

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor SOČ: 07 Zemědělství, potravinářství, lesní a vodní hospodářství

Identifikace dsRNA mykovirů ve fytopatogenní
houbě *Fusarium oxysporum*

Autor: Martin Mátl

Škola: Gymnázium, Brno, třída Kapitána Jaroše 14

Kraj: Jihomoravský

Vedoucí práce: Mgr. Gabriela Rotková, Ph.D.

Brno 2016

Prohlášení

Prohlašuji, že svou práci na téma „Identifikace dsRNA mykovirů ve fytopatogenní houbě *Fusarium oxysporum*“ jsem vypracoval samostatně pod vedením Mgr. Gabriely Rotkové, Ph.D., a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Dále prohlašuji, že tištěná i elektronická verze práce SOČ jsou shodné a nemám závažný důvod proti zpřístupňování této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a změně některých zákonů (autorský zákon) v platném znění.

V Brně dne 15. 4. 2016

Podpis:

Poděkování

Tato práce byla financována projektem Podpora výzkumu studentů směru mikrobiologie a molekulární biotechnologie (MUNI/A/1013/2015)

Chtěl bych poděkovat Mgr. Gabriele Rotkové, Ph.D. za užitečné rady a trpělivost v laboratoři i při formální úpravě práce. Díky ní jsem byl schopen poprvé na vlastní kůži vyzkoušet vše co patří ke vědě. Za to zůstanu vždy vděčný.

Moc děkuji Mgr. Janě Sítařové za pročitání a opravování mých rukopisů.

RNDr. Ivě Kubištové, Ph.D. také děkuji za připomínky k práci.

Velký dík patří Ing. Vendule Čermákové za pomoc při izolaci dsRNA metodou celulózy.

Děkuji Bc. Markétě Jaškové za pomoc a přátelskou atmosféru na oddělení mikrobiologie.

Anotace

Fusarium oxysporum je vřeckovýtrusá plíseň způsobující rostlinnou nemoc fusariové vadnutí na široké škále ekonomicky významných plodin. Mykoviry jsou obligátní parazité hub schopní své hostitele negativně ovlivnit. Některé mykoviry způsobují snížení virulence v jejich fytopatogenních houbových hostitelích, což slibuje uplatnění v oblasti biologické ochrany rostlin. V této práci byla detekována přítomnost dsRNA mykovirů v izolátech *Fusarium oxysporum*. Dvouvláknová RNA o velké molekulární hmotnosti se běžně v buňkách nevyskytuje, je tedy znakem virové infekce. Fenotypové charakteristiky dsRNA pozitivních a dsRNA negativních kmenů byly porovnány s cílem zjistit změny způsobené přítomností mykoviru, včetně testu virulence *F. oxysporum* na modelové rostlině *Arabidopsis thaliana*. Reverzně transkripční PCR byla virová genetická informace převedena do DNA a amplifikována pro molekulární analýzy.

Klíčová slova: mykovirus, dsRNA, *Fusarium oxysporum*, biokontrola, fusariové vadnutí

Annotation

Fusarium oxysporum is an ascomycete mold causing Fusarium wilt, a plant disease affecting a wide range of economically significant crops. Mycoviruses are obligate parasites of fungi capable of debilitating their fungal hosts. Some mycoviruses cause a decrease in virulence in their phytopathogenic fungal hosts. This could be used as a means of biological control of plants against fusarium wilt. In this thesis, dsRNA presence was detected in isolates of *Fusarium oxysporum*. High molecular weight double stranded RNA only occurs in cells as viral RNA, therefore it is a signal of virus infection. Phenotypic characteristics of dsRNA positive and dsRNA negative isolates were compared in order to determine the changes caused by the mycovirus, including a virulence test of *F. oxysporum* on model plant *Arabidopsis thaliana*. Reverse transcription PCR was used to convert the viral genetic information into DNA which was amplified for further molecular analyses.

Keywords: mycovirus, dsRNA, *Fusarium oxysporum*, biocontrol, fusarium wilt

Abstrakt

Mykoviry jsou obligátní parazité hub způsobující kryptické infekce nebo významná onemocnění. Většina z nich má genetickou informaci v podobě dsRNA nebo ssRNA s dsRNA replikativní formou. Jsou zkoumány pro možnost využití v boji proti fytopatogenním houbám decimujícím zemědělské plodiny. V této práci byly zkoumány mykoviry vřekovýtrusé plísně *Fusarium oxysporum*, která každoročně způsobuje značné škody na řadě zemědělských plodin. Prostřednictvím dvou nezávislých metod izolace dsRNA byla potvrzena přítomnost dsRNA v kmeni houby *F. oxysporum* CCM F-545, indikující výskyt mykoviru. Fenotypové charakteristiky kmene *F. oxysporum* CCM F-545 obsahující dsRNA a kmene *F. oxysporum* CCM F-419 neobsahující dsRNA byly porovnány s cílem zjistit vliv mykoviru na fenotyp hostitele. *F. oxysporum* CCM F-545 rostl rychleji na běžném neselektivním médiu než kmen *F. oxysporum* CCM F-419. Porovnání fytopatogenity bylo provedeno na modelové rostlině *Arabidopsis thaliana*. Závažné příznaky vaskulárního vadnutí na zkoumaných rostlinách vyvolal pouze kmen neobsahující dsRNA. To naznačuje, že mykovirus reprimuje geny virulence *F. oxysporum*, což znemožňuje houbě napadat rostliny. Reverzní transkripcí a PCR byla dsRNA virového původu převedena do DNA a amplifikována. Ligace a transformace fragmentů virové genetické informace do bakterie *Escherichia coli* pro sekvenaci byla neúspěšná. Sekvenční data jsou nezbytná pro popsání tohoto potenciálně nového mykoviru. Je třeba potvrdit přenosnost výše zmíněných fenotypových změn.

Abstract

Mycoviruses are obligate parasites of fungi causing cryptic infections or serious illnesses in their hosts. Most have a dsRNA or ssRNA genome with a dsRNA replicative form. They are researched for their potential use as bio-control agents against plant pathogenic fungi. In this work, mycoviruses of the ascomycete mold *Fusarium oxysporum* were investigated. *F. oxysporum* causes significant losses on a wide array of crops. Two independent methods of dsRNA isolation were used to confirm the presence of dsRNA in *F. oxysporum* CCM F-545, a hallmark of mycovirus infection. Phenotypic characteristics of *F. oxysporum* CCM F-545 (dsRNA-containing isolate) were compared with *F. oxysporum* CCM F-419 (dsRNA-non-containing isolate) in order to determine the changes in phenotype caused by the mycovirus. *F. oxysporum* CCM F-545 grew more quickly than *F. oxysporum* CCM F-419 on general non-selective medium. Comparison of phytopathogenicity was carried out on the model plant *Arabidopsis thaliana*. Only the presence of a dsRNA-negative isolate caused severe symptoms of vascular wilt. This finding suggests that the presence of a dsRNA mycovirus represses virulence genes in *F. oxysporum*, which makes the fungus unable to cause disease in plants. The recovered dsRNA was reverse transcribed to DNA and amplified with PCR. Ligation and transformation of viral DNA fragments into *Escherichia coli* were not successful. Sequence data are needed to characterise this possibly novel mycovirus

Obsah

1	Úvod	10
1.1	<i>Fusarium oxysporum</i>	10
1.1.1	Makroskopická morfologie	10
1.1.2	Mikroskopická morfologie	11
1.1.3	Genetika	12
1.1.4	Ekologie	14
1.1.5	Fytopatogenita	14
1.2	Mykoviry	16
1.2.1	Klasifikace mykovirů	16
1.2.2	Evoluce, přenos a původ mykovirů	21
1.2.3	Využití jako forma biokontroly	23
2	Cíle práce	25
3	Metodika	26
3.1	Práce s <i>F. oxysporum</i>	26
3.1.1	Příprava PDA média	26
3.1.2	Očkování hub na živná média	27
3.2	Detekce dsRNA	29
3.2.1	Extrakce kyselým fenolem	29
3.2.2	Extrakce celulórou	31
3.2.3	Enzymatické štěpení DNAsou a S1 nukleasou	34
3.2.4	Elektroforetická separace	34
3.3	Porovnání myceliálního růstu	36
3.4	Skličkové kultury	36
3.5	Test patogenity na <i>Arabidopsis thaliana</i>	37
3.6	Reverzně transkripční polymerázová řetězová reakce	38
3.6.1	Reverzní transkripce	38
3.6.2	Purifikace RT produktu	41
3.6.3	Polymerázová řetězová reakce	42

3.7	Příprava cDNA knihovny	45
3.7.1	Ligace cDNA a plasmidu	46
3.7.2	Příprava kompetentních buněk	48
3.7.3	Transformace teplotním šokem	48
3.7.4	Colony PCR	50
4	Výsledky	52
4.1	Detekce dsRNA	52
4.2	Porovnání myceliálního růstu	53
4.3	Skříčkové kultury	54
4.4	Test patogenity na <i>Arabidopsis thaliana</i>	56
4.5	Reverzně transkripční polymerázová řetězová reakce	58
4.6	Příprava cDNA knihovny	58
5	Diskuze	60
6	Závěr	62

Seznam zkratek

(+)/(-) RNA/DNA nukleová kyselina nekomplementární/komplementární k mRNA

cDNA komplementární DNA

CHV1 *Cryphonectria hypovirus 1*

DNA kyselina deoxyribonukleová

dNTP deoxynukleosidtrifosfáty

dsDNA dvouřetězcová DNA

dsRNA dvouřetězcová RNA

ICTV International Committee on Taxonomy of Viruses

mRNA mediátorová RNA

ORF otevřený čtecí rámec

PCR polymerázová řetězová reakce

PDA bramborovo-dextrózový agar

RNA kyselina ribonukleová

RT reverzní transkripce

RT-PCR reverzně transkripční polymerázová řetězová reakce

ssRNA jednořetězcová RNA

VCG vegetativně kompatibilní skupina

1 Úvod

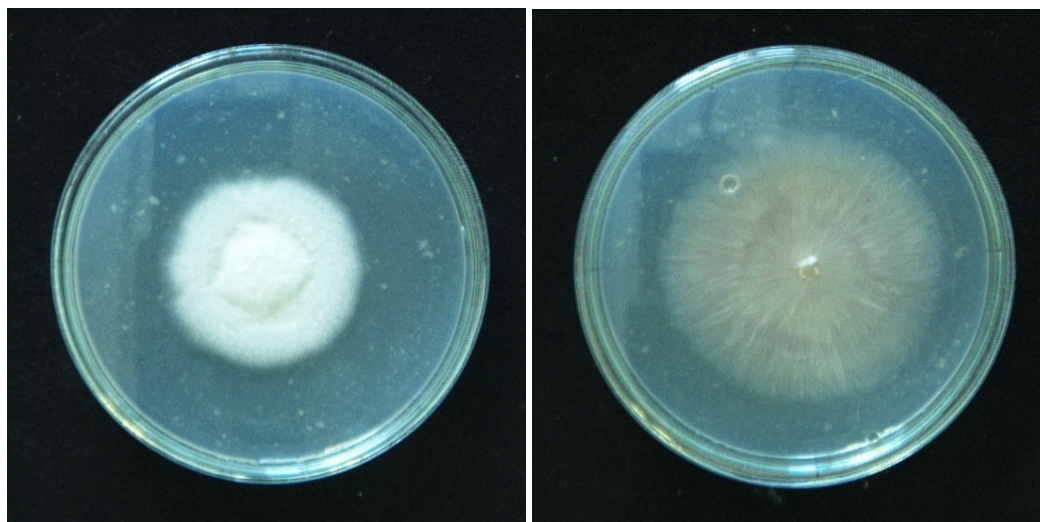
1.1 *Fusarium oxysporum*

Fusarium oxysporum je vřeckovýtrusá mikroskopická houba. Je kosmopolitně rozšířena a vyskytuje se v půdě (Leslie *et al.* , 2006). Mnoho kmenů je fytopatogenních, způsobují závažnou vaskulární nemoc u řady rostlin - fusariové vadnutí. Každoročně způsobuje velké škody na rajčatech (Benhamou *et al.* , 1989), banánech (Ploetz, 2006), cizrně (Jiménez-Gasco *et al.* , 2010), salátu (Pasquali *et al.* , 2005) a na mnoha dalších hostitelích (Gordon, 1965). Žije i saprofytsky, což jí umožňuje růst na rozkládající se organické hmotě v půdě. Produkuje klidová stádia, díky kterým může přežít v půdě přes 20 let (Agrios, 2005). Patogenní kmeny se dělí podle adaptací na konkrétního hostitele na taxonomickou jednotku *forma specialis* (plurál *formae speciales*, zkratka *f.sp.*). Většina kmenů produkuje škodlivé mykotoxiny (Mirocha *et al.* , 1989). *F. oxysporum* je oportunitní lidský patogen, může způsobovat infekce v imunokompromitovaných pacientech (Boutati & Anaissie, 1997). Kromě sterilizace půdy a použití totálních fungicidů neexistuje účinná strategie k boji proti *F. oxysporum* v zemědělství.

1.1.1 Makroskopická morfologie

Na živném neselektivním agaru mají mycelia *F. oxysporum* bílou, béžovou až průhlednou barvu a většina kmenů produkuje “načechrané” vzdušné mycelium (Obr. č. 1). Světlá barva mycelia se při delší kultivaci promění v tmavě fialovou až černou. Pigmenty *F. oxysporum* byly zkoumány z hlediska využití jako barviva (Nagia & El-Mohamedy, 2007; Tatum *et al.* , 1985). *F. oxysporum* je při kultivaci na různých médiích různě zbarvené. Uváděné zbarvení je pro bramborovo dextrózový agar (zkracováno PDA z Potato Dextrose Agar), což je standardní médium pro posuzování makroskopické morfologie u rodu *Fusarium* (Leslie *et al.* , 2006). Soustředné kružnice připomínající letokruhy na myceliu jsou při kultivaci pravděpodobně způsobeny světelným režimem.

