřazení konstrukčně chybné nebo nepřesné kapsomery. Není k tomu potřeba pomocných proteinů. Ke vzniku celého kapsidového obalu je tedy potřeba pouze jednoho genu kódujícího CP. Kapsidový protein může být multifunkční a podílet se například na pohybu viru z buňky do buňky. Existující typy kapsomer dovolují pouze dva základní, obecné strukturální typy virionů. Prvním z nich je tvar kulovitý, nebo přesněji mnohostěnný. Ten má nejčastěji ikozahedrickou symetrii. Ikozahedry jsou pravidelné dvacetistěny s trojúhelníkovými plochami a dvanácti rohy. Polyedr tohoto typu je z termodynamického hlediska nejstabilnější. Ostatní viry kulovitého tvaru se liší jiným počtem stěn. Druhý obecný strukturní typ je tyčinkovitý. Tyčinkovitý virus může být tuhý nebo ohebný, ale vždy má helikální symetrii kapsidu. Kapsomery jsou sestaveny do válcovitého tvaru šroubovicově. Celek tří po sobě následujících otáček se uniformě opakuje po celé délce virionu. Šroubovicová nukleová kyselina je protažena mezi užšími částmi jednotek tak, že neleží volně v centrální dutině virionu. Závity jednotek kapsidu přesně odpovídají závitům šroubovice nukleové kyseliny. Každá jednotka kapsidového obalu náleží několika nukleotidům. [8,10]



Obr. 2 (Klug and Casper in Matthews)

Obr. 2 Helikální struktura kapsidového obalu, tyčinkovitý TMV

Obr. 3 Ikozahedr



Obr. 3 (Matthews, 1991)

Některé tzv. obalené viry mají kromě kapsidy i lipoproteinovou membránu.

Kromě bílkovin tvořících kapsidu kóduje virová nukleová kyselina i enzymy, které potřebuje virus k rozmnožování a které jsou natolik specifické, že je nemůže hostitelská buňka poskytnout. Buď je virus schopen přenášet je z buňky do buňky nebo je nechává syntetizovat přímo v napadené buňce. Geny pro jejich syntézu bývají zařazeny v genomu hned po genech pro zastavení vlastního metabolismu buňky, nebo tam, kde jich je časově potřeba.

Mezi tyto nestrukturní bílkoviny řadíme proteázy. Proteázy pomáhají posttranslačně upravovat strukturní proteiny viru.

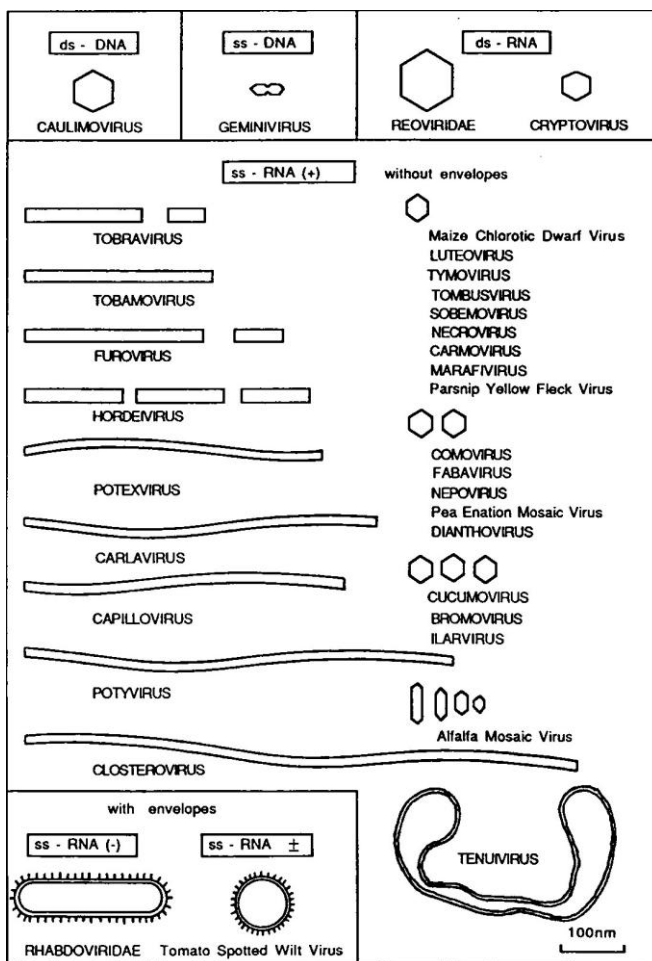
Další skupinou jsou enzymy nezbytné pro syntézu nukleové kyseliny. Zásadní jsou i při syntéze mRNA. Tato mRNA slouží jako matrice pro virem kódované bílkoviny. Celkově tyto enzymy nazýváme virové polymerázy. RNA-dependentní RNA polymerázy se nazývají enzymy, které jsou přítomné při kopírování nebo přepisu z RNA. Často se označují jako replikázy. Mezi rostlinnými viry se můžeme setkat s reverzní transkriptásou, která katalyzuje syntézu DNA z RNA (*Caulimovirus*). DNA polymerázu najdeme u DNA virů. DNA polymerázu s helikásovou aktivitou najdeme též u DNA virů. Tento enzym se podílí nejen na replikaci DNA a denaturaci jejích vláken, ale má význam i při rekombinacích a opravách.

Několik skupin virů kóduje proteiny, které jim pomáhají v přesunu viru z buňky do buňky a též zprostředkovávají pohyby cytoplasmou. Nazývají se „movement proteins“ - transportní proteiny [1].

Některé viry kódují proteiny, které omezují nebo zpomalují obranné mechanismy buňky. Často štěpením inaktivují proteiny obranného systému hostitele, jako například HC-Pro potyvirů (+ssRNA).

Mnoho nestrukturních bílkovin je multifunkčních. Tuto multifunkčnost si můžeme ukázat například na proteinu VPg potyvirů. Jeho nejdůležitější funkcí je zahájení syntézy RNA. Chrání 5'-konec RNA, od kterého postupuje polymerizační reakce. Kromě toho zahajuje sestavení virionu, ovlivňuje šíření viru a také snižuje obrannou reakci buňky (interaguje s geny rezistence). Zajímavý je tento protein také tím, že je jediný, který ovlivňuje syntézu RNA, ale zároveň není enzymem [1].

Nezbytnou součástí virionu je voda. Většinou je ve formě malé vrstvy kolem kapsidového obalu [6].



Obr. 4 (Matthews, 1991)

Obr. 4 Rodiny a skupiny rostlinných virů a jejich tvar.

2.3. Viroidy, satelity

Nejmenší částice vyvolávající nemoci rostlin se nazývá viroid. Je to krátká, kapsidem neobalená jednořetězcová RNA. Má pouhých 250-350 nukleotidů, které nekódují žádné strukturní bílkoviny. Nemoc se projevuje podobnými příznaky jako nemoci způsobené viry. Viroidy se rozmnožují v jádru buňky. Je jich známo asi dvacet druhů a téměř všechny tyto druhy se výborně množí v pletivu listů rajčete. Viroidy se většinou šíří mezi rostlinami dané populace, zřídka se šíří z generace na generaci pomocí infikovaných semen nebo pylu [12]. U nás je nejvýznamnější viroid vřetenovitosti hlíz bramboru a latentní viroid chmele [13].

Satelity virů jsou subvirální nukleové kyseliny, které nekódují enzymy potřebné pro vlastní replikaci a jsou proto závislé na jiném spoluinfikujícím pomocném viru. Pomocným virům odebírají satelity potřebné enzymy pro vlastní replikaci. Genom satelitů se od genomu pomocných virů liší. Většina satelitů nenese žádné ORF (čtecí rámec ohraničený start a stop kodonem). Je znám jediný DNA satelit, ostatní jsou tvořeny jednořetězcovou kružnicovou nebo častěji lineární molekulou RNA. Jejich obvyklá délka je 700-1500 nukleotidů. Příkladem satelitu a jeho pomocného viru může být satelitní virus nekrózy tabáku a virus nekrózy tabáku. Satelitní virus nekrózy tabáku je dokonce největší mezi satelity [13].

3. Exprese virionu

3.1. Rozmnožování

Obecně je pomyslný životní cyklus u všech skupin rostlinných virů podobný. Podle povahy nukleové kyseliny se liší postup replikace a transkripce případně aspekty s tím spojené. Prvním stádiem interakce viru s hostitelskou buňkou je absorpce virionu na její povrch. Následuje penetrace-průnik do buňky a destrukce virových proteinových obalů. Po obnažení nukleové kyseliny a zahájení čtení virového genomu buňkou je zastaven vlastní metabolismus buňky (transkripce, translace). Buňka je nyní připravena poskytnout veškeré své prostředky a substráty pro kopírování viru. To je odlišné pro každou skupinu virů, nicméně vždy musí být v této části exprese přítomné nestrukturní proteiny, které jsou potřeba k replikaci či transkripci virové nukleové kyseliny. Pokud není tato virová polymeráza či replikáza přenesena do buňky spolu s virem, dochází během časně transkripce ke vzniku mRNA pro syntézu těchto enzymů. Některé viry nepotřebují virem kódované enzymy, k expresi jim stačí enzymy poskytnuté buňkou. Následuje syntéza genomů budoucích virů, jejich kapsidových proteinů a speciálních nestrukturních proteinů, které mohou viru pomáhat v přesunech, nebo mohou snižovat obrannou reakci buňky. Syntéza virových proteinů probíhá na ribozomech, virus využívá buněčné tRNA. Strukturní proteiny a nukleové kyseliny se navzájem kompletují jako dceřiné viriony a opouštějí buňku [11,8].

Nejvíce rostlinných virů (49 rodů ze 70) má jednořetězcovou pozitivní RNA (+ssRNA), proto je také mechanismus replikace a translace +ssRNA v přírodě nejčastější. Nukleová kyselina vstupuje do cytoplazmy bez kapsidového proteinu. Brzy se napojuje na ribozomy kde dochází k translaci polymerázy a dalších nestrukturních proteinů. K samotné replikaci s účastí zmíněné polymerázy dochází nejčastěji na membránách endoplazmatického retikula. Známé jsou i případy, kdy se +ssRNA replikuje na membránách chloroplastů. Původní +ssRNA slouží jako matrice k negativnímu řetězci RNA. Jeho syntéza začíná od 5'-konce původního řetězce. Z negativního řetězce se od 5'-konce syntetizuje buď pozitivní vlákno, které bude sloužit jako budoucí genom dceřiného virionu, nebo pozitivní mRNA, ze které se translací vyrábějí strukturní proteiny, jako je kapsidový protein. Promotor na 5'-konci negativní RNA je přítomen jako komplementární na 3'-konci pozitivní RNA. V buňce se poměr negativních a pozitivních řetězců pohybuje okolo 1:100 (negativní:pozitivní). Ze vzniklých produktů se skládají dceřiné viriony. Protože při replikaci lineárních genomů dochází často ke

ztrátám nukleotidů na jejich koncích, využívají +ssRNA i buněčné reparační mechanismy.

Negativní jednořetězcové RNA viry mají rozmnožování o to složitější, že po vniknutí do buňky zahajují rovnou přepis do +ssRNA a musí si tedy RNA-dependentní RNA polymerázu přinést s sebou. Dceřiné viriony si pak opět nasyntetizovanou polymerázu odnášejí v komplexu do dalších buněk, a to dokonce po dvaceti molekulách. Zbytek replikace probíhá jako u +ssRNA virů [13].

Zajímavý rod s jednořetězcovou RNA je Bunyavirus. Ty mají negativní dvojsmyslný genom. Genom tvoří tři až šest fragmentů lineární RNA, které jsou společně sbaleny ve virionu. Dvojsmyslný znamená to, že se mRNA překládá z dvou, buňkou odvozených řetězců RNA s opačnou polaritou. Tyto dva řetězce se navzájem replikují a z každého se po přepisu do mRNA překládá jiný protein (podle toho, kde mají 5'-konec). RNA-polymerázu si přenášejí z buňky do buňky [1,13].

Viry, které mají jeden z nejdelších genomů vůbec, jsou dvouřetězcové RNA viry. Jejich genom bývá rozdělen do několika segmentů (10 nebo 12 podle druhu). Před transkripcí musí dojít k denaturaci vláken. Pomocí virové transkriptázy je nasyntetizováno 10 nebo 12 ssRNA a následně 10 nebo 12 mRNA. Dochází k translaci. Denaturovaná vlákna slouží zároveň jako matrice pro replikaci –ssRNA a +ssRNA, které se kompletují do dsRNA [6,1].