Na běžném neselektivním mykologickém médiu (PDA) roste houba rychle, lze ji kultivovat i na běžných bakteriologických agarech. Pro přímou izolaci z půdy nebo pletiva či tkáně hostitele byla vyvinuta řada selektivních médií (Nishimura, 2007).

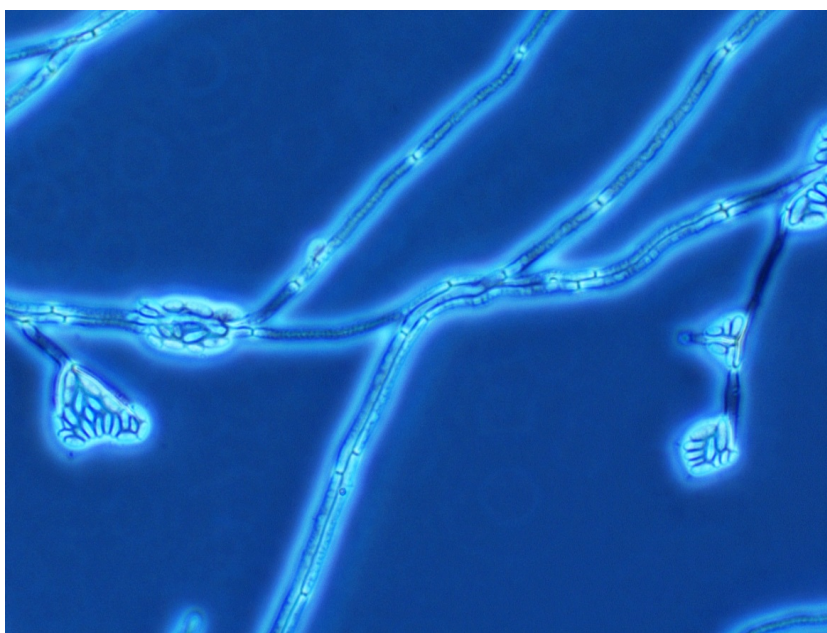


Obrázek 1: Fotografie mycelií *F. oxysporum* rostoucí na PDA. Fotografie byly pořízeny šestý den od naočkování. Zdroj: Martin Mátl

1.1.2 Mikroskopická morfologie

Pod mikroskopem vidíme, že nepigmentované hyfy rozdělují septa (přepážky). Septa jsou pórovitá, což umožňuje výměnu živin v rámci mycelia jedné houby nebo dvou příbuzných hub (Obr. č. 2). Když dojde k fúzi hyf dvou příbuzných či identických kmenů, mluvíme o anastomóze. Anastomóza je potenciální způsob šíření virů v populaci hub neschopných sexuálního rozmnožování (viz sekce 1.2.2). *F. oxysporum* má tři typy asexuálních spor: a) mikrokonidie b) makrokonidie c) chlamydospory. Mikrokonidie jsou ze všech typů asexuálních spor nejhojnější a jsou houbou produkovány víceméně za všech podmínek. Jsou to malé, oválné, jedno až dvoubuněčné útvary, nejčastěji vznikající v myceliu v kupkách. Makrokonidie jsou o něco větší, tři až pětibuněčné, špičaté a ke konci prohnuté. Chlamydospory jsou silnostěnné buňky s drsným povrchem, které jsou produkovány na starém myceliu. Právě chlamydospory umožňují této houbě přežít v půdě za nepříznivých podmínek až 20 let, jsou velmi odolné vůči vnějším vlivům a za příznivých podmínek vyklíčí (Agrios, 2005). Tvar konidií je charakteristickým určovacím znakem této houby. Nemá

žádné známé pohlavní stádium ani systém pohlavního rozmnožování, proto o ní mluvíme jako o anamorfní houbě. Spory které vytváří nepohlavně se někdy souhrnně nazývají mitosporý.

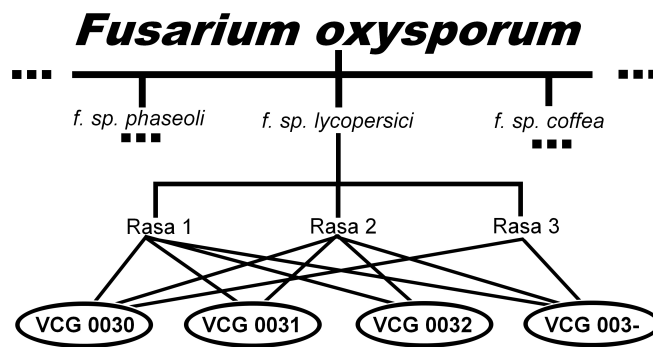


Obrázek 2: Mikrofotografie vzdušného mycelia *F. oxysporum*, z=400. Hyfy jsou oddělené viditelnými přepážkami a vyrůstají z nich konidiofory nesoucí mikrokonidie. Zdroj: Martin Mátl

1.1.3 Genetika

Genom *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (napadající rajče - *Solanum lycopersicum*) byl sekvenován (Ma *et al.* , 2010). Na patnácti chromozomech je v něm uloženo 17 708 protein-kódujících genů. Celý genom má délku 60 Mbp, což je zhruba o 44 % více než nejpříbuznější druh *Fusarium verticillioides*. Genom *F. oxysporum* obsahuje velké množství dalších protein-kódujících genů souvisejících zejména s patogenitou. Zkoumaným tématem jsou příbuzenské vztahy a evoluce jednotlivých *formae speciales*. *Forma specialis* je skupina izolátů *F. oxysporum* adaptovaných k napadení určitého rostlinného druhu či skupiny rostlinných druhů. Bylo však prokázáno, že adaptace na určitého hostitele nastala evolučně nezávisle několikrát, což znamená, že některé *formae speciales* nepředstavují monofyletické taxony (Skovgaard *et al.* , 2001; Baayen *et al.* , 2000). *Forma specialis* tudíž není taxonomická jednotka, ale popisuje jen fenotypový znak daného izolátu. *Formae speciales* se dělí dále

na tzv. rasy. Rasa je skupina izolátů *F. oxysporum* schopná napadat hostitele s určitým rezistenčním mechanismem (konkrétní kultivar pěstované plodiny). Například *F. oxysporum f. sp. lycopersici* má tři rasy, rasy 1 a 2 jsou poměrně rozšířené a ve většině zemí jsou k dispozici rezistentní kultivary rajčat. V roce 1979 se v Austrálii objevil izolát *F. oxysporum f. sp. lycopersici* schopný překonat rezistenční mechanismy rostlin proti rase 1 a 2. Byla popsána nová rasa 3 (Grattidge *et al.*, 1982). Rasa 3 se postupně šířila a decimovala konvenčně pěstované kultivary, dokud nebyl vyšlechtěn kultivar rezistentní vůči rase 3 (Scott & Jones, 1989). Nejmenší taxonomická jednotka *F. oxysporum* je vegetativně kompatibilní skupina (vegetative compatibility group - VCG). Když dva kmeny houby náleží stejné VCG, může dojít k anastomóze. Systém vegetativně kompatibilních skupin je pravděpodobně u *F. oxysporum* způsoben lokusy vegetativní inkompatibility, zkracováno *vic* z vegetative incompatibility loci (Elias *et al.*, 1991). Na jiných houbách bylo prokázáno, že když jsou dva izoláty identické ve *vic* lokusech, dojde k anastomóze (Perkins *et al.*, 1982). Tento objev naznačuje, že i u *F. oxysporum* je vegetativní kompatibilita dána geneticky. Kvůli absenci pohlavního rozmnožování VCG pravděpodobně představují klonální a evolučně izolovanou linii (Elias *et al.*, 1993). Souvislost VCG s rasou u *F. oxysporum f. sp. lycopersici* není (Elias *et al.*, 1991). Obr. č. 3 ukazuje vztahy *formae speciales* s rasou a VCG na *F. oxysporum f. sp. lycopersici*.



Obrázek 3: Schéma kategorizace *Fusarium oxysporum*. Výpustka implikuje nevyznačené větve. Ze všech znázorněných úrovní zachycuje evoluční příbuznost pouze VCG. Označení VCG 003- zastupuje asi 50 různých VCG s jediným členem. Zdroj: Martin Mátl

1.1.4 Ekologie

F. oxysporum najdeme v půdě, na odumřelých rostlinách, přímo jako endoparazita v rostlinách nebo jako endofyta asymptomaticky kolonizující kořeny (Agrios, 2005). Žije nejčastěji saprofytický nebo jako komenzalista ve vztahu s rostlinnými kořeny (Gordon *et al.*, 1989). Rozšíření této houby je mimořádně široké, od pouští po tundru (Leslie *et al.*, 2006). U rostlin, u kterých daná patogenní forma specialis nezpůsobuje infekci, může žít houba právě jako endofyt. Toto soužití je mnohdy pro rostlinu prospěšné, protože nepatogenní houba okupuje ekologickou niku, kterou by běžně využil patogenní kmen a může aktivovat obranný systém rostliny, aniž by způsobila vážnou nemoc. Tyto vztahy a jejich potenciální využití jako biologická kontrola patogenů v zemědělství jsou intenzivně zkoumány a slibují naději jako alternativu ke konvenčním způsobům boje proti *F. oxysporum* (Fravel *et al.*, 2003). Ekologie *F. oxysporum* na přirozených stanovištích a v ekosystémech nebyla dostatečně prozkoumána, protože primárním objektem zájmu je zemědělské prostředí. Nové hypotézy řadí fytopatogenitu *F. oxysporum* jako recentní fenomén, evolučně vzniklý z agresivního růstu v kolonizovaném xylému kořene rostliny a následné specializaci na parazitický způsob života. Nástup zemědělství a moderní zemědělské praktiky údajně přispěly k většímu úspěchu a rozšíření těchto patogenů. Klonální populace se dnes s lidskou pomocí mohou šířit na dlouhé vzdálenosti (Gordon & Martyn, 1997). Na pravděpodobnost této teorie poukazuje i fakt, že houba je saprofytická, a v případě nepřítomnosti primárního hostitele je schopná nepatogenicky kolonizovat rhizosféru jiných druhů (Mandel & Baker, 1991). To naznačuje malou míru specializace na obligátně parazitický život.

1.1.5 Fytopatogenita

Nejzávažnější rostlinná nemoc způsobená *F. oxysporum* je fusariové vadnutí (Agrios, 2005). Průběh této nemoci je následující. Chlamydostry či konidie v půdě vyklíčí a mycelium se začne rozrůstat. Hyfy pronikají do hostitelské rostliny prostřednictvím mikroskopických ranek na kořenech, způsobené rostlině např. živočišnými parazity nebo prodíráním se substrátem. Poté co houba pronikne do kořene, začne se rychle množit a usazovat ve vodivých pletivech. Postupuje xylémem směrem nahoru. V hostiteli jsou houbou produkovány nejprve mikrospory, poté makrospory a na starém myceliu chlamydostry. V rostlině *F. oxysporum* produkuje mykotoxiny a inaktivuje obranný systém rostliny. Rozvod vody a živin rostliny je postižen a rostlina postupně vadne. Nemoc je rychlá a po diagnóze je pozdě na jakoukoliv ochranu. Rostlina žlutne, úplně vadne, neprodukuje plody a roste zakrsle (Obr. č. 4). Tyto

symptomy jsou podobné napříč většinou plodin postižených fusariovým vadnutím (Agrios, 2005). Staré mycelium produkuje chlamydospory a konidiami tvořenými na listech se může houba šířit na přilehlé rostliny prostřednictvím deště, kontaminované vody, větru nebo lidským přispěním, např. orbou, okopáváním, zamořenými oděvy nebo nástroji (Jones & Miller, 1982). Tyto vlastnosti dělají z *F. oxysporum* velice nepříjemného škůdce. Jak již bylo zmíněno, *F. oxysporum* je přítomna téměř ve všech podmínkách a půdách, nicméně jisté faktory jsou příznivější pro vznik nemoci. Např. teplota ovlivňuje fusariové vadnutí tak, že patogen nejúspěšněji napadá své hostitele při teplotách nad 25 °C (Egel & Martyn, 2007). Kyselé a vlhké půdy také zvyšují úspěch *F. oxysporum* (Jones & Miller, 1982). Nyní se v zemědělství k boji proti *F. oxysporum* používají totální fungicidy, fumigace, sterilizace půdy a rezistentní kultivary plodin (Jones et al., 1982). Z těchto opatření je nejvýhodnější právě použití rezistentních kultivarů, ty však nejsou k dispozici pro každou plodinu. Také se mohou rozšířit nové kmeny *F. oxysporum* schopné obejít současné rezistenční mechanismy plodin (Grattidge et al., 1982). Na zamořených půdách je nutná rotace plodin, a dlouhodobé odstavení hostitelské plodiny z místa. Biokontrola za pomoci bakterií, jiných hub nebo nepatogenních kmenů *F. oxysporum* je velice lákavá a slibná možnost boje proti tomuto patogenu (Fravel et al., 2003).



Obrázek 4: Fotografie rostliny *Arabidopsis thaliana* pěstované za přítomnosti *F. oxysporum* pořízená 52. den po zasetí. Malá velikost rostliny, žluté zbarvení listů a silně snížená rychlost růstu poukazují na napadení rostliny *F. oxysporum*. Zdroj: Martin Mátl

1.2 Mykoviry

Viry napadající houby jsou označovány termínem mykoviry. V současné době je známo více než 80 mykovirů (Pearson *et al.* , 2009). V minulosti skupinu mykovirů tvořily výhradně dsRNA viry, nyní jsou však stále častěji objevovány i ssRNA mykoviry a je známý DNA mykovirus (Ghabrial *et al.* , 2015). Viriony se většinou skládají z kapsidu, obalu a genetického materiálu. Přítomnost mykovirů byla zjištěna u téměř všech skupin hub, nicméně většina pozornosti je věnována modelovým organismům (*Saccharomyces cerevisiae*), jedlým houbám a fytopatogenním houbám. Mykoviry nejsou infekční v pravém slova smyslu, jejich přenos probíhá výhradně intracelulárně (Nuss, 2005). Nové mykoviry jsou objevovány poměrně často, a to díky relativní neprozkoumanosti této skupiny virů a výrazným snižováním cen celogenomových sekvenací (Pearson *et al.* , 2009). O roli mykovirů v ekosystémech ale stále není mnoho známo. Mykoviry jsou zkoumány pro potenciál biokontroly houbových onemocnění (Fravel *et al.* , 2003).