Viry s jednořetězcovou ssDNA mají malý kružnicový genom. Může dosahovat velikosti 3kb. Ve virionu se nacházejí dvě izomerické podjednotky. Replikace probíhá v jádře hostitele, v první fázi se vytváří negativní dsDNA řetězec a dochází ke konverzi ssDNA na replikační formu dsDNA. Ve druhé fázi se syntetizuje virová pozitivní dsDNA.

U rostlinných virů má formu genomu dvouřetězcové dsDNA pouze jediná čeleď (*Phycodnaviridae*). Dvouřetězcová DNA ve srovnání s ostatními druhy nukleové kyseliny fytovirů dosahuje velkých rozměrů, a to téměř 400kb. Viry s touto nukleovou kyselinou jsou také vyjíměčné svým způsobem penetrace. Virus se specificky naváže na povrch buňky. Buněčnou stěnu naštěpí vlastními enzymy a následně indukuje DNA. Denaturovaná DNA je matricí jak pro novou replikovanou DNA, tak pro transkribované RNA, podle které dále probíhá translace strukturních proteinů. Nasyntetizovat zralý dceřiný virion trvá buňce čtyři hodiny.

DNA viry se zpětnou transkriptázu patří pouze k jedné čeledi (*Caulimoviridae*). Po průniku virové DNA do jádra se oba řetězce oddělí, opraví se zlomy a vytvoří se kružnicový minichromozom. Pak následuje transkripce. Na genomu jsou dva

promotory, z prvního (35S) se rostlinnou RNA-polymerásou II přepisuje lineární molekula předgenomové RNA. Z druhého promotoru se přepisuje subgenomová RNA. Obě tyto molekuly následně putují do cytoplasmy. Z předgenomové RNA se pomocí virové zpětné transkriptázy přepisuje DNA dceřiného viru. Subgenomová RNA slouží jako matrice pro mRNA. Z této mRNA probíhá translace proteinů [13].

3.2. Šíření virů z buňky do buňky

Rostlinné viry se dokáží šířit dvěma způsoby. První možný způsob přenosu viru mezi buňkami probíhá pomocí mezibuněčných spojů - plazmodesmat. Tento způsob používá většina rostlinných virů. Viry se přesouvají v komplexu nukleoproteinů, nikoli jako kompletní sestavený virion. V tomto komplexu se přesouvají i s případnými polymerásami a jinými pomocnými proteiny. K přesunu je také potřeba virem kódovaných transportních či kapsidových proteinů. Transportní proteiny způsobují například stonásobné zvětšení průchodnosti plazmodesmat.

Druhým způsobem, který je běžný spíše u živočišných virů, je lyze buňky. Tuto cestu využívají dsDNA rostlinné viry. Po pomnožení viru do vysokých titrů dochází k roztrhnutí buněčné stěny a uvolnění virů do mezibuněčných prostor. dsDNA virus injikuje DNA přes buněčnou stěnu do nejbližších buněk. Jiné čeledi by nebyly další infekce schopny.

Šíření virů rostlinou na větší vzdálenosti je možné pomocí vodivých pletiv. Těmi se viriony přenášejí do jiných částí rostliny. K tomuto přenosu napomáhají zatím neznámé kofaktory hostitele [1].

3.3. Mutace virů

Mutace, jak spontánní, tak indukované, jsou u virů velice časté, protože většina virů nemá žádné reparační mechanismy, kterými by mutace opravovaly. Letální mutace jsou ovšem selekcí velmi rychle eliminovány, což svým způsobem zabezpečuje relativní genetickou stabilitu daného viru. Mutační proces virových genů se řídí stejnými pravidly jako genové mutace buněčných genů. V podstatě každý strukturní či regulační gen může mutovat. Obecně (u všech virů) jsou nejčastější mutace: ztráta hostitelské specifity, změněná schopnost integrace genomu do genomu hostitele, změněná morfologie kapsid či změna antigenních vlastností [8]. Možnými mutacemi jsou např. vynechané báze, přidané báze či přeskupené sekvence nukleotidů [6].

Významná je i změna genomu při rekombinaci dvou virů. Dochází k ní, pokud je buňka infikovaná současně podobnými viry nebo různými mutanty téhož viru [8]. Děje se tak jak u DNA, tak u RNA virů [6]. Ve velké frekvenci dochází k rekombinaci u virů se segmentovaným genomem [8].

Oba tyto typy přeměn přispívají k evoluci a vývoji virů. Mutacemi či rekombinací může vzniknout jak oslabený a znevýhodněný druh, tak vysoce virulentní. Virus může změnit hostitele či hmyzího přenašeče.

4. Rostlinný virus jako patogen

4.1. Přenos virových chorob

Jak již bylo řečeno, rostlinný virus může infikovat rostlinu pouhým mechanickým poškozením. To může být způsobeno polomem, mrazem, silným větrem a deštěm, nebo i sestřihem a prořezáváním při zahrádkářských úpravách. Pokud jsou přítomna takováto poškození, mohou se viriony přenášet vodou, větrem, zeminou a stabilnější z nich i pouhým dotykem.

Nejčastější přenos je uskutečňován hmyzími vektory (přenašeči). Tito členovci zprostředkovávají nejen přenesení virů z rostliny na rostlinu, ale i poškození buněčné stěny jejich bodavě sacím ústním ústrojím, a tím umožní vniknutí viru do buňky. Těmito vektory jsou paraziti na daných rostlinách, nejčastěji mšice, molice či křísi. Dle interakce virus-vektor může být přenos perzistentní, neperzistentní nebo semiperzistentní [14,5].

K perzistentnímu cirkulativnímu přenosu je potřeba dlouhé sání z infikované rostliny. Virus pak prochází trávicím traktem vektoru do hemolymfy a pak do slinných žláz a opět do slin, odkud je přenesen do nové rostliny. Doba, kdy prochází viry tělem živočicha, se nazývá inkubační a hmyz během ní není infekční. Po prodělání inkubace se hmyz stává infekční do konce svého života dokonce i po svlékání.

Jsou známé případy, kdy se virus dokázal pomnožit ve vnitřních orgánech hmyzu, tento typ přenosu nazýváme perzistentní propagativní. Jak k němu dochází, není zatím zcela jasné.

Neperzistentní přenos je takový, u kterého je virus přenášen z povrchu sacího ústrojí. K tomu je potřeba pouze krátké akviziční sání (v řádu vteřin). Hmyzí vektor je infekční pouze krátkou dobu, to znamená jen několik hodin. Úspěšnost takového přenosu závisí na mnoha faktorech, včetně životního období, v jakém se přenašeč nachází.

Semiperzistentní přenos je takový, pro který je potřeba delší sání z nakažené rostliny a doba infekčnosti vektoru je delší, maximálně však do jeho svlékání. Virus neprochází latentní periodou, jako je tomu u přenosu perzistentního.

Ve vztahu virus-vektor dochází k perzistentnímu cirkulativnímu přenosu například u *Pea enation mosaic virus* přenášeného mšicemi, k perzistentnímu propagativnímu u *Sow thistle yellow vein virus* přenášeného mšicí ločkovou, k neperzistentnímu u potyvírů přenášených mšicí broskvovou a k semiperzistentnímu u viru žloutenky řepy *Beet yellows virus* přenášeného mšicemi [1,5].

Některé viry se dokáží přenášet i vegetativně – řízkou a roubováním. Semeny se přenáší buď na jejich povrchu, např. TMV, nebo přímo v embryu jako v případě viru mozaiky fazole. Pylem se virové nemoci šíří jen vzácně [5].

4.2. Infekce a příznaky

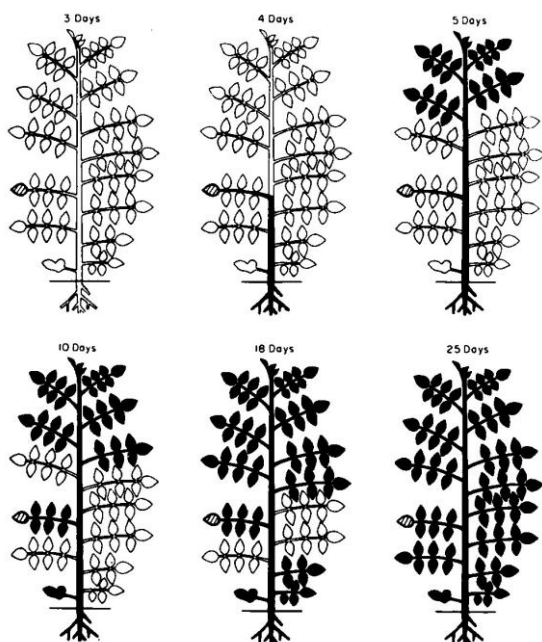
Každý rostlinný virus má svůj vlastní rámec hostitelských rostlin. Ten je širší než u virů živočišných, protože rostlinné viry nejsou omezeny systémem vnikání do buňky pomocí receptorů. Přesto je pro každý virus omezený počet druhů rostlin, které nejsou vůči němu imunní. O tom, jak bude infekce virem závažná, rozhoduje genetická výbava jak patogena, tak hostitele. Nehledě na rozsah infekce je její průběh vždy podobný. Nejprve dochází k iniciační fázi, při které se objevují první příznaky v místě vniknutí viru do rostliny. Po případném rozšíření viru do rostliny následuje fáze akutní, při které dochází k rychlé a masivní reprodukci viru a jeho šíření. Po určité době se koncentrace virů v rostlině snižuje a nastává fáze chronická. V tomto bodě může dojít k ozdravení rostliny, ale často dochází k následnému periodickému střídání fází akutních a chronických, případně ke smrti rostliny.

O rozšiřování infekce a jejích příznacích rozhoduje vnímavost hostitele vůči patogenovi. Rostlina může být rezistentní, to znamená, že je sice hostitelem, ale infekci se na různých úrovních brání, může zabraňovat vstupu viru, jeho šíření či zpomalovat expresi. Rezistentní rostliny mohou disponovat genem rezistence, který působí proti daným genům virulence, čímž potlačí nebo zpomalí virovou aktivitu. V tolerantních rostlinách se virus může neomezeně množit, ale dochází jen k mírným příznakům, a tím i k menším ekonomickým škodám. V rostlinách vnímavých se též virus silně množí a tato aktivita je doprovázená silnými až destruktivními příznaky.

Pokud se virus nedokáže šířit rostlinou, vzniká místní infekce doprovázená lokálními chlorotickými lézemi. Ty mohou mít 1-5 mm v průměru. Pokud dojde k odumření buněk, vznikají léze nekrotické. Tvoří se i takzvané ringspot-kroužkovité léze, které mají uprostřed nekrotickou skvrnu a po okraji kroužek odumřelých buněk, mezi nímž a centrem je proužek neporušených buněk.

Pokud se nákaza šíří dál, nejprve plazmodesmy mezi buňkami a pak vodivými pletivou po rostlině, mluvíme o systémové infekci [1]. Vyznačuje se krabatěním listů, svinováním listů nebo skvrnitostí. Může docházet k proužkovitosti a barevné nevyrovnanosti (například u tulipánů) nebo k žloutnutí či průsvitnění žilek. Příznaky se

mohou projevovat i na květech a plodech. Často se vyznačuje systémová infekce tím, že se příznaky tvoří na nově vzniklých listech vyrůstajících z vrchu rostliny. Nákaza také zpomaluje růst a způsobuje celkové vadnutí [1,11]. Koncentrace virů v rostlině je při systémové infekci v jednotlivých částech a druzích pletiva nevyrovnaná. Většina příznaků může mít i jiné příčiny, například bakteriální onemocnění, škůdce, či sucho. Přítomnost virů je tedy potřeba ověřit testy [1].

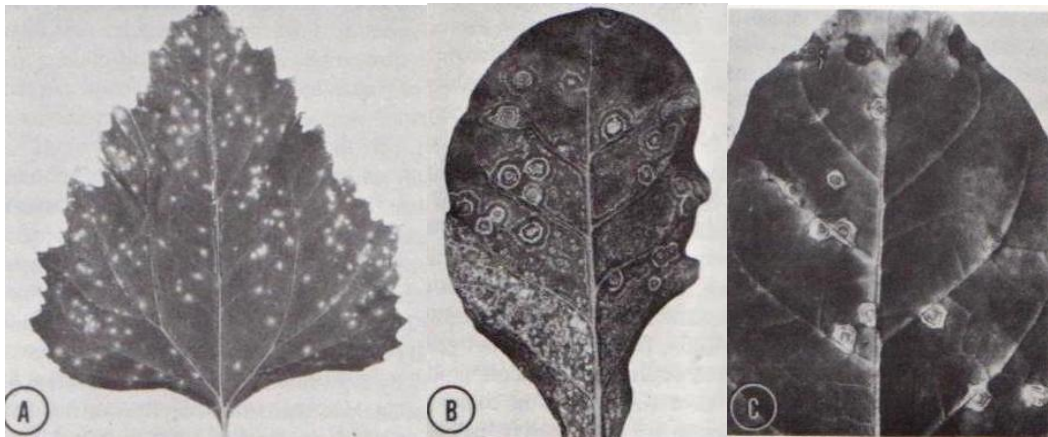


Obr. 4 (Matthews, 1991)

Obr. 4 Rozvoj systémové infekce v čase.

Může dojít i k infekci latentní, u níž můžeme pozorovat pouze slabé příznaky nebo žádné. Virus většinou setrvává v buňce, ale nerozmnožuje se. Tento typ infekce může mít ekonomický význam při směsných infekcích [3].

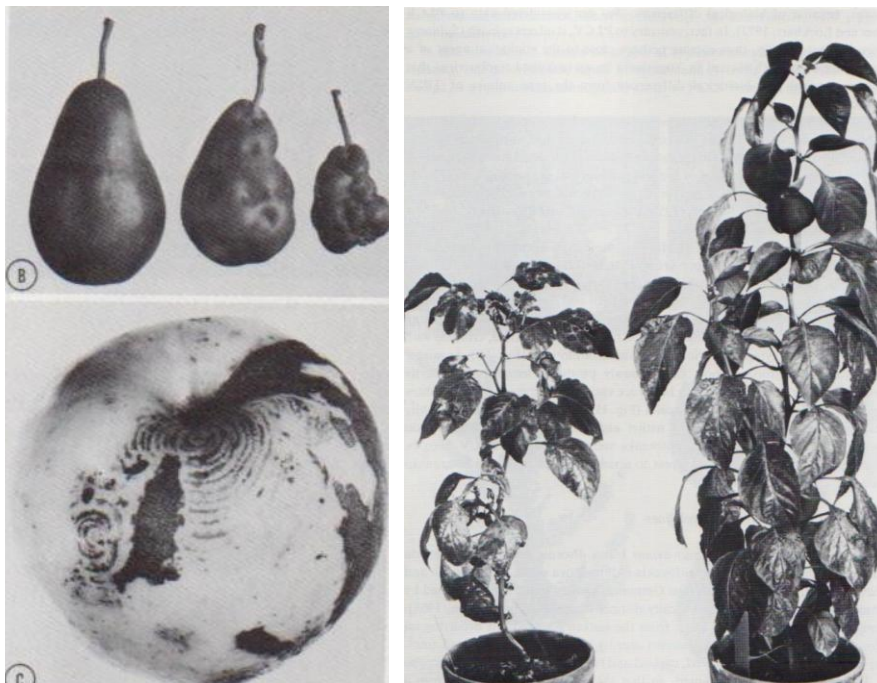
Pokud je rostlina nakažena dvěma viry současně (tzv. směsná infekce), dochází buď k zesílení infekce – synergismu, nebo naopak k oslabení – antagonismu, nebo k efektu křížové obrany. Většinou nedochází k přímé interakci mezi viry a tyto efekty jsou zprostředkované hostitelem. Při přímé interakci dochází k vzájemné rekombinaci genů mezi viry [1].



Obr. 5 (Matthews, 1991)



Obr. 6 (Matthews, 1991)



Obr. 7 (Matthews, 1991)

Obr. 8 (M. Conti in Kurstak)

Příznaky: Obr. 5 (A) chronické léze na *Chenopodium amaranticolor* infikovaného Beet mosaic virus, (B) Ring-spot kroužky způsobené AMV na tabáku, (C) nekrotické léze způsobené Tomato spotted wild virus na tabáku.

Obr. 6 Příznaky na květech fialky způsobené CMV. Zdravá rostlina vlevo.

Obr.7 Příznaky na plodech, (B) Pear stony pit virus na hrušce (zdravá vlevo), (C) Apple ring spot virus na jablku.

Obr. 8 Deformace a vadnutí celé rostliny, Pepřovník nakažený PAMV (zdravá rostlina vpravo).

4.3. Obrana rostlin proti virům

Rostliny nemají žádný systém centrálně řízené obrany (imunity) jako je tomu u živočichů, přesto jsou schopné se infekcím bránit. Většinou je tato obrana pasivní v podobě kutikuly, voskem pokryté buněčné stěny, či jinými úpravami pokožky, které pomáhají zabránit vniknutí patogena do organismu [14]. Přesto mají některé rostliny tzv. geny rezistence, o kterých jsem se zmiňovala již výše. Těmi jsou kódované receptory nacházející se v cytoplazmě a v jádře buněk, které interagují s patogeny a spouštějí obranné mechanismy. Tyto receptory jsou zaměřeny pouze na určitý protein konkrétního viru. Patogenu tedy stačí malá místní mutace k překonání receptorů. Příkladem může být gen *Rx* rostliny *Solanum tuberosum* (lilek brambor) kódující receptor interagující s kapsidovým proteinem X viru bramboru [13].

Další obranou rostlin, která je zaměřena proti šíření nemoci do okolí postižené oblasti, je hypersenzitivní reakce. Může při ní dojít k odumření místního pletiva. Byly objeveny kyselé proteiny označené jako „pathogenesis related proteins“ (PR proteiny), které se při nákaze shromažďují v mezibuněčných prostorách a napomáhají hypersenzitivní reakci. Patří mezi ně některé glukonázy, chitinázy či peroxidázy. Předpokládá se souvislost mezi PR proteiny a získanou systémovou rezistencí, která se projevuje při druhotné infekci stejným virem na stejnou rostlinu menšími příznaky než u první infekce [1].

Specifická obrana proti virům, které se během svého životního cyklu vyskytují v podobě dsRNA (dvouřetězcové RNA), je post-transkripční genové zhášení (post-transcriptional gene silencing – PTGS). Tento mechanismus zpomaluje expresi virů v buňce. Nejprve je dvoušroubovice RNA rozeznána enzymem Dicer, který ji denaturuje a rozštěpí na úseky siRNA (small interfering RNA), které se nepřekrývají. Dicer je enzym podobný RNase III, který štěpí RNA na úseky dlouhé zhruba dvacet nukleotidů. siRNA se připojí na proteinový komplex RISC (RNA-induced silencing complex). Ten odvine siRNA na jednořetězcovou, která se komplementárně váže s další virovou RNA, kterou rozštěpí nukleáza Slicer (součást RISC). Buněčné mechanismy pak tuto RNA likvidují jako poškozenou [1,14,5].

Některé viry si proti PTGS vytvořily nestrukturní proteiny se supresorovou funkcí. Tyto proteiny se akumulují v buňce a štěpí proteiny obranného systému buňky. Inaktivují tím velkou část systému PTGS a urychlují expresi viru. Takovým proteinem je například nestrukturní multifunkční TGBp1 potexvirů, nebo HC-Pro potyvirů. HC-Pro (helper component protease) je též multifunkční, pomáhá při přenosu viru mezi buňkami tím, že nespecificky zvyšuje propustnost plasmodesmat a také se uplatňuje v těle mšic při přenosu [2,5].

4.4. Rezistence navozená patogeny

Postup infekce nemusí být brzděn jen v důsledku aktivity hostitele. K takovému zpomalení exprese a rozšiřování infekce dochází při antagonismu u směsné infekce. Při infekci dvěma viry může dojít k jevu zvanému křížová ochrana (cross protection). Při křížové ochraně je rostlina, která je infikovaná jedním kmenem viru, chráněna před infekcí virulentnějšího příbuzného kmene. Tento jev není ještě přesně vysvětlen a je aktivně zkoumán, protože jeho využití by mohlo vést k ochraně užitkových a hospodářských rostlin [1].

Snížení replikační schopnosti viru a zmírnění projevů infekce způsobuje také přítomnost satelitu daného viru (ve většině případů). Protože jsou satelity závislé na výrobě proteinů od virů, ze kterých byly odvozeny, odebírají z buňky syntetizované virové proteiny, čímž zpomalují expresi plnohodnotných virů. Rezistence navozená patogeny s sebou přináší riziko rekombinace či mutace účastnících se faktor, a tím i vzniku virulentnějších kmenů [13].

4.5. Ozdravování

Jednotlivé rostliny se mohou při virové chorobě ozdravit a zbavit příznaků v chronické fázi infekce. Do té doby může být z dané rostliny infekce přenesena na další hostitele. Viry také mohou zůstat v půdě, odkud mohou být distribuovány do dalších rostlin. Oblastem postiženým nákazou by se tedy mělo dostat náležitá péče.

U virů živočišných lze takovou dezinfekci prostředí provést pomocí chloru. Viry jsou také náchylné k teplu a ultrafialovému záření [15]. U agrikultur toto samozřejmě není možné, ozdravování je v tomto případě dlouhodobou záležitostí.

Na polích, která byla takto postižena, by se měly dále vysazovat rostliny imunní proti identifikovaným virům a obecně by měly být vysazovány odrůdy rezistentní či imunní.

Ty však často nejsou k dispozici. Pokud dojde k postižení celé odrůdy, může projít termoterapií a terapií meristémových kultur.

U termoterapie jsou rostliny vystaveny po dobu několika týdnů zvýšeným teplotám (35°C – 40°C). Při této termoterapii dochází k snížení koncentrace termolabilních virů a dokonce i k jejich vymizení v pupenech. Ty jsou následně očkovány na bezvirózní podnože.

Viry se většinou nevyskytují na vrcholcích apikálních meristémů [1]. Apikální meristémy, nebo též vegetační vrcholy, se nacházejí ve vrcholech pupenů a na kořenové čepičce. Meristém je primární dělivé pletivo a je nediferencované. Z těchto vrcholů se při meristémové terapii odebere 0,2-0,5 mm tkáně, která se dále pěstuje na umělých živných médiích.

Tyto metody nejsou vždy zcela úspěšné, proto je zapotřebí ozdravené rostliny dále testovat, někdy i několik let [1].

5. Biotechnologické využití rostlinných virů

5.1. Genom viru jako expresní vektor

Rostlinné viry nepředstavují pro člověka pouze patogena, který snižuje produkci a kvalitu potravin. V biotechnologiích jsou dnes viry využívány při výrobě biologicky významných látek. Tyto látky jsou enzymy, proteiny, růstové hormony i protilátky a využívají se většinou ve farmaceutice. Způsob získávání látek pomocí rostlin a jejich virů má menší výrobní náklady než je tomu u jiných technologií. Otevírá také nové možnosti využití rostlin, jako je tomu v případě tzv. jedlých vakcín. Při využití rostlin k heterologní expresi nedochází ke kontaminaci produktu savčími toxíny a patogeny, jako je tomu u živočišných buněk, proteiny jsou také na rozdíl od exprese v bakteriích posttranlačně modifikované.

Existují dva způsoby realizování přípravy cizorodých látek v rostlinách.

Při permanentní expresi dochází k trvalému začlenění genu, který kóduje potřebnou molekulu, do genomu rostliny. Využívají se k tomu buď půdní parazitické bakterie, které dokáží přenášet část své DNA do jádra buňky, nebo se heterologní DNA navázaná na těžké kovy nastřeluje do pletiva pomocí genového děla. V tomto případě jsou rostliny geneticky modifikované a je zajištěna výroba proteinu u všech dalších generací transgenních rostlin.

Druhý způsob je transientní (přechodná) exprese, která využívá rostlinných virů. V tomto případě nedochází k začlenění genetické informace do genomu rostliny a vektory mohou být purifikací z rostliny zpětně izolovány [2]. Rostlinné viry se množí nezávisle na hostiteli z většího počtu matric, což znamená, že dochází k rychlejší expresi (1-2 týdny) než je tomu u transformovaných rostlin (permanentní exprese) [13].