1.2.1 Klasifikace mykovirů

International Committee on Taxonomy of Viruses každoročně vydává aktuální systém klasifikace virů (Virus Taxonomy: 2014 Release) a také obsáhlou zprávu shrnující taxonomii a poznatky celé virologie (King *et al.* , 2011). Ty jsou řazeny podle fylogenetické příbuznosti podobně jako buněčné organismy. Viry jsou řazeny do řádů, čeledí, podčeledí, rodů a druhů. Taxonomicky klasifikovat virus je však velice obtížná záležitost, mnoho čeledí tudíž není zařazeno do řádů, mnoho rodů není zařazeno do čeledí apod. Hlavní znaky, na jejichž základě jsou viry klasifikovány jsou: typ nukleové kyseliny, počet segmentů nukleové kyseliny, morfologie virionu a podobnost sekvence nukleové kyseliny. Jednodušší a často používanou alternativou systému ICTV je Baltimorova klasifikace virů (Baltimore, 1971). Baltimorova klasifikace bere v potaz to, že cílem všech virů je svou nukleovou kyselinu převést do mRNA (Obr. č. 5). Tento systém řadí viry do sedmi skupin na základě typu nukleové kyseliny přítomné ve virionu a jejich transkripční strategie. Jednotlivé skupiny jsou zde popsány blíže.

Baltimorova klasifikace mykovirů

I dsDNA viry

Třída I obsahuje viry jejichž genom je složen z dvouřetězcové DNA. Jejich transkripce probíhá stejně jako u všech buněčných organismů. Virus patřící do třídy I je například T4 bakteriofág.

II (+)ssDNA viry

Třída II obsahuje viry, jejichž genom je složen z jednořetězcové (+)DNA. Znaménko + u nukleové kyseliny značí, že tato molekula má direkcionalitu stejnou jako mRNA, tudíž k (+)ssDNA molekulám musí být před transkripcí nasyntetizován komplementární řetězec (analogicky označen jako -) a tento řetězec je využit jako templát pro transkripci do mRNA. Meziproduktem transkripce je dsDNA.

III dsRNA viry

Třída III obsahuje viry, jejichž genom je složen z dvouřetězcové RNA. Transkripce probíhá s (-) vláknem jako templátem. Do této třídy patří řada mykovirů, např. čeleď *Totiviridae* popsaná níže.

IV (+) ssRNA viry

Třída IV obsahuje viry, jejichž genom je složen z jednořetězcové (+)RNA. Jejich genom je k produkované RNA identický, tudíž virionová RNA není komplementární k mRNA. Před transkripcí samotnou je tedy nasyntetizováno (-) vlákno komplementární k virionové ssRNA. Jako meziprodukt vzniká dsRNA. Jako templát pro transkripci slouží nově nasyntetizovaný řetězec, nebo samotná virionová (+)ssRNA. Čeleď *Narnaviridae*, jejíž zástupci napadají např. fytopatogenní vřeckovýtrusou houbu *Cryphonectria parasitica* (Hillman & Cai, 2013), patří k třídě IV.

V (-)ssRNA viry

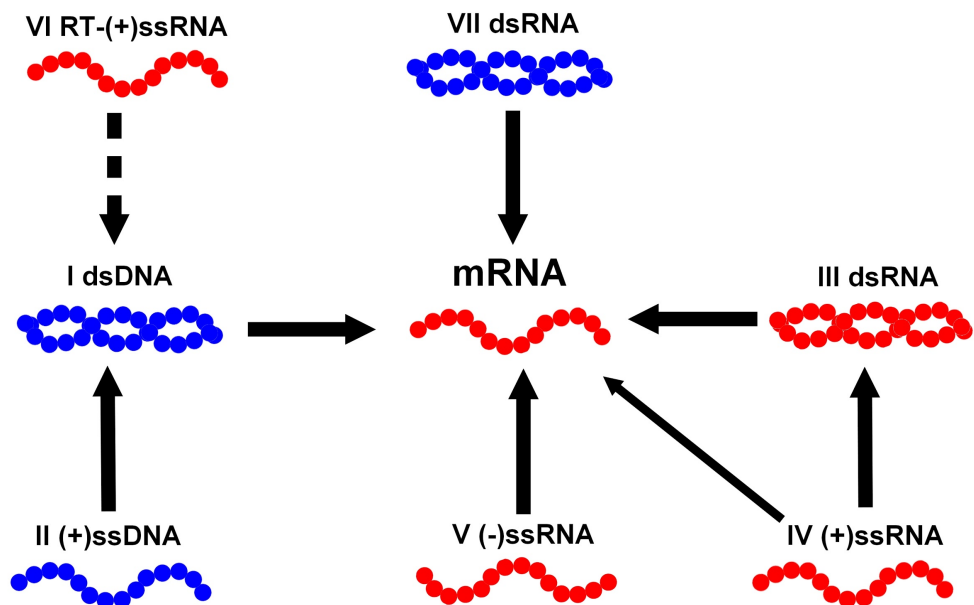
Třída V obsahuje viry, jejichž genom je složen z jednořetězcové (-)RNA. Jejich virionová RNA je komplementární k produkované RNA. Transkripce probíhá syntézou komplementárního řetězce k virionové RNA, tento nově nasyntetizovaný řetězec rovnou slouží jako mRNA. Známým zástupcem třídy V je ebolavirus (Casillas *et al.* , 2003).

VI (+) ssRNA viry s reverzní transkriptázou (retroviry)

Třída VI obsahuje viry, jejichž genom je složen z jednořetězcové (+)RNA, která je přepsána do DNA a integrována do hostitelského genomu. Virus integrovaný do genomu svého hostitele se nazývá provirus. Zástupce třídy VI je Human immunodeficiency virus 1 způsobující nemoc AIDS.

VII dsDNA viry s reverzní transkriptázou (pararetroviry)

Třída VII obsahuje viry, jejichž genom je složen z dvouřetězcové DNA, jejichž mRNA je použita jako templát pro syntézu virionové DNA viru reverzní transkriptázou. Zástupci třídy VII využívají mRNA také jako templát pro replikaci. Příkladem je Cauliflower mosaic virus napadající květák - *Brassica oleracea* (Geering, 2007).



Obrázek 5: Schéma znázorňující systém Baltimorovy klasifikace virů na základě jejich genetické informace a transkripční strategie. Šipky naznačují transkripci nukleových kyselin. Třída IV má (+)ssRNA genom, ten je využíván přímo jako mRNA, nebo je dosyntetizován komplementární řetězec a vznikne dsRNA mezi-produkt. Třída VI provádí reverzní transkripci (vyznačenou přerušovanou čarou) k převodu ssRNA do dsDNA integrující se do hostitelského genomu. Třída VII používá reverzní transkripci pro replikaci, tudíž není v tomto schématu transkripčních strategií vyznačena. Zdroj: Martin Mátl

Tato práce se zabývá viry v třídách III a IV Baltimorovy klasifikace, tedy ssRNA viry a dsRNA viry. Existují sice mykoviry v třídě II a V, ty jsou však nedostatečně charakterizovány a zatím nezařazeny, proto nebudou v této práci popisovány (Ghabrial *et al.*, 2015). Baltimorova klasifikace je velice užitečná z praktického hlediska, avšak o kategorizaci virů na základě fylogenetické příbuznosti se snaží pouze systém ICTV. Tato klasifikace ale zdaleka není kompletní a jednoznačná (je mnoho nezařazených druhů, rodů a čeledí). Dále jsou popsány některé významné čeledi mykovirů (King *et al.*, 2011).

Přehled významných čeledí mykovirů dsRNA

Chrysoviridae

Čeď *Chrysoviridae* dostala jméno podle jednoho z prvních dobře charakterizovaných mykovirů - *Penicillium chrysogenum* virus (PcV). Tento virus se skládá ze čtyř molekul dsRNA (3,5–2,9 kb) které kódují RNA-dependentní RNA polymerázu, kapsidový protein a dva další segmenty (Jiang & Ghabrial, 2004). Neobalené kapsidy jsou ikosaedrální (dvacetistěnné). Všechny čtyři segmenty genomu jsou enkapsidovány odděleně.

Totiviridae

Genom *Totiviridae* je nesegmentovaný, latinské slovo *toti* - celý, nerozdělený, je proto základem jména. Tyto dsRNA viry napadají houby a prvoky. Velikost genomu se pohybuje okolo 4,6–7 kb. U *Saccharomyces cerevisiae* viru L-A jsou kódované proteiny dva, a to kapsidový protein a RNA-dependentní RNA polymeráza. Tyto dva geny jsou však na molekule RNA překryté. Díky mechanismu ribosomal frameshift je někdy produktem translace polyprotein kapsidového proteinu a RNA-dependentní RNA polymerázy. K ribosomal frameshift dochází tehdy, když se ribozom při translaci mRNA posune o jednu bázi zpět. Expri-mován je sám kapsidový protein a také polyprotein vzniklý spojením RdRp s kapsidovým proteinem (Dinman *et al.* , 1991).

Partitiviridae

Neobalený ikosaedrální virion této skupiny je zvláštní tím, že vždy obsahuje pouze jednu polovinu genomu. dsRNA genom *Partitiviridae* je rozdělen na dva 2 kb segmenty které jsou enkapsidovány odděleně – každý segment má svůj kapsid. Jméno je odvozeno z latinského *partitus* – oddělený. *Partitiviridae* většinou způsobují kryptické infekce (Ghabrial *et al.* , 2015).

Reoviridae

Rod *Mycoreoviridae* zahrnuje všechny známé mykoviry čeledi *Reoviridae*. Mycoreovirus-1 a Mycoreovirus-2 byly detekovány u vřeckový-trusé vláknité houby *Cryphonectria parasitica*, původce korové nekrózy kaštanovníku. V tomto hostiteli způsobuje virus hypovirulenci (Deng *et al.* , 2007). Virion je dvojkapsidový a obsahuje 11 nebo 12 segmentů dsRNA. Každý z nich má právě jeden ORF a kóduje jeden protein.

Megabirnaviridae

Dva segmenty dsRNA o délce 7 a 9 kb charakterizují *Megabirnaviri-*

dae. Tento poměrně velký genom (mega-), rozdělení na dva úseky (-bi-), a skutečnost, že se jedná o molekuly RNA (-rna-) dávají čeledi *Megabirnaviridae* jméno. Viriony jsou enkapsidované. *Rosellinia necatrix* megabirnavirus 1 napadá fytopatogenní vřeckovýtrusou houbu *Rosellinia necatrix*. Je asociován s hypovirulencí a sníženým myceliálním růstem (Chiba *et al.* , 2009).

Endornaviridae

Zástupci *Endornaviridae* nemají pravý kapsid a jejich jediná molekula dsRNA je 14 kb až 17.6 kb velká. Jediný mykovirus patřící k této čeledi *Helicobasidium mompa* endornavirus 1.

Quadriviridae

Genom *Quadriviridae* je rozdělen do čtyř segmentů pravděpodobně enkapsidovaných samostatně. Ty kódují čtyři proteiny, RNA-dependentní RNA polymeázu, dva možné strukturní proteiny a jeden neznámý protein. Dohromady činí velikost genomu 16.8 kb.

(+)ssRNA

Hypoviridae

Viron zástupců *Hypoviridae* je nekapsidovaný a neobalený. Genom v podobě jedné 9–13 kb molekuly dsRNA je spolu s RNA-dependentní RNA polymerázou enkapsulovaný v lipidových váčcích pocházejících z hostitele. Pro infekci stačí jen jeden (+)ssRNA řetězec, proto byla tato čeleď přeřazena z kategorie dsRNA virů k ssRNA virům (King *et al.* , 2011). *Hypoviridae* mají jeden nebo dva ORF, kódující RNA dependentní RNA polymerázu a případné další nestrukturní proteiny (van Regenmortel & Mahy, 2009). Významným a studovaným zástupcem *Hypoviridae* je *Cryphonectria hypovirus 1*, způsobující hypovirulenci ve svém hostiteli. *Cryphonectria parasitica* způsobuje korovou nekrózu kaštanovníku (Deng *et al.* , 2007).

Alphaflexiviridae

Tato čeleď se vyznačuje neobaleným, sinusoidním a vláknitým kapsidem. Zástupci parazitují na rostlinách a houbách, konkrétně fytopatogenní *Botrytis cinerea* a *Sclerotinia sclerotiorum*. Jejich genom je tvořen 6 - 9 kb dlouhou jedinou molekulou (+)ssRNA, její 3' konec je polyadenylovaný.

Barnaviridae Tyčinkovité ikosaedrálně symetrické viriony ukrývají jedinou 4kb molekulu (+)ssRNA. *Barnaviridae* zastupuje pouze jeden rod a druh, Mushroom bacilliform virus (MBV) napadající kultivovanou jedlou houbu

Agaricus bisporus. Tento virus je asociován s tzv. nemocí La France. Epidemie této choroby vedla k objevu prvního mykoviru v roce 1962, značící počátek mykovirologie (Hollings, 1962).

Gammaflexiviridae

Virion *Gammaflexiviridae* je strukturně velice podobný *Alphaflexiviridae*. Jediným zástupcem této čeledi je *Botrytis virus F* (BotV-F) infikující fytopatogenní vřeckovýtrusou houbu *Botrytis cinerea*. Jediná molekula (+)ssRNA je 6,8 kb dlouhá a její 3' konec je polyadenylovaný (Howitt *et al.* , 2001).