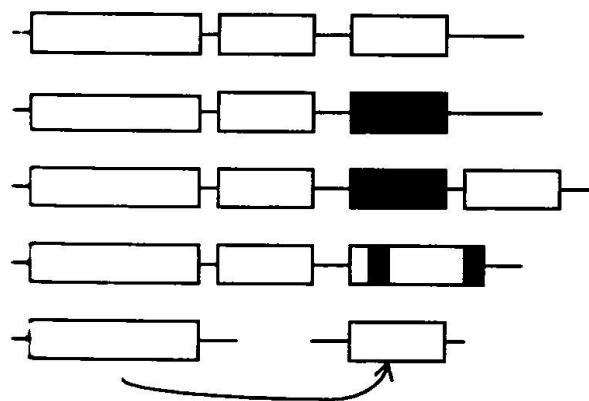
Vektor je většinou odvozen z jednořetězcové RNA, ke které je připojen úsek kódující daný produkt. Vektor může být dále upraven dle potřeby. Je vhodné vektory odvozovat od stabilních virů vybraného hostitele, které jsou snadno mechanicky přenosné. Rostlina by k nim měla být vnímavá či tolerantní, aby docházelo k velké koncentraci virů a co největšímu výtěžku. Příkladem vhodného viru je X-virus bramboru (PVX-Potato virus X) nebo virus mozaiky tabáku (TMV-Tobacco mosaic virus) [2]. V případě viru mozaiky tabáku může být v jedné buňce až několik set virionů, pokud je hostitelem rostlina *Nicotiana tabacum*, tvoří tento virus až 3 % čerstvé hmotnosti rostliny [13].

Původně se vektory vyráběly strategií úplných virových vektorů, zde byl přirozeně se vyskytující virus pouze modifikován tak, aby mohl nést heterologní sekvenci kódující

protein, a samozřejmě byl opatřen silným promotorem. Tato strategie s sebou ale nesla i jistá nebezpečí, protože virus byl plně funkční a hrozilo jeho rozšíření. Dalším problémem byla postupná ztráta vloženého genu při přenosu [2]. Pokud byl virus přidáním heterologní sekvence podstatně zvětšen, docházelo k nestabilitě konstruktů. Nejvhodnější pak bylo začlenění krátkých epitopů nebo používání virů s helikální strukturou (tyčinkovité, vláknité), u kterých nezpůsobuje prodlužování takovou nestabilitu jako je tomu u jiných tvarů virů [13].

Postupně se vyvinula strategie tzv. dekonstruovaných virových vektorů, při které jsou z virů odebírány nežádoucí funkce. Většinou se virus zbavuje přílišné hostitelské specifity a hlavně schopnosti šíření, což řeší bezpečnostní problém. Pokud je zapotřebí, mohou být tyto funkce poskytovány transgenním hostitelem, nebo cizími elementy. Ani tato metoda však není bezproblémová. Pokud se k rozšíření vloženého genu používá agroinfiltrace, dochází ke kontaminaci produktu agrobakteriemi. To je cena za nepřítomnost kapsidového virového proteinu, bez kterého se virus nedokáže šířit a nedochází ke vzniku infekčních partikulí.

K vytvoření vektoru můžeme použít strategii výměny genů, inserce genu, začlenění epitopu nebo komplementace virové RNA [13].



Obr. 9. (Rosypal, 2002)

Obr.9 Strategie exprese cizích genů pomocí virového vektoru. Shora dolů: původní virus, výměna genů, inserce genů, začlenění epitopu, komplementace.

Současný výzkum míří k bezpečnému vektoru, který nezpůsobuje systémovou infekci a zároveň je schopen se šířit mezi buňkami a nepotřebuje agrobakterium. Tyto vektory by měly být podporovány transgenními rostlinami.

Idea jedlých vakcín je postavena na principu virových vektorů. Jedná se o rostliny, které vyrábějí díky virovému vektoru antigeny, například antigeny z lidského papillomaviru a z dalších nebezpečných lidských nemocí. Plody těchto rostlin je možné konzumovat přímo na místě jejich růstu. Proto jsou také vhodnými kandidáty na pěstování v rozvojových zemích. Nevýhoda těchto jedlých vakcín spočívá v proměnné koncentraci antigenu v rostlině pěstované za nestálé teploty a vlhkosti [2].

V genetickém inženýrství jsou viry samotné výborným zdrojem zajímavých biologicky aktivních látek. V tomto oboru se využívají kontrolní elementy, jako jsou promotory, nebo enzymy, jako je virová polymeráza, endonukleáza či proteáza [13].

5.2. Navození rezistence proti virům

Pro zemědělství je tato oblast výzkumu velice důležitá. Z pohledu člověka je stav rezistence rostlin proti patogenům ideální, a proto již existuje mnoho způsobů, jak tohoto stavu dosáhnout nebo se k němu alespoň přiblížit. Není znám způsob, jak poskytovat obranu zvenčí (postřiky, práškování atd.), proto si obranu musí vyrábět sama rostlina, vznikají tedy rostliny transgenní - geneticky modifikované.

a) Transgeny odvozené od patogena

Tento model byl představený v roce 1985. Předpokládá, že část viru (protein) vyrobený rostlinou interferuje s běžným životním cyklem viru. Buď látka konkuruje viru a zpomaluje jeho expresi (podobně jako satelit), nebo je to běžná součást viru, ale transgen vložený do rostliny je pozměněn a po sloučení s novými viriony je degraduje, nebo alespoň znemožňuje funkci viru, kterou daný protein plní. Příkladem, kdy látka soutěží s virem o hostitelské faktory a substráty, je rezistence navozená replikásoú s pozměněnými polymerásovými doménami. Příkladem rezistence, při které je virus degradován v určité funkci, je použití mutovaného transportního proteinu.

Dalším zajímavým způsobem, jak zabránit infekci, je využití promotorů. Virové promotory jsou aktivovány pouze virovou nukleovou kyselinou. Rostlina je transformována genem pro cytotoxický protein řízený virovým promotorem. Pokud do buňky vstoupí virus, promotor je aktivován a toxin způsobí smrt buňky. To se stane rychleji, než se virus stačí rozšířit do dalších buněk.

Princip, při kterém se využívá přítomnosti nepřekládané RNA, je postaven na tom, že po překročení určitého množství RNA v buňce, je RNA mechanismy buňky odbourávána. Transgeny v rostlině produkují množství RNA pod touto hranicí. Pokud

se v buňce začne replikovat rostlinný RNA virus, je tato hranice překročena a dojde k jeho odbourání a následnému ozdravení rostliny.

Při používání transgenů odvozených od patogena hrozí potenciální nebezpečí rekombinace a vzniku vysoce virulentních kmenů viru.

b) Nevirové transgeny

Tato obrana je inspirována živočišným odbouráváním virů. Existuje několik možných způsobů použití nevirových látek k obraně.

Metoda, jejíž úspěšnost se pohybuje okolo 50%, je použití živočišných protilátek. Většinou se nepoužívají kompletní imunoglobuliny, ale pouze scFv (jednovláknové řetězce hypervariabilních domén lehkého a těžkého řetězce) nebo Vh (hypervariabilní doména těžkého řetězce). Tyto protilátky jsou schopny nalézt antigen a neutralizovat ho.

Další použitelnou možností je využití transgenů pro 2'-5'synteazu, to je látka, která rostlinám chybí k zahájení oligoadenylátsyntézy běžné u savců. Jedná se o reakci, při které živočišné buňky po infekci virem produkují interferon. Ten aktivuje oligoadenylátsynteazu (2'-5'azu), která přidává adenosin ke koncům dsRNA. dsRNA se v životním cyklu viru vyskytuje jako replikační meziprodukt. Tento komplex aktivuje RNasu L, která štěpí veškerou RNA a dochází ke smrti buňky.

Proti některým virům byly vyvinuty inhibitory virových proteás. Rezistence byla u pár virů navozena i pomocí RNasy III, která umí štěpit duplexy RNA na oligomery s 25 pb a mRNA na specifickém místě [13, 5, 14].

6. PVX- X virus bramboru

Čeď: *Flexiviridae*, rod: *Potexvirus*, druh: X virus bramboru

X virus bramboru je typový zástupce Potexvirů, rodu, který má přibližně 40 druhů. Tvar PVX je vláknitý. Na svých hostitelích většinou zanechává jen mírné příznaky [14,2]. Nebezpečný je při směsné infekci s Y virem bramboru. PVX je schopen infikovat na 240 druhů rostlin v 16 čeledích. Polovina jeho hostitelů ovšem pochází z čeledi Solanaceae – Lilkovité. Mezi další čeledi, jejichž zástupce X virus bramboru napadá, patří Laskavcovité, Merlíkovité, Hvězdicovité, Svlačcovité, Bobovité atd [4]. Z hospodářsky významných plodin, které PVX napadá, je potřeba zmínit zejména brambory. Příznaky na listech bramboru jsou v podobě lehké mozaiky. Ztráty hlíz mohou dosahovat až 25 %. Tento virus se množí do vysokých titrů a inkluze obsahující zralé viriony jsou lokalizovány zejména v blízkosti jádra infikovaných buněk. Patří mezi stabilnější viry. Nešíří se pylem ani semeny, je přenášen mechanickou inokulací či kontaktem zdravé rostliny s nemocnou.

Tvar PVX je vláknitý. Vlákno virionu je 515 nm dlouhé a průměr má 13 nm. Kapsid má helikální symetrii a je tvořen zhruba 1300 kopiemi kapsidového proteinu. V každé otočce šroubovicově uspořádaného kapsidového obalu najdeme 8,9 monomerů. Monomer je tvořen 236 aminokyselinami a každý interaguje vždy s pěti nukleotidy. Výška závitů 3,3-3,6 nm kolísá v závislosti na množství vody. Proteiny tvoří 94 % celkové váhy virionu, 6 % celkové hmotnosti tvoří molekulová hmotnost genomu. PVX má lineární pozitivní jednovláknovou +ssRNA o celkové délce 6435 nukleotidů. Virion obklopuje malá vrstva vody.

3'-konec RNA je polyadenylován, jsou na něj připojeny adeninové zbytky. 5'-konec je krytý takzvanou čepičkou. Obě tyto úpravy chrání konce před enzymy štěpícími nukleové kyseliny [14,2]. Úvodní sekvence na 5'-konci je velmi silný translační zesilovač. Následuje gen kódující replikázu, která je největším kódovaným proteinem, a byla na ní identifikovaná metyltransferasová, helikasová, polymerasová a proteasová doména. Proteáza odštěpuje malý peptid z prekurzoru kapsidových proteinů [13]. Směrem k 3'-konci je kódující sekvence pro trojici pohybových proteinů (triple gene bloc proteins – TGBp). První TGBp1 zvyšuje propustnost plazmodesmat pro makromolekuly, také je zodpovědný za tvorbu ribonukleoproteinů – komplexu TGBp1-RNA-CP, ve kterém se PVX pohybuje z buňky do buňky. TGBp1 je multifunkční a může působit i proti obranným systémům hostitele. Zbylé dva pohybové proteiny, které

jsou charakteristické svými hydrofobními doménami, napomáhají přemístění ribonukleoproteinů do blízkosti plazmodesmat. Na 3' konci virové RNA se nachází gen kódující kapsidový protein [14,2].

7. Cíl

Pro praktickou část své ročníkové práce, ve které bych ráda představila některé z nejzákladnějších a nejdůležitějších metod pro výzkum rostlinných virů, jsem si jako zástupce, se kterým budu pracovat, vybrala X virus bramboru (PVX) z rodu Potexvirů a jako hostitelské rostliny některé druhy tabáku a merlík nachový – *Chenopodium amaranticolor*.

7.1. Část první: Infikace rostlin virem PVX

V první části práce budu zjišťovat, které z rostlinných hostitelů a jakým způsobem reagují na infekci viru, zda dochází k systémovým nebo jen k místním infekcím, a které z rostlin jsou nejméně rezistentní. Výsledky doložím ELISA testem. Nakonec z rostlin vyberu nejtolerantnějšího hostitele, se kterým budu dále pracovat.

7.2. Část druhá: Purifikace PVX

Podle výsledků z první části vyberu rostlinu, která je vnímavá na infekci X viru bramboru. Vypěstuji si nové rostliny, které infikují virem PVX. Z nového materiálu udělám purifikaci, kdy se budu snažit získat co nejčistší vzorek viru.

7.3. Část třetí: PCR

V této části si zjistím metodou polymerasové řetězové reakce (PCR), zda byl v rostlinách přítomný virus PVX. Nejprve provedu reverzní transkripci (RT), která převede RNA viru na DNA, se kterou pak mohu provést PCR. Produkt z PCR identifikuji na gelové elektroforéze.

8. Materiály

8.1. Chemikálie:

Azid sodný	Sigma-Aldrich, USA
Chlorid draselný	Lach-Ner, ČR
Chlorid sodný	Lach-Ner, ČR
Diethanolamin	Fluka, Švýcarsko
Hydrogenfosforečnan sodný	Lach-Ner, ČR
Hydrogenuhlíčan sodný	Lach-Ner, ČR
Ovalbumin	Fluka, Švýcarsko
p-nitrophenylfosfát	Sigma-Aldrich, USA
Polyvinylpyrrolidon	Sigma-Aldrich, USA
Sacharoza	Lach-Ner, ČR
Tris	Duchefa, Nizozemí
Tween 20	Fluka, Švýcarsko
Uhlíčan sodný	Lach-Ner, ČR
Dihydrogen fosforečnan draselný	Lach-Ner, ČR
Karborundum	Vitrum, ČR
Agaróza	Sigma-Aldrich, USA
Voda	Pražská vodárenská, ČR

Souprava pro RT reakci:

dNTP (10 mM)	Fermentas, USA
DTT (0,1 M)	Promega, USA
MMVL reverzní transkriptasa RNase H	
Minus, Point Mutant (200 U/μl)	Promega, USA
5xFirst-Strand Buffer	Promega, USA
RNase OUT Ribonuclease Inhibitor (rekombinantní) (40U/μl)	Fermentas, USA

Souprava pro PCR reakci:

5×pufr (5X Green GoTaq™ Reaction Buffer)	Promega, USA
Taq DNA polymerasa (rekombinantní) (2,5 U/μl)	Promega, USA
dNTP (10mM)	Fermentas, USA

Primery

PVX3

PVX5

8.2. Laboratorní vybavení

a) Pomůcky

Odměrný válec

Umělohmotná lžička

Sítko

Silon

Třecí miska

Pipety

Kyvety

Zkumavky

Injekční stříkačky

Eppendorfký

Skleněná trubička

Odměrný válec

Jiné chemické sklo

b) Přístroje

Předvážková váha

Kern, Německo

Klimabox

Sanyo, Japonsko

Inkubátor

Heraeus, Německo

Termocykler

Techne, UK

Elektroforéza

Bio-rad, USA

ELISA reader	Bio-rad, USA
Spektrofotometr	Pay Unicam, USA
Sestava na analýzu elektroforetických gelů GelDoc	Bio-rad, USA
Mixér	ETA, ČR
Centrifuga	Sigma, Německo
Ultra centrifuga Spinco	Beckman
Lednice -70 °C	Heareus
Chladnička	Calex

8.3. Rostlinný materiál:

Nicotiana tabacum L., cv. Petit Havana,
SR1

Nicotiana tabacum L., cv. Samson

Nicotiana benthamiana

Nicotiana benthamiana HC-Pro

Nicotiana rustica

Chenopodium amaranticolor

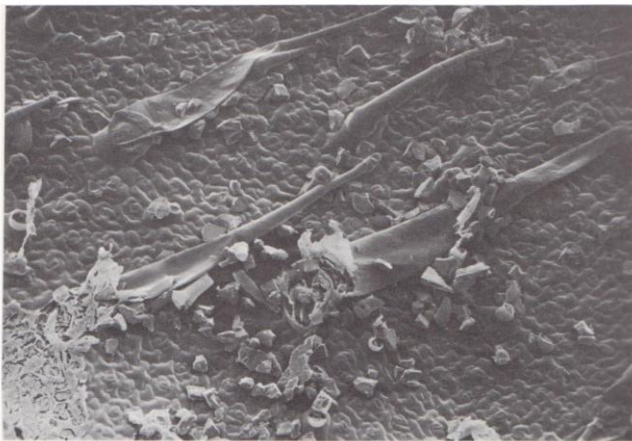
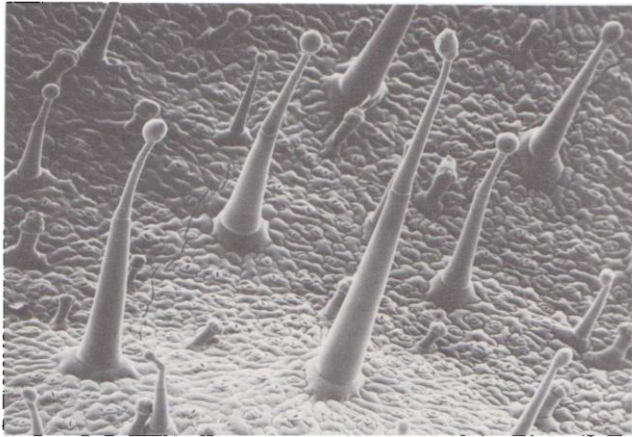
9. Metody

9.1. Pěstování hostitelských rostlin

Všechny pokusné rostliny jsem pěstovala v období od února do června (roku 2010). Po vysetí jsem výsev umístila v místnosti s teplotou 24 °C a umělým osvětlením s 16tihodinovou periodou. Vždy po 1-2 týdnech jsem rozsazovala sazenice a po dalších 2 týdnech (nebo jak rostliny vyžadovaly) jsem je opět přesazovala do půdy smíchané s pískem. Po přesazení a během infikace jsem rostliny umísťovala do Klimaboxů s nastavitelnou teplotou a světlem (Perioda: 27 °C 14 hodin a 22 °C 10 hodin), nebo do skleníků, což se ovšem v zimních a jarních měsících ukázalo nevhodné kvůli nestabilním teplotám. Po zhruba třech týdnech od přesazení byly rostliny připraveny k použití.

9.2. Očkování rostlin a infikace virem

Očkování, nebo též nakažení virem, by mělo ideálně probíhat na rostlině s dostatečně vyvinutými listy, což u tabáků znamená od 4cm délky listů a 10cm výšky rostliny. Různé druhy tabáku jsou vhodnými hostitelskými rostlinami používanými v laboratořích právě pro své rozměrné listy. Velikost listů usnadňuje inokulaci. Používání hmyzích přenašečů v laboratoři je zbytečně složité, proto se používá na porušení buněčné stěny karborundový prášek. Po porušení povrchu listu se nanáší virus, v mém případě byl v podobě rozdrcených listů z prokazatelně nakažené rostliny, které jsem smíchala s přenosovým pufrům ($0,057M K_2HPO_4$) (též se může použít přímo purifikát viru). Očkují se spodní velké listy, aby se dala sledovat případná systémové infekce. Po zhruba patnácti minutách je dobré omýt listy vodou, aby se zbavily karborundového prášku a mohly dýchat a zotavovat se. K největší koncentraci viru PVX v rostlině dochází do desátého dne od očkování. Je vhodné opticky kontrolovat příznaky, protože po určité době koncentrace virů opět klesá. Důležité je poznamenat, že nikdy nemůže u rostlin stejného druhu dojít k totožné koncentraci virů, protože na pomnožení virů působí mnoho faktorů. Může to být stupeň poškození listů při očkování, prudké změny teploty, výška teploty či množství zavlažování.



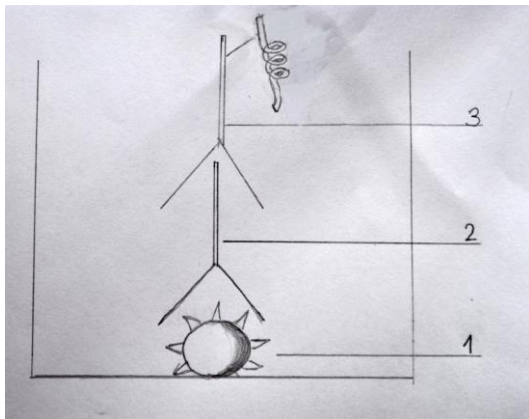
Obr. 10 (*M. J. W. Webb in Matthews, 1991*)

Obr. 10. Mikroskopický snímek pokožky *Nicotiana glutinosa* před mechanickou inokulací a po ní.

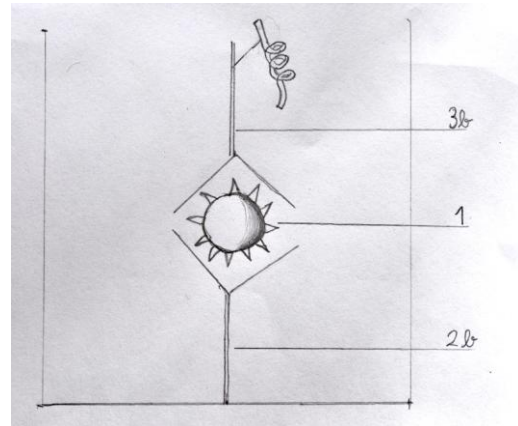
9.3. ELISA (enzymová imunoanalýza – Enzyme-linked immunosorbent assay)

Metoda, která pomocí barevné reakce enzymu a substrátu určuje relativní koncentraci virů, nebo libovolného antigenu ve vzorku. Při práci s viry se využívá jako kontrolní test.

Existuje více způsobů metody ELISA, které jsou postavené na stejném principu, ale liší se uspořádáním. Mezi ně patří například PTA ELISA (plate trapped antigen; nepřímá metoda) a DAS ELISA (double antibody sandwich; přímá nebo též sendvičová).



Obr. 11a (autor)



Obr. 11b (autor)

Obr. 11a - schéma PTA ELISA, Obr. 11b - schéma DAS ELISA

1- antigen, 2- specifická králičí protilátka generovaná proti použitému antigenu, 2b- specifická králičí protilátka generovaná proti použitému antigenu navázaná na povrch destičky, 3- konjugát antikráličí protilátky s enzymem, 3b- konjugát navázaný na antigen

Pro své potřeby jsem si vybrala PTA ELISu (antigen se naváže přímo na mikrotitrační destičku), ELISA určuje kapsidový protein (CP), který je součástí viru. Ten je označen protilátkou získanou z králíka (gamma globulinem z krve). Nejprve se vzorek (např. extrakt z infikovaného listu) inkubuje dvanáct hodin v jamkách mikrotitrační destičky, kdy se na její povrch se naváží proteiny a tudíž i viry (CP). V další části se imunoglobulin z králíka, specifický pro daný antigen, naváže na CP viru, čímž ho označí. V dalším kroku nanese se sekundární protilátka antikráličí s navázaným enzymem (konjugát). Ten se naváže na králičí protilátku (viz obrázek 1a). Po nanesení substrátu dochází k reakci s enzymem (alkalická fosfatáza; AP). Reakce je enzymově katalyzovaná, dochází při ní k odštěpení fosfátu ze substrátu a ke změně barvy chromogenního substrátu (žlutý p-nitrofenol). Koncentrace produktu se určuje spektrofotometricky [14,6].

Složení roztoků (pufrů), které jsem k testu použila:

1.) PBS-základní (pH 7,4)
 Do 1l H₂O
 8,0g NaCl
 2,9g Na₂HPO₄ x 12 H₂O
 0,2g KH₂ x PO₄
 0,2g NaN₃
 0,2g KCl

2.) PBS+T (Tween) (pH 7,4)
 Vymývací roztok
 PBS+ 0,05% Tween 20
 Do 1l PBS přidáme
 0,5 ml Tween 20
 0,2% OVO (bílek)

3.) Potahovací (Karbonátový) (pH 9,6)
do 1l H₂O
1,59g Na₂CO₃
2,93g NaHCO₃
0,2g NaN₃

4.) Konjugační pufr (pH 7,4)
do 1l PBS+T
20g PVP
2g OVO

5.) Substrátový pufr (pH 9,8)
1l HCl
800 ml H₂O
97 ml diethanolamin
0,75 mg /ml p-nitrofenylfosfát

Postup:

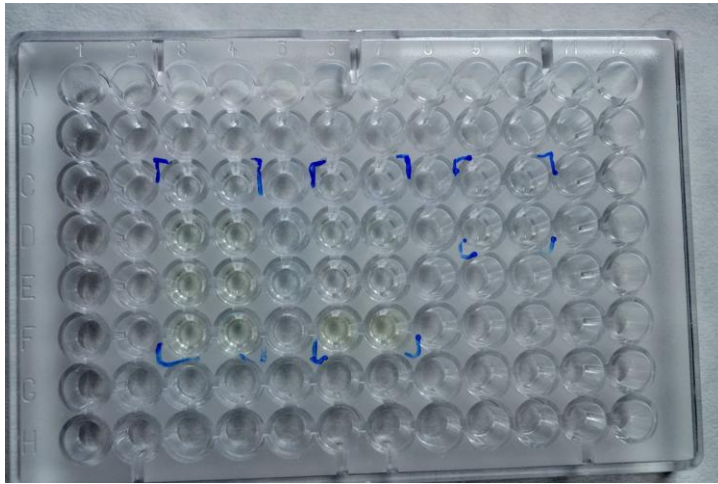
Směsné vzorky listů hostitelských rostlin jsem sklídila osmý den po očkování. Pro objektivnější výsledky byly od každého druhu tabáku sesbírány listy z více jedinců. Zvláště jsem sesbírala horní a dolní listy *Chenopodia amaranticolor*. Také jsem oddělila listy rostliny *Nicotiana benthamiana* HC-Pro, která se zdála bez výrazných příznaků od listů N.b-HC-Pro s jasnými příznaky. Várka rostlin s méně příznaky byla vysazena dříve, tudíž byly rostliny starší. Zároveň byly i méně vitální a dosahovaly menšího vzrůstu kvůli podmínkám, v kterých vyrůstaly. Pro kontrolu jsem odebrala vzorek i ze zdravé rostliny N.b.-HC-Pro.