Narnaviridae

Genom *Narnaviridae* je asociovaný s absencí kapsidu, tudíž tvoří nepravý virion. Mají (+)ssRNA nesegmentovaný genom délky 2,5–3 kb. Tyto mykoviry se řadí k těm nejjednodušším. Jeden ORF obsahuje jen RNA-dependentní RNA polymerázu (Hillman & Cai, 2013).

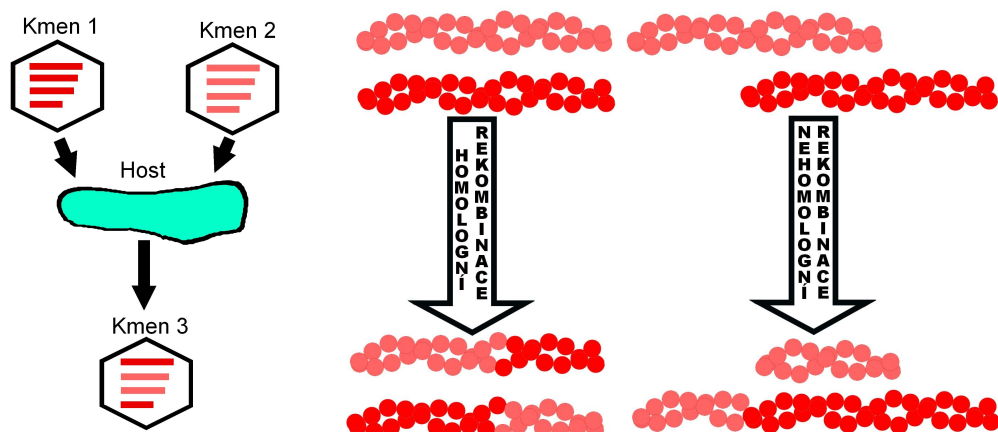
1.2.2 Evoluce, přenos a původ mykovirů

Přestože je virus nebuněčná entita, je předmětem biologické evoluce. V této části práce jsou popsány základní procesy, které řídí evoluci virů a mykovirů. Ty poslouží k hlubšímu pochopení jejich role a významu. Dále jsou stručně popsány teorie možné fylogeneze mykovirů.

Míra mutací RNA virů je v porovnání s DNA viry, mikroby a vyššími eukaryoty neobyčejně vysoká (Drake & Holland, 1999). Zvýšená mutační rychlost v kombinaci s obrovským množstvím potomstva virů podstatně zrychluje proces adaptace na okolí. Praktický příklad tohoto fenoménu je neobyčejně rychlá evoluce původce chřipky, influenzaviru, která se projevuje sezónními epidemiemi. Každou sezónu se objeví nový kmen, který má zmutované povrchové proteiny, což mu umožňuje obejít imunitu hostitele. Rychlost adaptace Influenzaviru na imunitní systém hostitele si vyžadává každoroční přeočkování proti novým kmenům chřipky (Hay *et al.* , 2001). Zvýšená rychlost mutace má však i své nevýhody. U takto rychle mutujících organismů může dojít k tzv. error catastrophe (chybová katastrofa). V případě tohoto scénáře dochází k takové akumulaci chyb při replikaci, že drtivá většina potomstva je kvůli náhodným nevýhodným mutacím neživotaschopná, populace zkolabuje a vymře. Error catastrophe je fenomén predikovaný matematickými modely, i empiricky pozorovaný. Některá antivirotika uměle zvyšují mutační rychlost viru, až dojde k error catastrophe (Pariante *et al.* , 2005). Primárním zdrojem nových sekvencí je mutace.

Pro nižší eukaryoty, prokaryoty a viry může být však zdroj evolučních novinek také exogenní, horizontálním přenosem genů může jeden organismus

přijmout úsek genetické informace z nepříbuzného organismu. Horizontální přenos genů se uplatňuje dvěma konkrétními mechanismy: rekombinací s cizím organismem a genetickým shiftem. Nehomologní a homologní rekombinace (Obr. č. 6b) byla pozorována u (+)ssRNA, (-)ssRNA a dsRNA virů rostlin, a je pravděpodobně velkou hnací silou evoluce těchto virů (Figlerowicz & Bujarski, 2011). Nehomologní rekombinace RNA viru s buněčnou mRNA je spojená s letální mutací viru bovinní virové diarrhey (Becher & Tautz, 2011). Rekombinace mezi RNA viry také pravděpodobně zmírňuje účinek negativních mutací, například introdukcí funkční alely do klonální populace s nefunkční alelou (Worobey & Holmes, 1999). Genový shift neboli reassortment (přetřídění) je proces, ve kterém jsou zkombinovány segmenty z dvou či více kmenů viru a enkapsidovány jako nový virus (Obr. č. 6a). Tento nový virus má genetickou informaci složenou ze dvou zdrojů, je v podstatě jakousi chimérou. Genový shift se může uplatňovat jenom u segmentovaných virů. Nové viriony obsahující segmenty z různorodých zdrojů a často dají vzniknout novému patogennímu kmenu (Marshall *et al.*, 2013).



(a) Schematické znázornění reassortmentu. Segmenty genů z dvou odlišných virionů liny se při homologní rekombinaci překříží a vymění jsou v hostiteli zkombinovány komplementární úseky genetické informace. Při vzniku nového kmene viru. homologní rekombinaci jsou vyměněny nekomplementární úseky. Zdroj: Martin Mátl

Obrázek 6: Mechanizmy horizontálního genového transferu uplatňující se u mykovirů.

Tyto hlavní mechanismy jsou uplatněny u všech skupin virů. Mykoviry se však liší od ostatních svým způsobem života. Živočišné viry se do nových buněk a hostitelů dostávají prostřednictvím specifických povrchových proteinů zprostředkávajících proniknutí viru do buňky (Dimmock *et al.*, 2007). Mykoviry postrádají extracelulární způsob infekce, a tak žijí výhradně uvnitř buňky hostitele. Přenášeny jsou buněčným dělením, sporogenezí, anastomózou a buněčnou fúzí (Ghabrial & Suzuki, 2009). Byl prokázán přenos mykoviru z jednoho druhu fytopatogenní houby na druhy jiné a nepříbuzné. Přenos mykoviru významně ovlivnil fenotyp nových hostitelů (Lee *et al.*, 2011). Anastomóza je způsob přenosu mykovirů v rámci jedné vegetativně kompatibilní skupiny (Chu *et al.*, 2002).

Přirozeně omezená schopnost šíření mykovirů má značné evoluční následky. Mykovirus výrazně handicapující svého hostitele nevyhnutelně vyhyne, neboť svého hostitele selekčně znevýhodní a ten vyhyne. Mykovirus nemůže “opustit potápějící se loď“, kvůli omezení v šíření. Je tudíž pravděpodobné, že většina mykovirů je nyní v “rovnovážném stavu” se svými hostiteli - výrazně negativně svého hostitele neovlivňují (Pearson *et al.*, 2009). Většina mykovirů tedy pro svého hostitele nepředstavují drastické selekční znevýhodnění, některé dokonce svému hostiteli pomáhají (Özkan & Coutts, 2015).

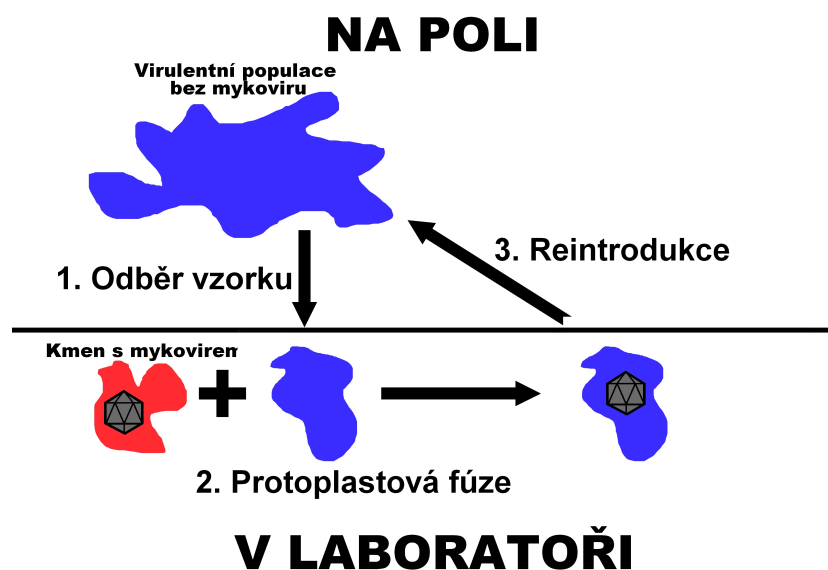
Intracelulární povaha mykovirů a snížená schopnost šíření vznášejí otázku jejich původu. Dvě hlavní hypotézy existují. Hypotéza koevoluce navrhuje, že mykoviry jsou velice stará skupina, a že jejich soužití s houbami je dlouhodobé. Zakládá na tom, že metody přenosu mykovirů jsou velice omezené, a tudíž je pravděpodobné, že mykoviry a houby dosáhly dnešní diverzity koevolucí po dobu stovek milionů let (Pearson *et al.*, 2009). Podle této teorie se mykoviry vyvíjely spolu s jejich hostiteli. Biostatistické testy do jisté míry potvrdily kodivergenci jako dominantní zdroj diverzity mykovirů a jejich hostitelů, pro mnohé taxony jsou však výsledky kvůli malému počtu sekvencí neprůkazné (Göker *et al.*, 2011). Přesto však některá pozorování do teorie koevoluce nezapadají. Zejména nápadná podobnost čeledi *Hypoviridae* k rostlinným virům z čeledi *Potyviridae* (King, 2011). Tuto zvláštnost vysvětluje teorie rostlinného viru. Ta říká, že některé skupiny virů fytopatogenních hub vznikly přenosem mezi rostlinou a jejím houbovým parazitem. Tato málo pravděpodobná, leč možná, událost by mohla vysvětlovat příbuznost mykovirů k rostlinným virům (Pearson *et al.*, 2009).

1.2.3 Využití jako forma biokontroly

Přestože většina mykovirů nemá výrazný vliv na fenotyp svého hostitele, existuje mnoho případů, kdy svého hostitele postihují negativně (Pearson *et al.*

, 2009). V případě, že mykovirus snižuje virulenci patogenních hub, mluvíme o mykoviro-mediované hypovirulenci. Tyto mykoviry představují atraktivní možnost biologické kontroly rostlinných chorob (Nuss, 2005). *Cryphonectria parasitica* je fytopatogenní vřeckovýtrusá houba, která na počátku 20. století zničila populaci kaštanovníků na východním pobřeží Spojených států. Po druhé světové válce byla zavlečena i do Evropy, nicméně díky mykovirům z čeledi *Hypoviridae* (zejména CHV1 zmíněný v sekci 1.2.1) epidemie v Evropě nikdy nedosáhla amerického měřítka (Heiniger & Rigling, 1994). Tato událost do značné míry zvedla zájem o využití mykovirů jako biokontrolní opatření proti rostlinným patogenům. Omezené možnosti šíření mykovirů jsou překážkou pro jejich využití. V Americe se nachází mnoho VCG *C. parasitica*, které znemožňují přenos mykoviru CHV1. Proto byl CHV1 v Americe neúspěšný v boji proti *C. parasitica*.

Způsob použití mykoviru v ochraně plodin na příkladu asexuální houby, jejíž přírodní populace je odlišné VCG než kmen s mykovirem je navržen na obr. č. 7. Protoplastovou fúzí získáme kmen s mykovirem o žádané VCG, který můžeme vypustit na cílové stanoviště. Anastomózou tento kmen infikuje mykovirem celou přírodní populaci.



Obrázek 7: Navrhovaný způsob infekce virulentní populace asexuální houby v přírodě mykovirem. Odběrem vzorku z přírodní populace a jeho protoplastovou fúzí s kmenem obsahujícím mykovirus získáme kmen houby stejné VCG jako v přírodní populaci s mykovirem. Reintrodukce této houby do původní populace způsobí infekci celé populace mykovirem prostřednictvím anastomózy. Zdroj: Martin Mátl

2 Cíle práce

Cílem práce je ověřit výskyt dsRNA mykovirů v kmenech fytopatogenní houby *Fusarium oxysporum* a popsat jejich vliv na houbového hostitele, a na rostlinného hostitele houby.

Přítomnost dsRNA bude využita jako indikace přítomnosti dsRNA mykoviru ve vzorku. Posouzena bude izolací dsRNA kyselým fenolem (Flegr, 1987) a celulózou (Morris *et al.*, 1979). Kmeny *F. oxysporum* s a bez mykoviru budou porovnávány v ohledech mikroskopické a makroskopické morfologie, rychlosti růstu na mykologickém médiu a fytopatogenity na modelové rostlině *Arabidopsis thaliana*. Reverzně transkripční polymerázová řetězová reakce a molekulární klonování budou provedeny s cílem připravit virovou genetickou informaci pro sekvenaci.

1. Detekce dsRNA v izolátech *F. oxysporum*
2. Zjištění fenotypových rozdílů mezi dsRNA obsahujícím a dsRNA neobsahujícím kmenem
 - V rychlosti růstu na PDA médiu
 - V mikroskopické morfologii
 - V makroskopické morfologii
 - Ve fytopatogenitě na *Arabidopsis thaliana*
3. Izolace virové RNA a molekulárně-biologické metody
 - (a) Reverzní transkripce virové dsRNA
 - (b) PCR cDNA fragmentů virového původu
 - (c) Ligace DNA virového původu do plasmidového vektoru
 - (d) Transformace *Escherichia coli* plasmidem – tvorba cDNA knihovny

3 Metodika

3.1 Práce s *F. oxysporum*

V průběhu celé práce bylo nutné uchovávat kmeny *F. oxysporum* a kultivovat je dle potřeby. Tyto úkoly vyžadovaly klasické mikrobiologické metody jako je příprava živného média, rozlévání média do Petriho misek, zhotovení šikmých agarů a očkování plísní na živná média. Kvůli agresivní povaze *F. oxysporum* byla dodržována přísná bezpečnostní opatření při přímé práci s mikroskopickou houbou.