Listy jsem zředila desetkrát potahovacím pufrům a roztřela je v třecí misce do homogenní hmoty. Následně jsem homogenát přefiltrovala přes sítko a napipetovala do jamek po 100 µl. Každý ze vzorků jsem aplikovala do dvou jamek, aby se odhalily případné chyby při pipetování. Poté jsem inkubovala destičku do rána ve 4°C (15:35-8:30h).

Následně jsem obsah jamek vylila (vyklepla) a jamky čtyřikrát promyla 200 µl PBS+Tween. Králičí protilátku proti PVX jsem zředila 1:1000 konjugačním pufrům tak, aby směsi bylo dostatečné množství, to znamená 2,5µl protilátky ku 2,5ml pufru. Směs jsem napipetovala po 100 µl do jamky a na dvě hodiny nechala ve 37°C (8:50-10:50h)

Znovu jsem jamky mikrotitrační destičky promyla 200 µl PBS+T. Antikráličí protilátku s AP jsem zředila 1: 30 000 konjugačním pufrům. Nanesla jsem 100 µl do jamky a nechala 2,5 hodiny inkubovat ve 37°C (11:13-13:43).

Následně jsem desku čtyřikrát promyla PBS+T. Smíchala jsem 5 mg p-nitrophenylfosfátu s 5 ml substrátového pufru. Napipetovala jsem 100 µl substrátu do každé jamky a nechala reagovat při 37°C.



Obr.12 (Autor)

Obr.12 - Destička pro ELISA test s probíhající reakcí (žlutá barva)

9.4. Purifikace PVX

Purifikace neboli čištění je metoda, při které se snažíme oddělit PVX od ostatních složek rostlinného materiálu. Využíváme při tom centrifugace a to jak diferenciální, tak zonální. Purifikaci virů využíváme, chceme-li získat čistý virus a následně ho dále používat (např. k dalšímu očkování rostlin atd.) nebo chceme-li zjistit koncentraci či množství viru v rostlinném materiálu, z kterého purifikaci provádíme.

Princip separace při centrifugaci je pohyb částic v tekutém prostředí pod vlivem odstředivého pole, které vzniká otáčením rotoru centrifugy. Částice se chovají dle svých fyzikálních vlastností a povahy prostředí. Diferenciální centrifugace se využívá, pokud máme v homogenním roztoku částice o různých velikostech či hmotnostech. Tyto složky směsi pak sedimentují různou rychlostí a my je můžeme postupně separovat. Zonální centrifugace se využívá, jsou-li částice podobné hustoty, hmotnosti a velikosti a tudíž by sedimentovaly podobně. U zonální centrifugace využijeme hustoty roztoku zvyšující se směrem ke dnu zkumavky. Tento roztok nazýváme gradientní a bývá připravován z glycerolu či sacharózy. V tomto roztoku pak složky směsi sedimentují postupně v oddělených zónách [13].

Postup:

Sedm dní po očkování viru PVX jsem z rostlinek *N.benthamiana* (podle výsledku metody ELISA) odebrala 25 g listů a uložila je při teplotě -70°C . Zda byla infekce úspěšná, jsem prověřila metodou ELISA.

Purifikace má několik kroků. Po každém kroku jsem odebírala malý vzorek produktu pro ELISA test, aby se při případné neúspěšné purifikaci dalo zjistit, v jaké fázi purifikace došlo k chybě.

Nejprve jsem provedla homogenizaci. Odebraných 25 g listů jsem smíchala s 50 ml 20mM Tris-HCl (pH 7,5) a homogenizovala v mixéru. Tuto směs jsem vylišovala a přefiltrovala přes sílon.

Směs jsem rozdělila do kyvet a nechala 10 minut centrifugovat (centrifuga Sigma) při 10 000 otáčkách za sekundu. Odebrala jsem supernatant, který je v tuto chvíli produktem, a sediment složený z pletiv rostliny jsem zlikvidovala.

Supernatant jsem následně napipetovala na sacharózový polštář (zonální centrifugace), který byl vytvořen z 5 ml 30% sacharózy v Tris-HCl. Takto připravené zkumavky jsem nechala centrifugovat (Ultra centrifuga Spinco) při 27 000 otáčkách za sekundu po dobu 2h30min v rotoru Ti50.2. Přes sacharózový polštář projdou za těchto podmínek jen viry a některá rostlinná barviva, která se dají dále odstranit.

Po tomto čase jsem pomocí injekce separovala sediment. Odebrala jsem si vzorky i z ostatních částí (supernatantu a sacharózového polštáře) pro ELISA test. Pokud test ukáže, že v těchto složkách je vysoká koncentrace virů, znamená to, že čas pro centrifugaci byl nedostatečný, a pokud purifikát nebude vyhovovat, může se provést další purifikace s delším časovým úsekem v tomto kroku.

Sediment jsem rozpustila ve 4 ml Tris pufru za stálého míchání po dobu 30 minut. Protože jsou viry citlivé na teplo, byla nádoba po celou dobu chlazená ledem.

Pro větší čistotu jsem purifikát opět nechala projít desetiminutovým cyklem centrifugace při 10 000 otáčkách. Výsledný produkt je purifikát PVX. Vzorek purifikátu jsem proměřila spektrofotometrem.

9.5. Reverzní (zpětná) transkripce (RT)

Při tomto procesu dochází k přepisu RNA do DNA. Většina rostlinných virů má ribonukleovou kyselinu, a proto je tato metoda běžná. DNA je stabilnější než RNA.

Při reverzní transkripci se nejprve na konec RNA vlákna napojí primer, což je uměle vyrobené krátké vlákno DNA o dvou až třech desítkách bází (oligonukleotid), které přesně kopíruje jeden z konců RNA. Od tohoto konce pak postupuje reakce, tu katalyzuje reverzní transkriptáza. Reakce probíhá v termocykleru, který mění vhodné teploty pro RT po určené době. Proti naštěpení RNA působí inhibitor RNAsy [13,14].

Postup:

Použila jsem listy zmrazené na -70°C , které jsem si uložila po provedení ELISy v první části této práce, z rostlin N.b.HC-Pro a N.b. Nejprve jsem infikované vzorky N.b.HC-Pro a N.b. zředila 1:10 potahovacím pufrem. Směs jsem pročistila filtrací přes silon, a pak napipetovala do eppendorfek. Přes noc se na jejich povrch navázaly viry PVX. Podobně jako při ELISA testu jsem je vymyla.

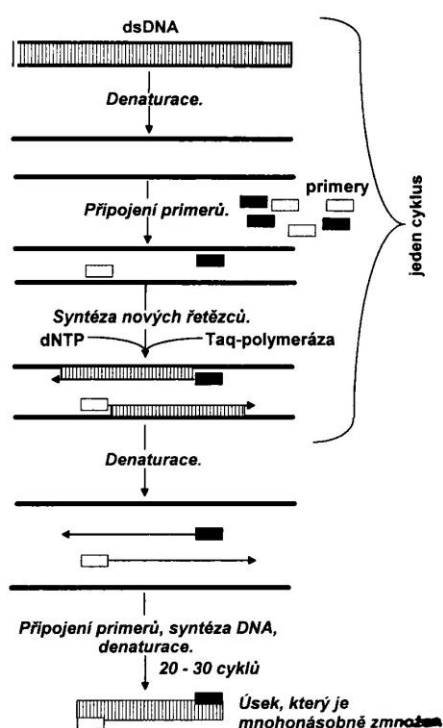
Postup RT má čtyři části, zde je popsáno množství pro celkový objem reakce 20 μl .

- 1) Do reakce jsem přidala 1 μl PVX primeru, 1 μl 10mM dNTP (nukleotidy), 10 μl vody. Veškerá tato manipulace byla prováděna v chladu (obložení ledem). Pak jsem eppendorfky inkubovala v termocykleru 5 min při 65°C .
- 2) Do každé z mikrozkušavek jsem přidala 4 μl 5xFirst-Strand Buffer, což je pufr vyrobený dodavatelem enzymu a tvoří pro tento enzym vyhovující prostředí, dále pak 2 μl 0,1mM DTT (dithiothreitol) a 1 μl RNasin (inhibitor RNasy) proti rozpadu RNA. Reakce byla následně inkubována 2 minuty při 42°C .
- 3) Na závěr jsem přidala 1 μl enzymu M-MLV od firmy Promega (reverzní transkriptáza) a nechala směs reagovat po dobu 50 minut při teplotě 42°C .
- 4) Po této době jsem enzym inaktivovala zvýšením teploty inkubace na 70°C po dobu 15 minut a tím ukončila reakci.

9.6. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

PCR se používá k namnožení DNA. Objevitelem je Kary Mullis [7]. Reakce připomíná reverzní transkripci. Nejprve dojde vlivem vysoké teploty k rozdělení vláken dvoušroubovice DNA (denaturace). Denaturace začíná na několika místech šroubovice, mezery se rozšiřují, dokud nejsou vlákna oddělena. V dalším kroku, pro který se musí snížit teplota, se kompatibilně navážou na opačné konce vláken vodíkovými vazbami primery. Od nich poté postupuje polymerizační reakce ve směru $5' \rightarrow 3'$, při níž se napojují nové nukleotidy, až je dohotovené nové vlákno a s ním i nová šroubovice. Pro tento krok se opět zvýší teplota. Cyklus se stále opakuje. Počet nových vláken DNA stoupá exponenciální řadou. Z 30 cyklů je teoreticky možné připravit dva na třicátou násobku původního vzorku, v praxi se tato hodnota pohybuje kolem deseti na osmou – efektivita není v praxi stoprocentní. Pro tento proces se používá termostabilní polymeráza, která vydrží vysoké teploty při denaturaci. Většinou se získává

z termofilních organismů. Často se používá Taq-polymeráza izolovaná z bakterie *Thermus aquaticus*, v poslední době jsou však dostupné méně chybové polymerasy *Vent*-polymerasa či *Pfu*-polymerasa. V pufru, který by měl utvářet vhodné prostředí pro reakci a pro polymerasu, je obsažen hořčík a různé soli. Množství vody pro reakci se dopočítává do předem určeného objemu. Teploty pro nasedání primerů se dají přesně vypočítat. Pro každou dvojnou vazbu (vodíkové můstky mezi A-T) se počítají 2°C a pro každou trojnou vazbu (G-C) se počítají 4°C. Tento zjednodušený způsob výpočtu lze však použít pouze pro primery s délkou do 20 nukleotidů, pro delší primery se používají vzorce složitější [7,13].



Obr. 653
Polymerázová řetězová reakce

Obr.13 (Rosypal, S.)

Obr.13-schéma PCR

Postup:

Do eppendorfkky (mikrozkumavky) jsem napipetovala 35,6 μl H_2O , 10 μl pufru 5x (5X Green GoTaq™ Reaction Buffer), 1 μl dNTP (10mM) (Fermentas #R0192), 1 μl primeru PVX 3, 1 μl primeru PVX 5, 0,4 μl 60 Taq polymerasy (Promega M3171 DNA polymerase) a 1 μl DNA templátu získaného z reverzní transkripce.

Směs jsem přesunula do termocykleru a nastavila následující podmínky PCR: První 2 minuty při 95°C, následoval cyklus o třech krocích opakující se třicetkrát: 30 s 95°C, 30 s 56°C a 1 minuta 72°C, na závěr jsem nechala působit teplotu 72°C po dobu 10 minut a pak reakci ochladila na 4°C.

9.7. Gelová elektroforéza

Elektroforéza je jedna ze separačních technik. Gelem jako sítím prochází nabitě molekuly směrem k anodě (kladná elektroda). Čím jsou tyto molekuly větší, tím pomaleji procházejí složitou síťovou strukturou gelu. Gel je většinou z agarózy nebo polyakrylamidu. Průchodnost gelu můžeme ovlivnit složením. U nukleových kyselin jsou nosičem záporného náboje záporné fosfátové skupiny.

Tímto způsobem můžeme od sebe oddělit různě velké molekuly DNA, zjistit, zda je produkt, který chceme, něčím znečištěn, nebo mají-li všechny nukleotidová vlákna stejnou délku. Můžeme zjistit, jaká ta délka je, pokud subjekt porovnáme s nukleovou kyselinou, u které je její délka známa (tzv. DNA marker). K určení polohy molekul, které nemůžeme vidět a rozeznat od okolí, se používá barvivo (např. etidiumbromid). To utvoří s molekulou komplex a po ozáření ultrafialovým světlem můžeme pozorovat barevné proužky v místech, kde jsou molekuly nashromážděné [13,14].

Produkt PCR jsem nechala rozdělit v 0,8% agarozovém gelu při 100V 30 minut. Kromě něho jsem do gelu přidala i vzorky o 300 a 500 párech bází pro srovnání (DNA marker).

10. Výsledky

10.1. Část první: Infikace rostlin virem PVX

Stav rostlin a případné příznaky jsou viditelné na fotografiích, které byly pořízeny sedmý den po mechanické inokulaci. Typická systémová infekce se vyvinula u *N.benthamiana* a u druhé, mladší várky transgenních *N.benthamiana*-HCPro. Nové mladé listy, které vyrůstají z horní části rostliny, jsou zkrabatělé, barevně nevyrovnané a tvoří se na nich hrbolky. Naproti tomu *Chenopodium amaranticolor* má silné příznaky v podobě červené barvy a lézí na spodních listech, které byly očkovány, ale už je nenajdeme na vyšších nebo nových listech. U ostatních testovaných rostlin nejsou příznaky příliš znatelné (Obr. 14). To, zda v nich došlo k pomnožení PVX, prokázal ELISA test.

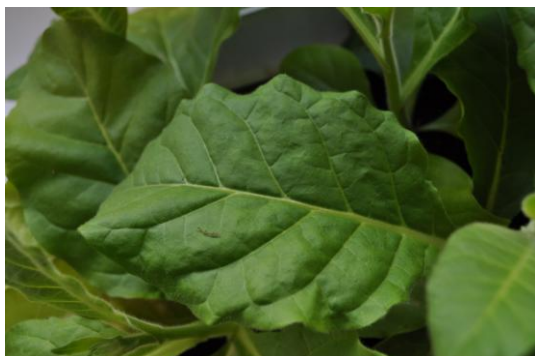
Po půl hodině od přidání substrátu ELISA testu jsem pozorovala první žloutnutí u jamek se vzorky *N.benthamiany* a transgenní *N.benthamiany*-HC-Pro. Po 1 hodině jsem destičku vložila do ELISA reader (MRX- epon 1x-300). ELISA reader je spektrofotometr, který odečítá hodnoty absorbance při 405nm, což je maximální vlnová délka pro konkrétní žlutou barvu, která vzniká při reakci. Přístroj naměřil tyto hodnoty:

Výsledky po 1 h: (vždy průměr dvou jamek)

Blank (kontrolní čistý pufr)	0,086
<i>N.t. Petit Havana, cv.SR1</i>	0,080
<i>N.t.Samsun</i>	0,081
Zdravá kontrolní <i>N.b</i> -HC-Pro	0,084
<i>Ch.amar.</i> -horní listy	0,085
<i>N.rustica</i>	0,134
<i>Ch.amar.</i> -dolní listy	0,187
<i>N.b</i> .HC-Pro s viditelnými příznaky (mladší)	0,236
<i>N.b</i> .HC-Pro bez výrazných příznaků (starší)	0,240
<i>N.benthamiana</i>	0,310

Průměrná nepřesnost v pipetování mezi jamkami je 0,0095

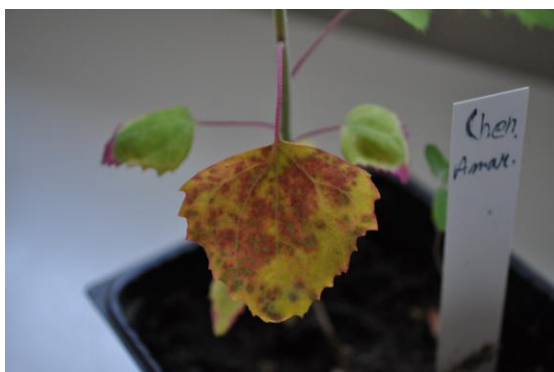
Úspěšně infikovat se podařilo *Chenopodium amaranticolor*, obě várky *N.b.*-HC-Pro, *Nicotiana rustica*, s mimořádnou hodnotou *Nicotiana benthamiana*. Výsledky ELISA rovněž ukazují, že v horních listech *Chenopodia amaranticolor* je výrazně menší koncentrace virů, než v jejích spodních listech, které byly přímo očkovány.



Obr.14a (Autor)



Obr.14b (Autor)



Obr.14c (Autor)



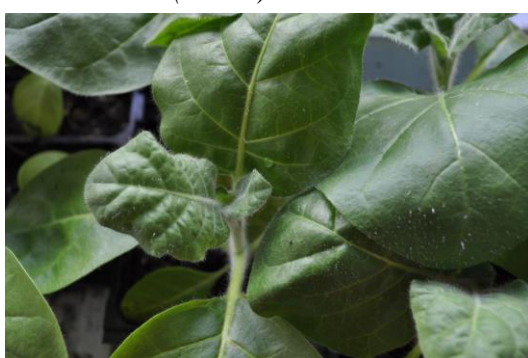
Obr.14d (Autor)



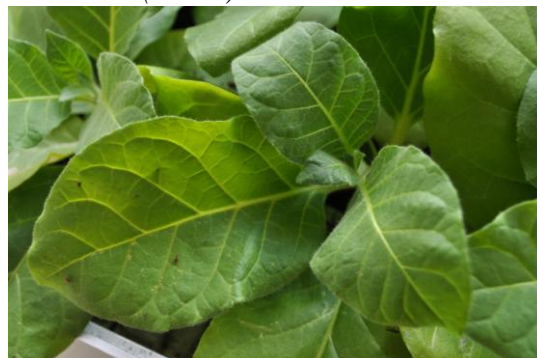
Obr.14e (Autor)



Obr.14f (Autor)



Obr.14g (Autor)



Obr.14h (Autor)

Obr.14a-h-Příznaky na rostlinách očkovaných PVX sedmý den po inokulaci.

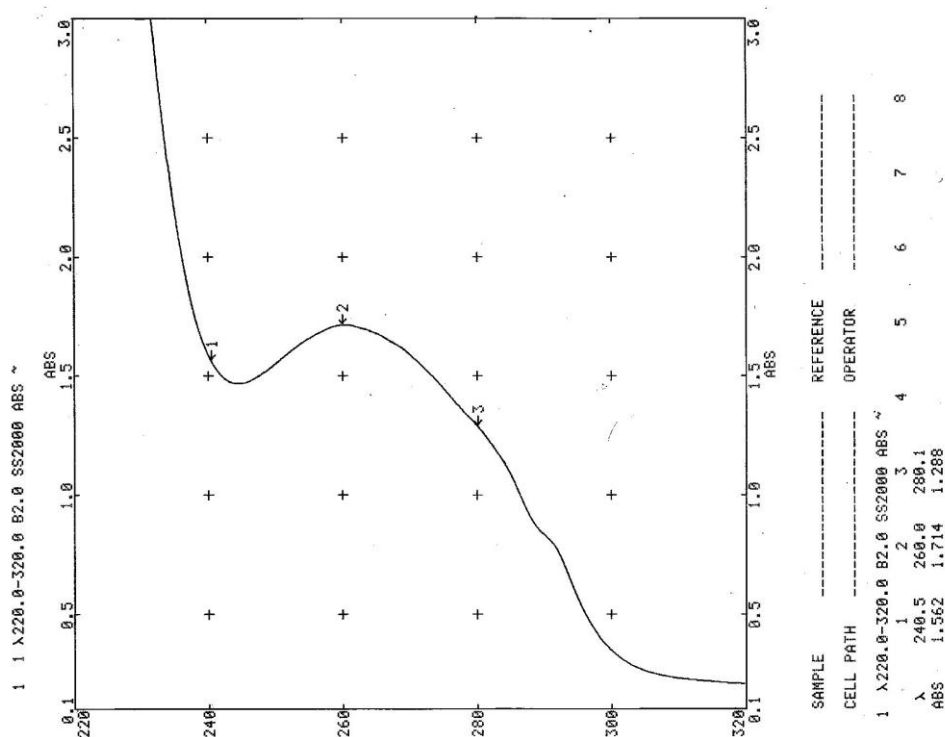
Obr.14a- *Nicotiana tabacum* L., cv. Petit Havana, SR1, Obr.14b- *Nicotiana benthamiana*, Obr.14c- *Chenopodium amaranticolor*- inokulovaný spodní list, Obr.14d- *Chenopodium amaranticolor* vrchní listy s již rozšířenou infekcí, Obr.14e- *Nicotiana benthamiana* HC-Pro starší, Obr.14f- *Nicotiana*

benthamiana HC-Pro mladší a vitálnější, Obr.14g-*Nicotiana rustica*, Obr.14h-*Nicotiana tabacum* L., cv Samsun

10.2. Část druhá: Purifikace PVX

Metodou ELISA jsem zkontrolovala, zda pracuji s úspěšně infikovaným materiálem. Čistý pufr měl hodnotu absorbance 0,14 a první jamka infikované *N.benthamiana* měla hodnotu 2,67 druhá pak 2,61. Z rozdílu hodnot pro blank a pro rostliny mohu vyvodit, že byly rostliny skutečně úspěšně infikované.

Po zonální centrifugaci se utvořil nahnědlý gelový sediment pod sacharózou. Jeho velikost byla o průměru zhruba jednoho centimetru v obou zkumavkách. Hnědá barva naznačovala přítomnost rostlinných barviv, proto jsem také přidala třetí, desetiminutový cyklus centrifugace. Výsledek, který poskytl spektrofotometr, je na obrázku.



Obr.15 (Autor)

Obr.15-Graf pro purifikát PVX z *Nicotiana benthamiana* (17.6.2010)

Z grafu pro purifikát PVX můžeme usuzovat na množství vypurifikovaných kompletních virů i těch, které byly nějak poškozeny (v purifikátu mohou být jak kompletní viry, tak samotné nukleové kyseliny nebo naopak prázdné kapsidy). Na ose Y čteme množství absorbance a na ose X vlnovou délku světla. Bod označený 2 je místo pro částice, které absorbují při 260 nm, což je maximální absorpce nukleových

kyselin, osa Y pro tento bod udává hodnotu 1,714. Bod 1 a 3 je určen pro částice absorbující při 240 nm a 280 nm, přičemž proteiny absorbují při 280nm, kde je absorpční maximum pro aromatické aminokyseliny. Z hodnoty Y můžeme pomocí Lambert-Beerova zákona ($A=\epsilon \times c \times l$) vypočítat, jaký výtěžek jsme získali z purifikace; hodnotu 1,714 vynásobíme množstvím původního vzorku pro purifikaci v gramech (25g) a vydělíme extinkčním koeficientem (ten je pro PVX dán jako 2,97). Z tohoto výpočtu jsem zjistila, že jsem získala 14mg/ml PVX, a tudíž z celé purifikace 57,7 mg tohoto rostlinného viru. Poměr A260/A280 je 1,330 a ukazuje kvalitu výsledného purifikátu, přičemž ideální je když se pohybuje kolem hodnoty 1,0. Vzorky, které jsem v průběhu procesu odebírala, jsem použila ke kontrolnímu ELISA testu:

Kontrolní ELISA: (IgG:PVX 1:1000 konjugačního pufru; Konjugát: antikráličí 1:30 000 konjugačního pufru) Průměr dvou jamek.