3.1.1 Příprava PDA média

Většina saprofytních hub si bohatě vystačí s jednoduchým médiem, nejpoužívanějším neselektivním médiem pro kultivaci mikroskopických hub je PDA - potato dextrose agar, čili bramborovo dextrózový agar. Je to standardní médium pro pozorování makroskopické morfologie u rodu *Fusarium* (Leslie a Summerell, 2006). Na přípravu 200 ml média bylo nastrouháno 50 g brambor, které byly povařeny ve zhruba 100 ml destilované vody po dobu 10 minut. Tento bramborový vývar byl přefiltrován a filtrát byl smíchán se 4 g agaru (ztužovač média) a 4 g dextrózy (D-glukóza). Objem média byl doplněn na 200 ml destilovanou vodou. Sterilizace média byla provedena v malém autoklávu (Prestige Medical Classic) při teplotě 121 °C a tlaku 15 psi po dobu 15 minut. Při těchto podmínkách jsou zničeny všechny vegetativní i dormantní stádia organismů a médium je sterilní.

Takto připravené PDA médium bylo použito na výrobu šikmých agarů a Petriho misek s agarem. Po sterilizaci v autoklávu (Obr. č. 8) je možné s médiem pracovat. Šikmé agary byly připraveny napipetováním 5 ml ještě teplého média do mikrobiologických zkumavek a zazátkováním. Zkumavky byly položeny na hranol ústím vzhůru, tak, aby se médium v nich obsažené rozlilo našikmo, čímž byl zvýšen povrch (Obr. č. 9). Zhruba po hodině agar ztuhl a zkumavky byly skladovány vodorovně či horizontálně podle potřeby. Šikmé agary byly použity k dlouhodobému skladování vzorků *F. oxysporum*.

Petriho misky s médiem byly připraveny nalitím rovnoměrné vrstvy ještě teplého média (zhruba 30 ml) do skleněné Petriho misky o průměru 10 cm. Po ztuhnutí je možné Petriho misky i šikmé agary naočkovat.



Obrázek 8: Autokláv Prestige Medical Classic. Zdroj: Martin Mátl

3.1.2 Očkování hub na živná média

Houby k naočkování (inokulum) byly naočkovány (inokulovány) na šikmé agary a Petriho misky dvěma způsoby.

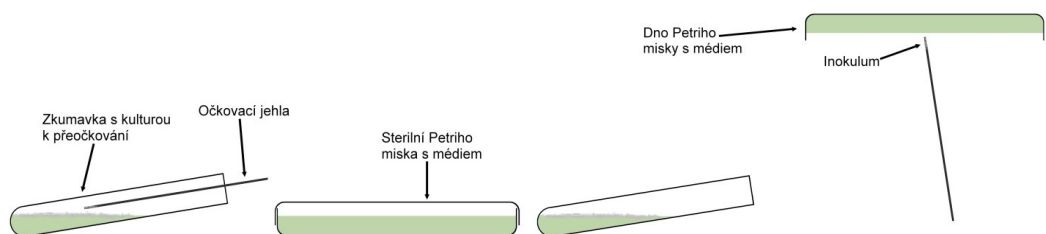
1. Na šikmý agar: Sterilní jednorázovou očkovací kličkou se dotkneme mycelia a kličkou vlnitým pohybem rozetřeme inokulum po povrchu šikmého agaru.
2. Na Petriho misku vpichem: Rovnou očkovací jehlou se dotkneme mycelia a dno Petriho misky s médiem uchopíme stranou s médiem dolů. Ze spodu jehlu vedeme vzhůru, dokud nevpíchneme jehlu s inokulem do Petriho misky na médium doprostřed. Opět přiklopíme víko Petriho misky (Obr. č. 10).

Očkování vpichem je prováděno dnem vzhůru kvůli možnosti uvolnění spor. Kdyby z jehly spora houby spadla na médium mimo místo vpichu, houba by rostla ze dvou míst najednou, což je pro experimenty sledující růst mycelia nevhodné. Při sledování růstu provádíme vpich do přesného středu misky, určeného nakreslením kříže fixem na dno misky.



Obrázek 9: Fotografie čerstvě nalitých šikmých agarů. Zkumavky s agarem chladnou pod úhlem, jsou podepřeny deskou. Zdroj: Martin Mátl

Při práci s mikroskopickými houbami je třeba dbát na sterilitu a bezpečnost práce. Všechna práce přímo s houbami byla provedena v UV boxu, který vysokou dávkou germicidního UV záření zničí vše živé uvnitř před a po práci. Před prací s houbami byly v UV boxu ponechány pouze očkovací klíčky a UV lampa byla zapnuta. Tím byla veškerá klidová i vegetativní stádia mikroorganismů v prostoru boxu zničena. Poté je možné začít se samotnou prací v boxu. Po skončení práce je třeba vyjmout z boxu všechny biologický materiál, který chceme uchovat (např. naočkované Petriho misky) a opět UV lampu zapnout, čímž opět zneškodníme jakékoliv organismy. Manipulaci s houbami je třeba provést ve sterilních rukavicích a dodržovat správné postupy dezinfekce rukou. Před a po práci byly pracovní plochy vydezinfikovány chemickými prostředky.



(a) Očkovací jehlou se dotkneme inokula. **(b)** Očkovací jehlou s inokulem se dotkneme středu misky určené k naočkování dnem vzhůru. Zdroj: Martin Mátl

Obrázek 10: Očkování vpichem. Zdroj: Martin Mátl

3.2 Detekce dsRNA

Pro izolaci dsRNA byla zvolena metoda extrakce kyselým fenolem (Flegr, 1987) a metoda extrakce za použití celulózy (Morris *et al.* , 1979). Efektivita těchto metod, resp. jejich selektivita na extrakci pouze dsRNA byla posouzena následným enzymatickým štěpením vzorků. Přítomnost nukleových kyselin byla vizualizovaná pomocí agarózové elektroforetické separace. Přítomnost dsRNA ve zkoumaném organismu naznačuje přítomnost dsRNA viru. Dvouvláknová RNA větší než několik set bp se totiž běžně nevyskytuje v organismech, existuje pouze jako genetický materiál dsRNA virů nebo meziprodukt replikace ssRNA virů. Houba obsahující dsRNA je brána jako houba obsahující mykovirus. Část izolované dsRNA byla použita pro elektroforézu, tedy samotnou detekci dsRNA, a část byla použita pro reverzní transkripci a molekulární klonování (viz kap. 3.6 a 3.7).

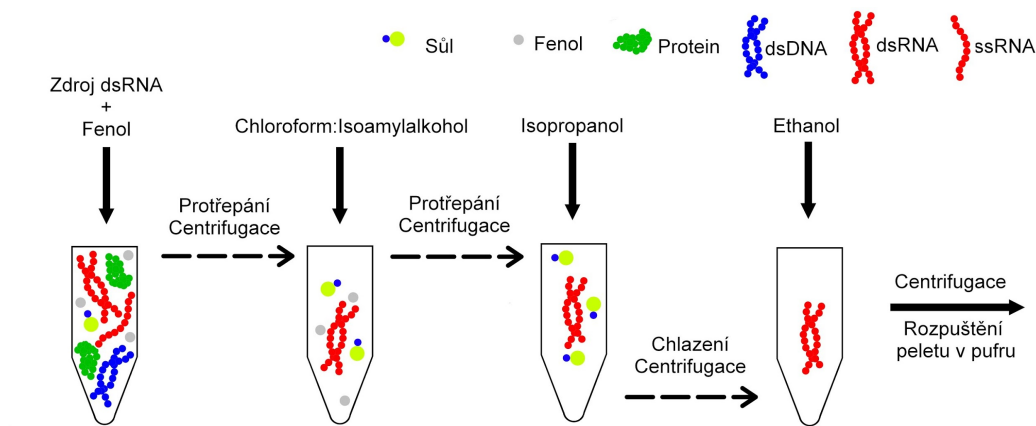
3.2.1 Extrakce kyselým fenolem

Postup

Zhruba polovina agaru prorostlého myceliem z Petriho misky byla přenesena do plastové centrifugační 50 ml zkumavky. K celkovému objemu směsi byl přidán jeden díl kyselého fenolu (pH 4,3 , Sigma-Aldrich) a zkumavky byly zhruba 3 minuty prudce protřepávány. Poté byly vzorky centrifugovány na 5 000 rpm po dobu 15 minut. Po centrifugaci byla svrchní vodní fáze reextrahována s dvěma díly chloroform:isoamylalkoholu (24:1) do 2ml mikrozkušavky. Po promíchání byly vzorky opět centrifugovány při 5 000 rpm na 15 minut. Svrchní fáze byla přenesena do nové mikrozkušavky a bylo k ní přidáno 0,75 dílu isopropanolu. Pro vysrážení nukleových kyselin prošly mikrozkušavky třemi cykly mražení a tání na suchém ledu. Po tomto kroku byly mikrozkušavky centrifugovány při 5 000 rpm 15 minut. Pouhým okem viditelné pelety nukleových kyselin byly promyty 60% ethanolem a rozpuštěny ve sterilní destilované vodě pro další uskladnění a manipulaci. Obr. č. 11 znázorňuje extrakci kyselým fenolem.

Vysvětlení

Tento postup je extrakce kapalina-kapalina. Využívá se rozdílných rozpustností různých typů biomolekul. V prvním kroku této extrakce je přidán kyselý fenol ke vzorku a tato směs je silně protřepána. Fenol je málo rozpustný ve vodě a nemísí se s ní. Silným protřepáním vzniká emulze, a část fenolu se dostává do vodní fáze a zde působí na proteiny. Fenol proteiny denaturuje,



Obrázek 11: Zjednodušené znázornění izolace dsRNA metodou kyselého fenolu. Vertikální šipky symbolizují přidané chemikálie, horizontální čárkované šipky symbolizují jaká část vzorku byla odebrána po provedení úkonu specifikovaného nad šipkou. Všechny kroky jsou pro jednoduchost znázorněny v mikroskopických Zdroj: Martin Mátl

tato nepolární látka obklopí polární proteiny a zatlačí polární rezidua aminokyselin dovnitř proteinu, čímž vytěsňuje vnitřní nepolární (hydrofobní) rezidua aminokyselin na povrch proteinu (Oswald, 2008). Takto jsou proteiny denaturovány a ztrácí rozpustnost ve vodě, stávají se rozpustné ve fenolu, nebo přecházejí do interfáze mezi vodní a organickou fází. Volné báze ssRNA jsou v kyselém prostředí protonovány a molekuly ssRNA se stávají méně polárními. Proteiny tedy přejdou do fenolové fáze, DNA a ssRNA přejde v kyselém prostředí taktéž do fenolu, což zanechá dsRNA ve vodní fázi. Tyto dvě fáze jsou pořád v emulzi, abychom s nimi mohli pracovat, musíme je oddělit centrifugací. Fenol je hustší než voda, tím pádem po centrifugaci bude nejsvrchnější vrstva vodní, pod ní je vrstva fenolová a úplně naspodu jsou pevné nečistoty. Ve vodní fázi je ale stále asi 7 % fenolu (Schürmann & Diederichs, 1964), fenolu který obsahuje i proteiny a DNA. To je velký podíl nečistot, a proto se k oddělené vodní fázi přidává chloroform-isoamylalkohol. Chloroform se taktéž nemísí s vodou, a po dalším protřepání se přesune většina zbývajících fenolu spolu s proteiny právě do chloroformové fáze. Isoamylalkohol je přípravek proti pění. Po opětovné centrifugaci se oddělí chloroformová hustší fáze a vodní méně hustá fáze. Ve vodní fázi je nyní dsRNA. Ve vodní fázi jsou ale i jiné látky a nečistoty, např. soli. Pro jejich oddělení se používá vysrážení nukleových kyselin ethanolem nebo isopropanolem. V prvním srážecím kroku se používá isopropanol. Ten je upřednostněn před ethanolem, protože 0,75 objemu isopropanolu je, pro naše účely, ekvivalentní 2 objemům ethanolu,

což je vzhledem k objemné vodní fázi prioritou. Srážení probíhá rychleji při nižších teplotách, proto je použit suchý led. Mnohé experimenty však naznačují, že použití nízkých teplot není nutné (Zeugin & Hartley, 1985). Některé publikace dokonce označují inkubace při nízkých teplotách za kontraproduktivní (Green & Sambrook, 2012). Původní postup však byl následován, proto bylo provedeno srážení za nízkých teplot. Po centrifugaci zůstane malý pelet na stěně mikrozkušavky. K němu je přidán ethanol, probíhá tzv. ethanolové srážení. Ethanol upraví chemicko-fyzikální vlastnosti roztoku tak, že rozpuštěné sodíkové ionty přilnou k záporně nabitě nukleové kyselině a vytvoří tak celek bez náboje - nepolární celek. Sodíkové ionty za pomoci ethanolu tudíž neutralizují ribonukleovou kyselinu (Piškur & Rupprecht, 1995). RNA je nyní nepolární a tudíž nerozpustná ve vodě, vysráží se a po centrifugaci ji vidíme jako pelet na stěně zkumavky. Tímto zbavíme vzorek zbylých nečistot. Po opětovné centrifugaci ethanol odstraníme, pelet necháme ve zkumavce částečně vysušit (Green & Sambrook, 2012) a resuspendujeme v požadovaném pufru. Pelet by měl být zcela rozpuštěn za 30-60 minut (Flegr, 1987). Takto připravená dsRNA je zmrazena a uchována pro další analýzy.

3.2.2 Extrakce celulórou

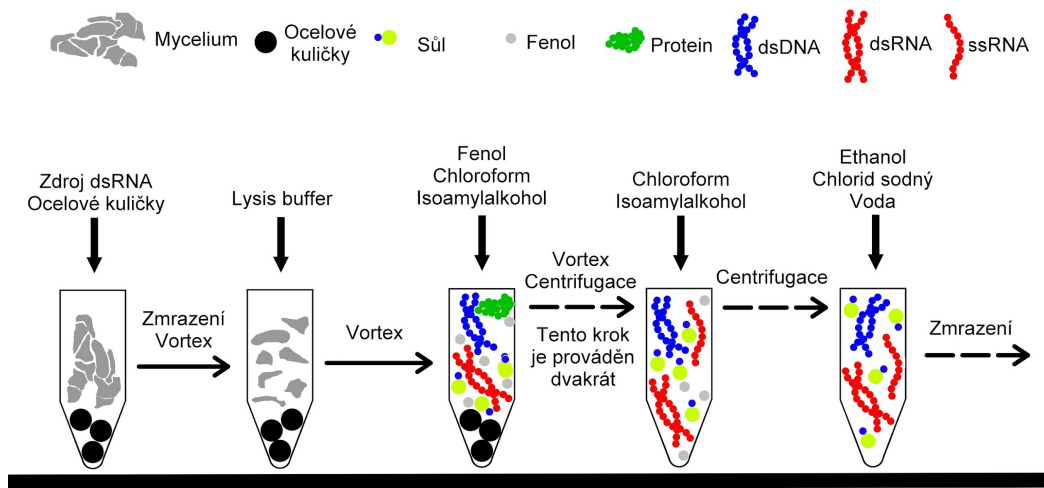
Postup

Staré mycelium z jedné Petriho misky bylo přeneseno do 50 ml plastové centrifugační zkumavky a k němu bylo přidáno několik ocelových kuliček. Směs byla ponořena do tekutého dusíku a po důkladném promrznutí byla vortexována po dobu tří minut. Do zkumavky byly přidány 2,5-3 ml lyzačního pufru a vzorek byl opět vortexován 3 minuty. Do buněčného lyzátu byly přidány 3 ml směsi fenol:chloroform:isoamylalkohol (v poměru 25:24:1) a vzorek byl vortexován 3 minuty a centrifugován 3 minuty na 14000 rpm. Vodní (svrchní) část byla přenesena do 1,5 ml mikrozkušavek a bylo k ní přidáno 300 μ l směsi fenol:chloroform:isoamylalkohol (v poměru 25:24:1) a vzorek byl opět vortexován po dobu tří minut. Vrstvy byly odděleny centrifugací na 14000 rpm 5 minut. Vodní (svrchní) vrstva byla přenesena do nové mikrozkušavky spolu s 300 μ l směsi chloroform:isoamylalkohol a opět vortexována 3 minuty a centrifugována při 14000 rpm 5 minut. Po centrifugaci byla vodní (svrchní) vrstva odebrána do nové mikrozkušavky a bylo k ní přidáno 30 μ l 5M NaCl a 250 μ l čistého ethanolu. Mikrozkušavka byla doplněna sterilní destilovanou vodou na 1,5 ml a vzorek byl inkubován při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 20 minut. Po zmražení vzorku a roztátí byla přidána Sigma Cell Cellulose zhruba po rysku 100 μ l a inkubována po dobu 10 minut. Celulóza se po pár minutách usadila na dně mikrozkušavky, a supernatant byl přenesen do kolony. K ce-

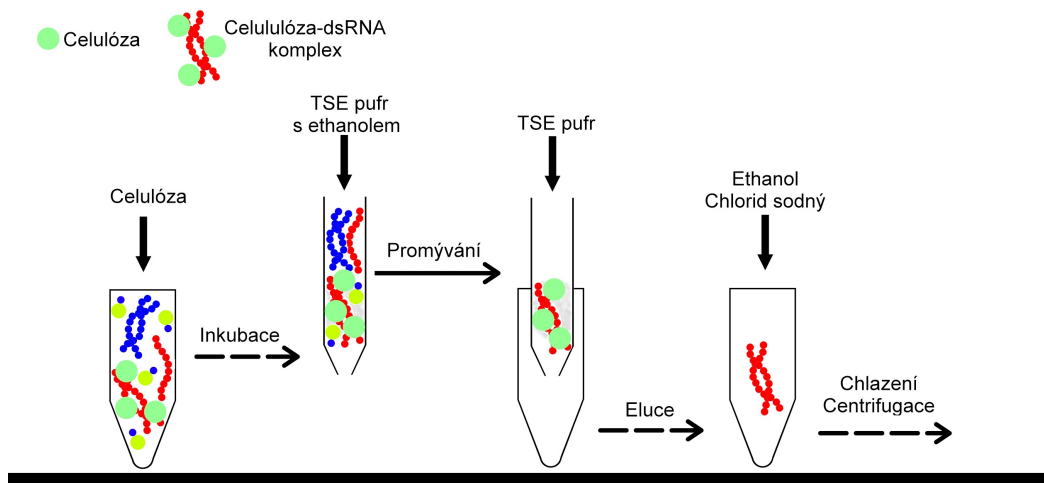
lulóze byl přidán 1 ml TSE pufru s 15% ethanolem a celá směs i s celulózou byla přenesena do kolony. Promýváním TSE pufrem s 15% ethanolem byla dsRNA stále navázaná na celulózu, kdežto rozpuštěné nečistoty byly unášeny proudem pufru. Promytá kapalina byla odstraněna. Kolona byla promyta čtrnáctkrát, pokaždé 1,2 ml pufru. Po promytí byla kolona naposledy naplněna 400 μ l TSE pufru bez ethanolu. Protékající kapalina byla zachycena do mikrozkuhavky a bylo k ní přidáno 30 μ l 5M NaCl a 1,5 ml čistého ethanolu. Vzorek byl v této směsi inkubován při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 20 minut. Vzorek byl centrifugován po dobu 20 minut na 14000 rpm a supernatant byl odstraněn. Pelet na dně mikrozkuhavky byl vysušen a resuspendován v 10 μ l nuclease-free DEPC vody. Po rozpuštění peletu můžeme se vzorkem dsRNA dále pracovat či uchovávat při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Vysvětlení

Zmražení vzorku v tekutém dusíku a následné rozemletí představují tzv. homogenizaci vzorku. Je rozrušeno mycelium a částečně buněčné stěny. Lyzační pufr úplně zničí membránové struktury díky detergentům, solím a kyselinám. Směs fenol:chloroform:isoamylalkohol denaturuje proteiny, a po centrifugaci proteiny a lipidy zůstanou v organické fázi. Ve vodní fázi při pH 8 zůstane DNA a RNA. Tento krok je zopakován pro vyšší čistotu nukleových kyselin. K získané vodní fázi je přidán chloroform:isoamylalkohol pro snížení množství rozpuštěného fenolu a tím pádem kontaminujících proteinů. Po centrifugaci je k vodní fázi přidáno 30 μ l 5M roztoku chloridu sodného a 250 μ l čistého ethanolu, objem je doplněn na 1,5 ml vodou. Při této koncentraci solí a ethanolu se dsRNA váže na celulózu. K tomu dochází při inkubaci. Celulóza je nerozpustná, a proto se v koloně zachytí a neprojde jí. Ostatní látky rozpuštěné ve vodě přes kolonu projdou. Kolona je čtrnáctkrát promyta TSE pufrem s ethanolem. Přítomnost ethanolu je v tomto kroku velice důležitá, ethanol udržuje dsRNA navázanou na celulóze. Při promývání není s pufrem odplavena jen dsRNA, která je imobilizovaná na celulóze. Finální promytí kolony TSE pufrem bez ethanolu umožní dsRNA opět se rozpustit v pufru. Protékající pufr s dsRNA zachytíme do nové mikrozkuhavky. Nyní je třeba vyčistit dsRNA od nežádoucích látek rozpuštěných v TSE pufru. To je docíleno ethanolovým srážením, viz extrakce kyselým fenolem. Pelet je poté rozpuštěn v DEPC vodě. Je to sterilní destilovaná voda ošetřená přísadkou DEPC, sloučeniny deaktivující ribonukleázy. Obr. č. 12 a obr. č. 113 schematicky znázorňují postup celulózové extrakce.



Obrázek 12: Zjednodušené znázornění izolace dsRNA metodou celulózy, první část. Vertikální šipky symbolizují přidání chemikálie, horizontální čárkované šipky symbolizují, jaká část vzorku byla odebrána po provedení úkonu specifikovaného nad šipkou. Zdroj: Martin Mátl



Obrázek 13: Zjednodušené znázornění izolace dsRNA metodou celulózy, druhá část. Vertikální šipky symbolizují přidání chemikálie, horizontální čárkované šipky symbolizují, jaká část vzorku byla odebrána po provedení úkonu specifikovaného nad šipkou. Zdroj: Martin Mátl

3.2.3 Enzymatické štěpení DNasou a S1 nukleasou

Část nukleových kyselin extrahovaných metodami výše byla natrávena enzymy degradujícími DNA a ssRNA. DNasa (New England Biolabs) naštěpila dsDNA i ssDNA ve vzorku a S1 nukleasa (Invitrogen) naštěpila jakékoliv jednovláčkové řetězce nukleových kyselin. Tím byla ve vzorcích zničena DNA a ssRNA, zůstala jen dsRNA. Štěpení bylo provedeno následovně.

Mastermixy jednotlivých enzymů byly připraveny odděleně podle doporučení výrobce. Mastermix se připravuje pro $n+1$ množství vzorků, kde n je skutečný počet vzorků. Pro optimální aktivitu jsou enzymy smíchány se substrátem v přítomnosti zvláštního pufru. Pufry jsou pro jednotlivé enzymatické reakce specifické. Obsahují nezbytné kofaktory pro funkci daného enzymu a jsou většinou prodávány společně s enzymem.¹ Do řádně označených mikrozkušavek bylo napipetováno následující množství enzymů a pufrů:

S1 nukleasa		DNasa	
Objem	Reagencie	Objem	Reagencie
0,5 μ l	S1 nukleasa (Invitrogen)	0,5 μ l	DNasa (NEB)
1,1 μ l	pufr (Invitrogen, 10X)	1,3 μ l	pufr (NEB, 10X)

Tabulka 1: Složky mastermixu pro enzymatické reakce S1 nukleasy a DNasy

Po přípravě mastermixu bylo do každého vzorku určeného ke štěpení připipetováno 1,6 μ l reakční směsi S1 nukleasy a vzorky byly inkubovány při 37 °C po dobu 30 minut. Po naštěpení S1 nukleasou přichází na řadu DNasa, z její reakční směsi bylo odpipetováno 1,8 μ l na každý vzorek. Vzorky byly opět inkubovány při 37 °C po dobu 30 minut. Enzymy byly deaktivovány (denaturovány) při teplotě 70 °C opět 30 minut. Inkubace proběhly v termobloku (Obr. č. 14). Takto připravené vzorky jsou naštěpené, a i když ssDNA, ssRNA a dsDNA v nich jsou přítomny, jsou naštěpeny na tak malé kousky, že je při elektroforetické separaci nedetekujeme.

3.2.4 Elektroforetická separace

Pro elektroforetickou separaci fragmentů nukleových kyselin a přibližné posouzení kvality a kvantity získané dsRNA byla použita standardní agarózová gelová elektroforéza. Do 100 mililitrů 0,5X TBE pufru byl přidán jeden gram agarózy (SERVA). Agaróza byla rozpuštěna za použití mikrovlnné trouby. Po zchlazení na cca 40-50 °C bylo k tomuto roztoku napipetováno 1,5 μ l barvy

¹Pufry jsou dodávány komerčně s enzymy, jejich složení není zveřejněno, protože je chráněno autorským právem.



Obrázek 14: Thermoblok. Na tomto zařízení byly inkubovány vzorky za zvýšené teploty. Zdroj: Martin Mátl

GelRed, tato barva se interkaluje do DNA a fluoreskuje pod UV světlem. Tekutá agaróza byla po přidavku barvy nalita do aparatury pro elektroforézu se zasazeným hřebenem pro vzorky. Po ztuhnutí agarózového gelu byl odstraněn hřeben, gel zalit 0,5X TBE pufrém a do vzniklých jamek byly napipetovány vzorky podle potřeby konkrétního experimentu.

Elektroforéza funguje na principu separace nabitých biomolekul podle hmotnosti. Agarózový gel s jamkami pro vzorky je vložen do aparatury. Poté je zalit pufrém. Je důležité, aby byl pufr stejného složení a koncentrace jako pufr, ze kterého je připraven gel samotný. Na dvou stranách aparatury jsou elektrody. Kladná elektroda je na straně dále od vzorků a záporná elektroda je na straně blíže ke vzorkům. Po napipetování vzorků do příslušných jamek je aparatura zapojena do zdroje o napětí 60-120 V. Záporně nabitě nukleové kyseliny jsou v tomto prostředí přitahovány ke kladné elektrodě na druhé straně gelu. Prostředí agarózy však zpomaluje cestu nukleových kyselin na konec gelu, a to tak, že kratší fragmenty se “propletou” agarózou rychleji než ty delší. Tím je dosaženo rozdělení fragmentů na základě hmotnosti. Po zhruba jedné hodině pod proudem je aparatura vypojena, zdroj vypnut a gel vyjmut z aparatury. Gel je pozorován pod UV světlem a výsledkem je soubor proužků v každé jamce odpovídající profilu nukleových kyselin v původní směsi utříděné podle délky (Green & Sambrook, 2012).