Potahovací pufr (kontrolní)	0,093
Vzorek z homogenátu	0,707
Supernatant po první centrifugaci	0,650
Supernatant po druhé centrifugaci	0,102
Sacharóza po druhé centrifugaci	0,229
Sediment (purifikát) po druhé centrifugaci	0,223

Hodnoty pro množství viru v testu ukazují vysokou koncentraci pro vzorek z původních listů a supernatant z první centrifugace, tak jak by tomu mělo být. Další dvě hodnoty potvrzují, že čas pro druhou centrifugaci byl téměř dostačující. Zdá se, že ne všechny viry prošly sacharózovým polštářem. Hodnota pro purifikát je nízká, přestože graf z purifikace ukazuje opak. Vzorek (purifikát), který jsem použila pro test, nebyl nijak zředěn a koncentrace virů v něm byla tak vysoká, že byla reakce předimenzovaná. Když jsem vzorek zředila potahovacím pufrem, dostala jsem následující hodnoty, které dokazují přítomnost PVX viru v purifikátu:

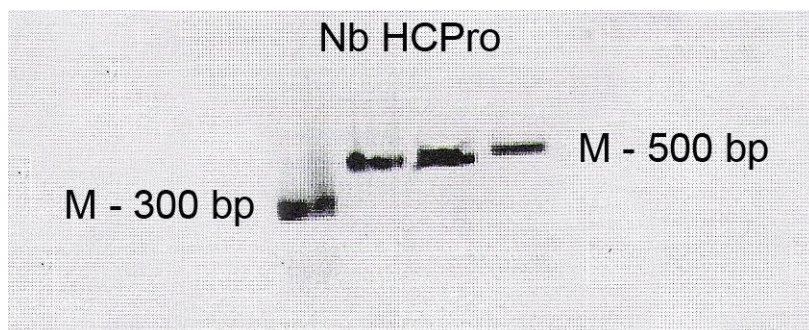
2. ELISA:

Potahovací pufr (kontrola)	0,100
Purifikát PVX zředěn 100 μ l/ml	0,462
Purifikát PVX zředěn 10 μ l/ml	0,402
Purifikát PVX zředěn 1 μ l/ml	0,165

10.3. Část třetí: PCR

Zda proběhla RT-PCR a PCR v pořádku, můžeme zjistit až po provedení elektroforézy. Fragменты DNA obarvené ethidiumbromidem byly zviditelněny pod UV světlem. Snímek byl pořízen sestavou na analýzu elektroforetických gelů GelDoc.

Vzorky PVX z *N.benthamiana* a *N.b.-HC-Pro* mají stejnou velikost. Ta je téměř stejná, možná mírně nižší, než v jaké se nachází molekuly s 500bp. To odpovídá délce molekul PVX tvořené PVX3' a PVX5' primerem. Pokud bych chtěla syntetizovat celý řetězec PVX, musela bych jednotlivé části syntetizovat postupně a pak je pospojovat. Nad touto linií ani pod ní se nevyskytuje žádná další příměš.



Obr.16 (Autor)

Obr.16 - výsledek elektroforézy, zleva doprava: marker s délkou 300bp, vzorek získaný z infikovaných rostlin *N.benthamiana*, vzorek získaný z infikovaných rostlin *N.b.-HC-Pro*, marker s délkou 500bp

11. Závěr

Rostlinné viry jsou vnitrobuněční parazité a jejich životní cyklus je proto podobný všem obdobným organismům či částicím (virům). Přesto mají rodiny rostlinných virů vzájemně odlišnou expresi, která je určována jejich morfologií, respektive druhem nukleové kyseliny (viz kapitoly 2 a 3).

Rostlinné viry mohou rostlinám působit závažná onemocnění, která mohou vést ke smrti organismu (viz kapitola 4). Pokud je daný druh rostliny náchylný k určitému viru a nevlastní proti němu obranné mechanismy a geny rezistence, pak je jedinou možnou ochranou, kterou umíme poskytnout, genetická modifikace. Tyto úpravy nemusí být nijak drastické, buď jsou transgeny odvozeny z patogena, nebo jsou inspirovány jinými (zejména živočišnými) obrannými mechanismy (viz kapitola 5).

Nejčastější využití virů spočívá ve výrobě biologicky aktivních látek v rostlinách pomocí expresního vektoru (viz kapitola 5).

X virus bramboru je typový zástupce potexvirů, má jednovláknovou pozitivní RNA a kapsidový obal s helikální symetrií (viz kapitola 6).

Z výsledků ELISA jsem zjistila, že nejnáchylnějšími druhy na PVX mezi vybranými hostiteli jsou *Nicotiana benthamiana* a *Nicotiana benthamiana* HC-Pro. Podle výsledků můžu odvodit, že optické příznaky nemusí korespondovat s reálnou koncentrací viru v rostlině, jak je patrné u dvou várek *Nicotiana benthamiana* HC-Pro, které se lišily stářím a viditelnými příznaky. Výsledky ELISA ukazují, že množství virů je u obou várek podobné, a dokonce u rostlin s méně zřetelnými příznaky je o něco vyšší. U rostlin *Chenopodia amaranticolor* jsou hodnoty ELISA pro vrchní listy podobné jako hodnoty pro blanc (kontrolu). Můžu odvodit, že se do vrchních listů infekce nepřenesla a potvrdit tak známou skutečnost, že u tohoto druhu nedochází k systémové infekci.

Pomocí purifikace jsem zjistila, že koncentrace PVX v *Nicotiana benthamiana* byla 14 mg/ml. Poměr A280/A260, který ukazuje kvalitu purifikace (ideální hodnota 1), byl 1,3, což je přijatelné. Zvýšení kvality by mohlo nejspíš pomoci nechat centrifugaci probíhat déle. ELISA výsledky, odebírané během purifikace, ukazují, že některé virové částice nestihly projít přes sacharózový polštář.

Podle výsledků z gelové elektroforézy můžu vyvodit, že se mi úspěšně podařilo získat z rostlin *Nicotiana benthamiana* a *Nicotiana benthamiana* HC-Pro X virus bramboru, převést jeho nukleovou kyselinu z RNA do DNA, která je stabilnější, a také tento vzorek zmnožit (viz kapitola 10).

Další možnost výzkumu bych směřovala k rozšíření okruhu zkoumaných hostitelů. Zaměřila bych se na příbuzné rody. Sledovala bych, jakým způsobem se bude měnit síla infekce, budu-li měnit stáří rostliny při inokulaci a podmínky, ve kterých vyrůstá (stabilní, nehostinné atd.). Na těchto rostlinách bych dále zkoumala rezistenci na různé odnože PVX. Pokud bych znala jejich genom (sekvenování), respektive odlišnosti v genomu, mohla bych zjistit, které konkrétní geny způsobují větší náchylnost rostlin vůči viru, případně zda tyto odlišnosti nemají na expresi a šíření viru žádný vliv.

12. Použité zkratky

- AP – alkalická fosfatáza (alkaline phosphatase)
- A-T-G-C – adenin, thymin, guanin, cytosin
- CP – kapsidový protein (coat protein)
- DAS ELISA – double antibody sandwich enzyme linked immuno-sorbent assay
- DNA – deoxyribonukleová kyselina
- dNTP – nukleotidy pro deoxyribonukleovou kyselinu (deoxyribonucleotide triphosphate)
- dsDNA – dvouřetězcovitá deoxyribonukleová kyselina
- dsRNA – dvouřetězcovitá ribonukleová kyselina (double-stranded)
- ELISA – Enzymová imunoanalýza (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)
- HC-Pro – potyvirový protein PC-Pro
- mRN – A- mediátorová ribonukleová kyselina
- ORF – otevřený čtecí rámeček (open reading frame)
- PCR – Polymerázová řetězová reakce (Polymerase chain Reaction)
- PR – pathogenesis related proteins
- PTA ELISA – plate trapped antigen enzyme linked immuno-sorbent assay
- PTGS – post-transkripční genové ztláčení (post-transcriptional gene silencing)
- PVX – X virus bramboru (Potato virus X)
- RISC – RNA-induced silencing complex
- RNA – ribonukleová kyselina
- RT – reverzní transkripce (reverse transcription)
- scFV – jednovláknové řetězce hypervariabilních domén lehkého a těžkého řetězce
- siRNA – small interfering RNA
- (+/-)ssDNA – jednořetězcovitá deoxyribonukleová kyselina pozitivního/negativního smyslu
- (+/-)ssRNA – jednořetězcovitá ribonukleová kyselina pozitivního/negativního smyslu (single-stranded)
- Taq polymerasa – polymerasa z *Thermus aquaticus*
- TGBp – trojice pohybových proteinů (triple gene bloc proteins)
- TMV – virus mozaiky tabáku (Tobacco mosaic virus)
- Tris – tris(hydroxymethyl)aminomethan
- Vh – hypervariabilní doména těžkého řetězce

13. Seznam citovaných prací

[1] ČEŘOVSKÁ, Noemi, *Rostlinné viry*. Praha. Studijní materiály k přednáškám.

[2] ČEŘOVSKÁ, Noemi. *Biochemická a molekulárně biologická charakterizace rostlinných virů a jejich biotechnologické využití* [online]. Olomouc : Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i., Praha, 2010. 33 s. Habilitační práce. Univerzita palackého v Olomouci, přírodovědecká fakulta. Dostupné z WWW: <http://www.upol.cz/fileadmin/user_upload/PrF-dokumenty/Vedecka_rada/Habilitace_a_profesury/ukon_hab_prof/Cerovska_Noemi/Habilitacni_prace_NCerovska-cast1.pdf>.

[3] CHALUPOVÁ - KARLOVSKÁ, Vlastimila . *Obecná biologie : evoluce, biologie buňky, genetika*. vyd. 1. Olomouc : Nakladatelství Olomouc, s. r. o., 2004. Organizmy nebuněčné, s. 40-48. ISBN 80-7182-174-8.

[4] *Handbook of Plant virus infections Comparative diagnosis*. Eduard Kurstak. The Netherlands : Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1981. Potexviruses, s. 627-693. ISBN 0-444-80309-2.

[5] HOFFMEISTEROVÁ, Hana. *Expres heterologních proteinů v rostlinách*. Praha, 2009. 34 s. Rigorózní práce. Česká zemědělská univerzita v Praze, fakulta agrobiologie.

[6] MATTHEWS, R.E.F. *Plant Virology*. Third Edition. USA : Academic press, INC., 1991. 835 s. ISBN 0-12-480553-1.

[7] McMURRY, John. *Organická chemie*. Czech edition. Brno : Vysoké učení technické v Brně, nakladatelství VUTIUM, 2007. Polymerasová řetězová reakce, s. 1086. ISBN 978-80-7080-637-1.

[8] NEČAS, Oldřich , et al. *Biologie : učebnice pro lékařské fakulty*. 2. přepracované a rozšířené vydání. Praha : Avicenum, zdravotnické nakladatelství, 1989. Biologie virů, s. 281-306. ISBN 08-017-89.

- [9] ROSYPAL, Stanislav: *Bakteriologie a virologie*. vyd. 1. Praha : Scientia, s.r.o., 1994. 67 s. ISBN 80-85827-16-6.
- [10] ROSYPAL, Stanislav, et al. *Přehled biologie*. vyd.1. Praha : Státní pedagogické nakladatelství, n.p., 1987. Struktura nebuňčných forem živých soustav (virů) (J.Šmarda), s. 64-92. ISBN 14-170-87.
- [11] ROSYPAL, Stanislav, et al. *Přehled biologie*. vyd. 1. Praha : Státní pedagogické nakladatelství, n.p., 1987. Životní funkce virů (J.Šmarda), s. 206-215. ISBN 14-170-87.
- [12] ROSYPAL, Stanislav, et al. *Přehled biologie*. vyd.1. Praha : Státní pedagogické nakladatelství, n.p., 1987. Viry (J. Šmarda), s. 399-405. ISBN 14-170-87.
- [13] ROSYPAL, Stanislav. *Úvod do molekulární biologie 4*. 3. inovované vydání. Brno : Grafex, 2002. 300 s. ISBN 80-902562-4-4.
- [14] ŠALANSKÁ, Markéta. *Expres antigenů odvozených z lidského papillomaviru (HPV) v rostlinách : jedlé vakcíny*. Praha, 2009. 80 s. Diplomová práce. Univerzita Karlova, přírodovědná fakulta.
- [15] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 3. revidované vydání. Praha : Academia, 2003. 364 s. ISBN 80-200-1024-6.