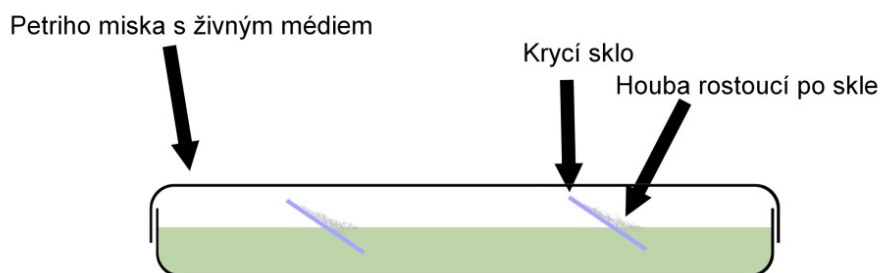
3.3 Porovnání myceliálního růstu

Rychlost růstu dsRNA pozitivního a dsRNA negativního izolátu *F. oxysporum* byla stanovena pozorováním růstu mycelia na PDA médiu.

Měření růstu bylo provedeno vždy v triplikátech, tudíž byly naočkovány tři Petriho misky pro každý kmen houby. Na spodní stranu každé Petriho misky s médiem byl nakreslen kříž. Takto byl vyznačen střed misky. Do tohoto místa bylo provedeno očkování vpichem. Očkování bylo provedeno jen do jednoho místa. Naočkované Petriho misky byly ponechány v pokojové teplotě na denním světle. Z místa vpichu rostlo mycelium kruhově a tento růst byl zaznamenáván. Vzorčky byly foceny po dvou, pěti a sedmi dnech od naočkování fotoaparátem Canon. V softwaru NIS elements 4.20.00 bylo provedeno měření průměru mycelia. Tyto údaje byly dále zpracovány v Microsoft Office Excel.

3.4 Sklíčkové kultury

Hyfy mikroskopických hub nemůžeme pozorovat pod mikroskopem standardním způsobem, při přenášení na podložní sklíčko bychom je totiž přetrhali a zničili. K mikroskopickému pozorování plísni se používá metoda sklíčkových kultur. Tato metoda spočívá v tom, že mycelium poroste krycí sklo, a to je možné vyjmout a pozorovat na něm víceméně neporušené hyfy. Takto lze sledovat rozdíly mezi kmeny houby a pořídit mikrofotografie. Zvláštní zřetel je dán na pozorování asexuálních spor, určovacího znaku *F. oxysporum*.



Obrázek 15: Zhotovení sklíčkových kultur. Krycí skla pro mikroskopování jsou zasunuty do živného agaru pod úhlem a na bod styku skla a agaru je naočkována houba. Obrázek zachycuje houbu rostoucí po krycím skle. Zdroj: Martin Mátl

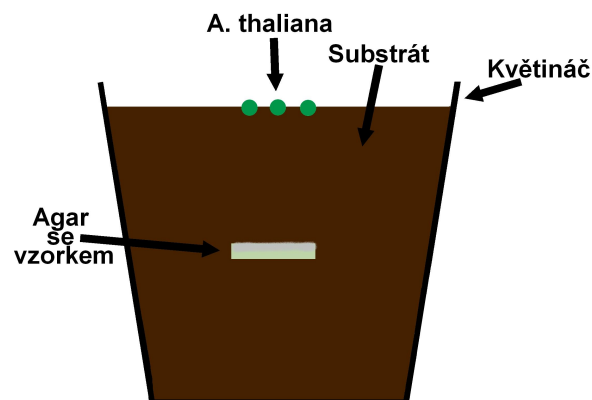
Postup pro zakládání sklíčkových kultur je následující. Do PDA média na Petriho misce zasuneme sterilní krycí sklo pod úhlem zhruba 45° Obr. č. 15

znázorňuje založené sklíčkové kultury. Očkovací jehlou přeneseme inokulum z mycelia do místa dotyku agaru a krycího skla. Krycích skel se na Petriho misku vleze několik, v tomto experimentu byly připraveny dvě krycí sklíčka od každého vzorku houby. Takto naočkované houby necháme rozrůst. Mycelium poroste po krycím skle směrem nahoru, mluvíme o vzdušném myceliu, i směrem dolů podél krycího skla do substrátu, mluvíme o substrátovém myceliu. Po několika dnech krycí sklo z agaru opatrně vyjmeme za okraj neporostlý myceliem, položíme na sklíčko podložní a pozorujeme neimerzním objektivem mikroskopu při zvětšení 400x.

3.5 Test patogenity na *Arabidopsis thaliana*

Porovnání interakcí rostlina-houba s dsRNA pozitivním a dsRNA negativním kmenem bylo studováno na rostlině *Arabidopsis thaliana* (ekotyp Columbia). Krátký životní cyklus, malá velikost, vysoká produkce semen, a velice malý genom dělají z tohoto nenápadného plevelu výborný rostlinný modelový organismus (Meyerowitz, 1987).

Malé květináče byly do poloviny naplněny sterilizovaným zahradnickým substrátem. Na substrát byly položeny 1 cm² velké výřezy PDA média porostlé myceliem. Z celkem patnácti květináčů obsahovalo pět květináčů kus agaru s myceliem dsRNA negativního kmenu, pět květináčů kus agaru s myceliem dsRNA pozitivního kmenu a pět květináčů kus sterilního agaru (kontrola). Zahradnickým substrátem byly květináče doplněny po okraj. Květináče byly zality a na povrch substrátu byla umístěna 3 semena *A. thaliana* (Obr. č. 16). I když je záměrem pozorovat pouze jednu rostlinu v květináči, byla vyseta tři semena. Kvůli nepříznivým podmínkám či nestopcentní klíčivosti nemusí všechna vyklíčit. Se třemi semeny v květináči roste šance, že alespoň jedno vyklíčí. Tato práce byla prováděna ve sterilním prostředí. Po vysetí byly květináče umístěny na slunné místo v laboratoři. Později došlo k vyplení tak, aby v každém květináči zbyla pouze jedna rostlina. Květináče byly zalévány podle potřeby a změny v růstu tří skupin byly sledovány.



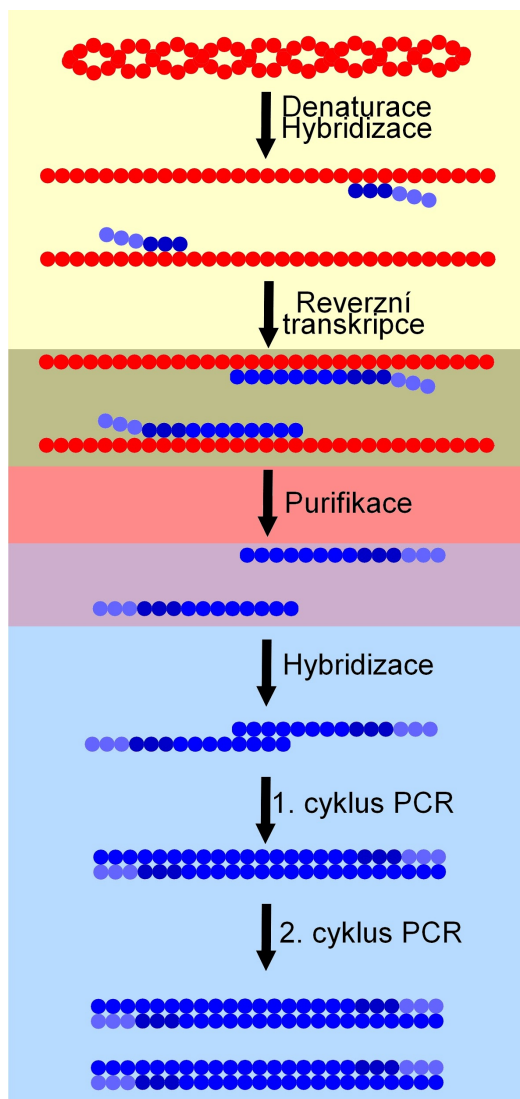
Obrázek 16: Schematické znázornění testu fytopatogenity. Průřez květináčem ukazuje experiment v den založení. Agar se vzorkem je ve středu květináče a semena *Arabidopsis thaliana* jsou na povrchu substrátu. Zdroj: Martin Mátl

3.6 Reverzně transkripční polymerázová řetězová reakce

RNA získaná extrakcí celulózou byla dále použita pro molekulární charakterizaci. V prvním kroku byla provedena reverzní transkripce, převedení RNA na stabilnější DNA. V druhém kroku byla tato DNA purifikována a v třetím kroku byla amplifikována pomocí polymerázové řetězové reakce. Polymerázová řetězová reakce (PCR) takto spojená s reverzní transkripcí bývá označována jako RT-PCR (Obr. č. 17). Metody adaptované podle Roossinck *et al.* (2010) a Khalifa & Pearson (2013) umožňují v principu jednoduchou transkripci dvouvláknových fragmentů do cDNA a jejich následnou amplifikaci PCR. V následující podkapitole je z těchto fragmentů připravena cDNA knihovna, přípravný krok pro sekvenaci.

3.6.1 Reverzní transkripce

Pro skladování a další molekulární analýzy je vhodné převést RNA na DNA. DNA je mnohem stabilnější než RNA díky ztrátě jedné hydroxylové skupiny. I tato malá změna činí DNA chemicky odolnější (Murray, 2012). V laboratoři se tato technika nazývá reverzní transkripce a je používána např. pro přepis mRNA a virové RNA do DNA (Green & Sambrook, 2012) a jejich následné sekvenace. Reverzní transkripce je proces opačný ke klasické transkripci. Provádí se enzymem nazývaným reverzní transkriptáza, neboli RNA-dependentní DNA polymeráza. Ten syntetizuje vlákno DNA komplementární



Obrázek 17: Schematické znázornění reverzně transkripční polymerázové řetězové reakce. Schéma následuje molekulární osud dvou komplementárních cDNA transkriptů napříč reverzní transkripcí (žluté pozadí), purifikací (červené pozadí) a PCR (modré pozadí). Konečným produktem 45 cyklů PCR jsou miliony molekul DNA (na obrázku neznázorněny). Zdroj: Martin Mátl

ke vláknu RNA. Reverzní transkriptáza byla objevena u virů skupiny VI a VII a za její objev byla udělena Nobelova cena (Baltimore, 1970).

Výběr primerů pro reverzní transkripci je klíčový. Neznáme přesnou sekvenci RNA, kterou chceme transkribovat, používáme proto náhodné primery. Náhodný primer znamená, že sekvence nukleotidů v něm není určena a zpravidla se liší. V náhodné směsi primerů z 12 nukleotidů jsou vlastně všechny kombinace 12ti nukleotidů v náhodném pořadí. Náhodný primer hybridizuje s komplementárním úsekem na templátové RNA. Díky velkému množství primerů ve vzorku a jejich různých sekvencích je jisté, že k sekvenci templátové RNA se najde několik komplementárních primerů. Kvůli důvodům důležitým pro průběh PCR reakce v sekci 3.6.3 je před náhodných 12 nukleotidů také vložena značka (“tag”). Je to krátký 14ti nukleotidový úsek DNA o známé sekvenci. Celkový primer má tím pádem 26 nukleotidů, 14 z nich je značka a 12 je náhodných. Celková sekvence primeru je 5'-CCT TCG GAT CCT CCN NNN NNN NNN NN-3' (Obr. č. 18).



Obrázek 18: Schematická znázornění primeru použitého pro reverzní transkripci. Písmena A, T, G a C znázorňují nukleotidy adeninu, thyminu, cytosinu a guaninu. Písmeno N znázorňuje náhodný nukleotid (z angl. any). Zdroj: Martin Mátl

Na začátku reakce je třeba připravit směs templátové RNA a primerů. V mikrozkušnicích bylo smícháno 11 μ l RNA z extrakce celulórou s 2 μ l primeru o koncentraci 20 μ M. Mikrozkušnice se vzorky a primery byly inkubovány při 65 °C po dobu 10 minut. Tím je docílena denaturace templátové RNA a primerů. Ke vzorkům byly přidány 4 μ l reakčního pufru, 0,5 μ l inhibitoru RNasy, 2 μ l dNTP směsi a 0,5 μ l reverzní transkriptázy. Je důležité zmínit, že reagenty a enzymy musí být přidávány do směsi v pořadí uvedeném v manuálu. Enzym je skladován krátkodobě v lednici. Po přidání enzymu byly vzorky ponechány při 25 °C 10 minut a poté inkubovány při 50 °C 60 minut. V tomto kroku dojde k samotné reverzní transkripci. Reverzní transkriptáza byla inaktivována 5 min inkubací při 85 °C. Reverzní transkripci popisuje tab. č. 2.

Objem	Reagencie	Fin. množ.	Inkubace
11 μ l 2 μ l	Templátová RNA Primer pro reverzní transkripci	neznámé 2 μ M	10 minut při 65 °C
4 μ l 0,5 μ l	Pufř pro reverzní transkripci Inhibitor RNasy	1X 20 U	10 minut při 25 °C
2 μ l 0,5 μ l	Směs dNTP Reverzní transkriptáza	4 μ M 10 U	60 minut při 50 °C

Tabulka 2: Rozpis složek reakční směsi pro reverzní transkripci. Finální množství je uvedeno pro samotný krok reverzní transkripce s objemem 20 μ l a vyjadřuje počet enzymových jednotek pro enzymy, koncentraci v doporučených jednotkách pro pufry, a ostatní složky v molární koncentraci. Sloupec inkubace vyjadřuje délku a teplotu inkubace daných a předchozích složek směsi. Zdroj: Martin Mátl

3.6.2 Purifikace RT produktu

K odstranění enzymů, primerů, RNA templátu a ostatních kontaminantů potenciálně inhibujících následující PCR reakci od žádané cDNA pro amplifikaci byla použita dvoufázová purifikace. V první fázi byla veškerá RNA naštěpena enzymem RNasa A. V druhé fázi byla enzymaticky naštěpená RNA, primery a enzymy odděleny od cDNA prostřednictvím purifikační sady QIAquick PCR Purification Kit od firmy Qiagen. Přesný princip funkce těchto komerčních souprav je předmětem autorského práva a není zcela zveřejněn. Složení pufřů a reagentů není známo a jsou označeny heslovitě. Hlavním rysem tohoto PCR purifikačního kitu je selektivní vazba DNA na centrifugační kolonu a následné promývání různými pufry, které odmyjí nechtěné kontaminanty. Svým principem je tento postup analogický k RNA extrakci celulózu.

Enzymatické štěpení RNA v post-RT reakční směsi bylo docíleno RNasou A. 1 μ g RNasy A (objem 1 μ l) byl napipetován do každého vzorku post-RT reakční směsi. Vzorky byly inkubovány při pokojové teplotě po dobu 15 minut, v tomto kroku došlo k samotnému enzymatickému štěpení. RNasa byla inaktivována při 85 °C po dobu 2 minut. Takto ošetřené vzorky nyní mohou přejít do druhé fáze, purifikace.

Následující procedurou byla provedena purifikace cDNA (Quick-Start Protocol QIAquick® PCR Purification Kit). 5 objemů PB pufřu bylo přidáno k 1 objemu reverzně transkripční post-reakční směsi. Tato směs byla přenesena do centrifugační kolony z kitu. Tato kolona byla centrifugována 30-60 sekund, v tomto kroku se DNA navázala na kolonu. Protékající fáze byla odstraněna. Ke koloně bylo přidáno 0,75 ml PE pufřu, kolona byla centrifugována a protékající fáze odstraněna. Po tomto kroku byla kolona opět centrifugována pro odstranění zbývajících pufřů. Svrchní část kolony byla přenesena do čisté

1,5 ml mikrozkuhavky a na střed kolony bylo umístěno 20 μ l EB pufru a kolona byla ponechána jednu minutu pro eluci DNA z kolony. Centrifugací po dobu 60 s byla v mikrozkuhavce získaná přečištěná cDNA.

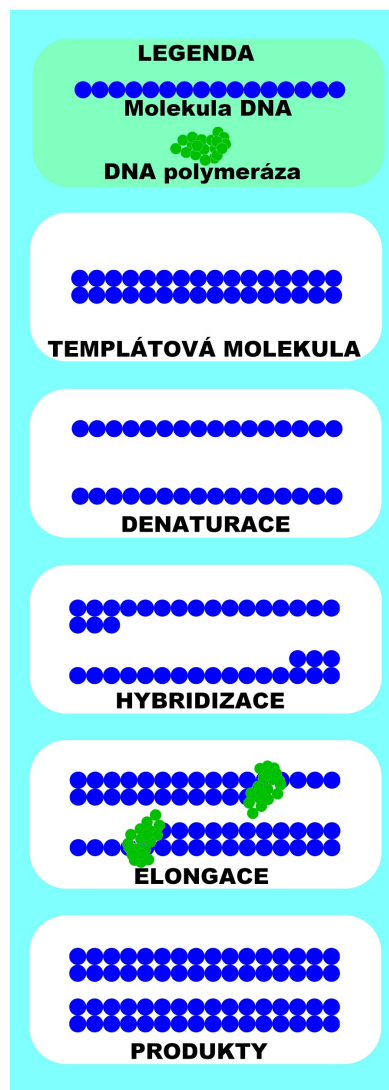
3.6.3 Polymerázová řetězová reakce

Tuto čistou cDNA je nyní nutno amplifikovat, namnožit. Toho je docílenou technikou polymerázové řetězové reakce, PCR (Green & Sambrook, 2012). V ní je DNA polymeráza spolu s templátovou DNA, primery a deoxynukleotidy inkubována cyklicky při různých teplotách. Střídání teplot způsobuje změny konformace DNA a umožňuje promyšlenou enzymaticky katalyzovanou řetězovou reakci, jejíž produktem je exponenciálně stoupající množství DNA v reakční zkuhavce (Saiki *et al.*, 1988). Teoreticky je možno z jediné molekuly templátové DNA získat miliardy identických molekul v řádech hodin.

Stručný popis PCR

Teploty při kterých PCR probíhá jsou tři. První je fáze denaturace. Při teplotě 90 - 96 °C jsou přerušeny vodíkové můstky mezi dusíkatými bázemi jednotlivých řetězců v templátové dvouřetězcové DNA a tyto řetězce se rozestoupí. V druhé fázi, při teplotě kolem 50 °C se vodíkové vazby obnoví, ale s krátkými, uměle nasyntetizovanými oligonukleotidy zvanými primery. Primery se připojí na základě komplementarity bazí k templátové DNA. Mluvíme o hybridizaci či nasedání primerů. Tyto primery jsou do reakční směsi přidávány cíleně a pro každou reakci jsou jedinečné. V poslední fázi, zhruba 70 °C začne pracovat termostabilní DNA polymeráza.

Ta syntetizuje vlákno komplementární k templátové DNA od primeru ve směru 5' → 3' (Lehman *et al.*, 1958). Polymeráza přidává nukleotidy podle Watson-Crickovského párování, tedy G k C a A k T. Nyní máme dvě dvouřetězcové molekuly DNA z jedné dvouřetězcové mole-



Obrázek 19: Schématické znázornění jednoho cyklu PCR. Zdroj: Martin Mátl

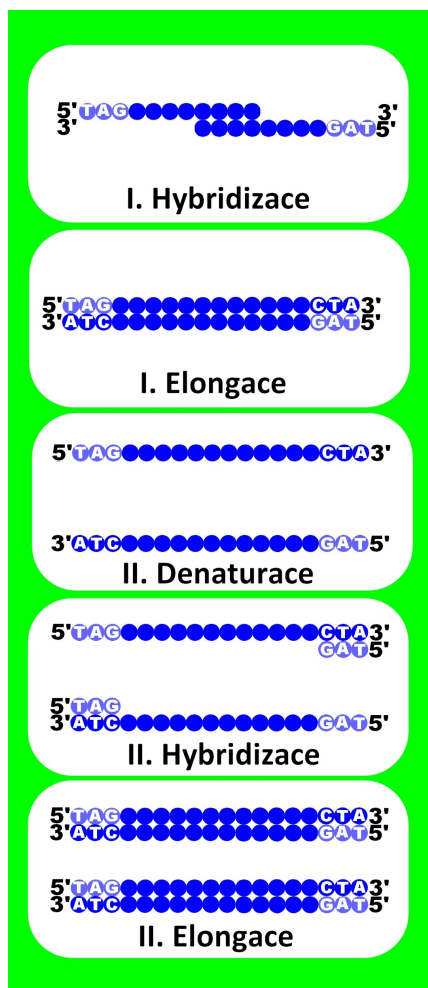
kuly DNA v jednom cyklu reakce. V klasické PCR je těchto cyklů 25 - 35, a produkty každé reakce vstupují do reakce bezprostředně následující, tím pádem se po dokončení cyklu tří teplot vždy zdvojuje množství DNA. Amplifikován je pouze úsek ohraničen primery, ty jsou proto klíčové pro úspěch PCR. Obr. č. 19 ilustruje princip metody PCR. Tabulka č. 3 udává složky reakční směsi pro PCR.

Objem	Reagencie	Fin. množ.
2,5 µl	<i>Taq</i> pufr (10X, Top Bio)	1X
1 µl	Primer 5'-CCT TCG GAT CCT CC-3'	0,78 µM
1 µl	Směs dNTP	200 µM
20 µl	cDNA templát	neznámé
1 µl	<i>Taq</i> polymerasa 1.1 (Top Bio)	1 U

Tabulka 3: Rozpis složek pro PCR. Ve sloupci množství je pro enzymy uveden celkový počet jednotek (U), pro primery a jiné chemikálie molární koncentrace a pro pufr doporučená koncentrace. Zdroj: Martin Mátl

Pro úspěch reakce je důležitá volba DNA polymerázy. Používány jsou termostabilní polymerázy schopné vydržet teploty okolo 90 °C bez změny funkčnosti. Právě objev této polymerázy z termofilní bakterie *Thermus aquaticus* umožnil široké využití této metody. Všechny polymerázy pro začátek syntézy potřebují krátký dvouřetězcový úsek. Ten vznikne z denaturovaného vlákna nasednutím primeru. Primer může být v PCR reakci náhodný nebo navržený. Náhodné primery jsou oligonukleotidy s náhodným či nedefinovaným zastoupením a uspořádáním dusíkatých bazí. Neznáme jejich sekvenci. S určitou pravděpodobností tyto náhodné fragmenty najdou komplementární sekvenci na templátové DNA a nasednou na ni. Navržené primery jsou primery s definovanou a cíleně určenou sekvencí. Na templátovou DNA se navážou jen v cílovém místě. Když chceme např. amplifikovat gen pro inzulin, najdeme si jeho sekvenci a vybereme bezprostředně před ní a bezprostředně za ní sekvence 15-25 nukleotidů vyskytující se jen a pouze před a pouze za tímto genem, nikde jinde v genomu cílového či jakéhokoli jiného organismu. Amplifikován bude jen žádaný gen. Reakce je provedena v jediné mikrozkušence o objemu 0,2 ml.

Polymerázová řetězová reakce virové cDNA



Obrázek 20: Schematické znázornění prvního cyklu PCR cDNA. V tomto cyklu dojde k regeneraci druhého místa pro nasedání primerů. Zdroj: Martin Mátl

Vzhledem k náhodnosti primerů použitých pro reverzní transkripci je možné, že každý transkript se v post-reakční směsi vyskytuje právě jen jednou. Nicméně vzhledem k tomu, že transkripty všechny pocházejí z jedné dsRNA, pravděpodobně dochází k jejich překryvu. Toho je využito pro regeneraci druhého místa k nasednutí primerů.

Druhé místo pro hybridizaci primerů vznikne v prvním PCR cyklu, a to po nasednutí dvou překrývajících se vláken a následné elongaci. Tím je nasynthetizován zbytek vlákna podle vlákna komplementárního, byla vytvořena dsDNA identická ke krátké části původní dsRNA s přidávanými místy o známé sekvenci pro nasedání primerů. Další cykly PCR již probíhají normálním způsobem. Je vhodné připomenout, že kdyby templátem byla jen jednořetězcová molekula, tato PCR by neproběhla, neboť by v prvním cyklu nevzniklo druhé místo pro nasedání primerů. Samotný průběh PCR reakce, přesněji první cyklus, je naznačen v obr. č. 20. Každá DNA polymeráza pracuje lehce odlišným způsobem. Důležitá vlastnost *Taq* DNA polymerázy neznázorněná na obr. č. 20 je přidání jednoho nepárového adeninového nukleotidu na 3' konec syntetizované DNA molekuly. Tento přesah je důležitý pro buněčnou funkci polymerázy, a je využíván i v molekulárně biologických metodách, konkrétně při ligaci v další kapitole.

Přístroj zajišťující cyklické změny teplot se nazývá thermocycler. Tento jednoduchý stroj je navržen tak, aby byl schopen mikrozkušavky s reakční směsí ohřívat a zchlazovat cyklicky podle nastavených teplot. Ohřívání a chlazení probíhá pomocí kombinace ventilátoru a Peltierova článku. Na jednoduchém displeji (dotykový nebo s tlačítky) je možné přes jednoduché grafické uživatelské rozhraní nastavit parametry reakce (Tab. č. 4). To zahrnuje na-

stavení teplot a dob pro průběh jednotlivých cyklů. Počet cyklů je také zadán. Většina PCR reakcí také začíná dlouhou denaturací při vysoké teplotě a končí delší elongací. Tyto kroky zajišťují důkladnou denaturaci všech templátových molekul v prvním kroku a kompletní elongaci v kroku posledním. Většina PCR reakcí probíhá 2 - 3 hodiny, a thermocycler je nastaven tak, aby po dokončení vzorky chladil na 4 °C (například přes noc).

Příprava a provedení samotné PCR reakce je jednoduchá. V jedné mikrozkušavce byl připraven mastermix z PCR pufru, primeru, deoxynukleosidtrifosfátů a DNA polymerázy (Tab. č. 3). Mastermix byl rozdělen do mikrozkušavek pro vzorky. K němu byla připipetována templátová cDNA. Takto připravené vzorky jsou připravené pro PCR. Jednotlivé mikrozkušavky byly vloženy do thermocycleru a odpovídající PCR program byl zahájen (Tab. č. 4).

Ověření úspěchu PCR reakce bylo provedeno agarózovou gelovou elektroforézou podle protokolu v sekci 3.2.4.

Fáze	Teplota(°C)	Čas(mm:ss)	Opakování
Iničiační denaturace	94	3:00	1X
Denaturace	94	0:30	45X
Nasedání primerů	94	0:30	45X
Elongace	94	1:00	45X
Finální elongace	94	10:00	1X

Tabulka 4: Parametry PCR reakce. Zdroj: Martin Mátl

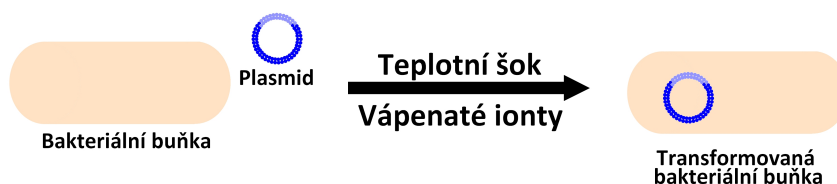
3.7 Příprava cDNA knihovny

Vložení fragmentů cDNA z RT-PCR do plasmidu získáme rekombinantní plasmid. Transformací *E. coli* tímto rekombinantním plasmidem získáme spolehlivý zdroj insertové DNA. Plasmid v *E. coli* zůstává a s každou novou buňkou se zkopíruje i plasmid. Této metodě se říká molekulární klonování. Množina bakteriálních kolonií, každá obsahující jeden úsek insertové DNA stejného původu, se nazývá cDNA knihovna. Tyto bakterie jsou jednoduše uchovávány a kultivovány, plasmid je možné z nich extrahovat a použít pro další molekulární analýzy, např. sekvenování. Jelikož každá kolonie obsahuje odlišný fragment, je možné na jedné Petriho misce s transformovanými bakteriemi mít celý genom viru. Příprava cDNA knihovny je nutná pro další sekvenaci virového genomu. Většina sekvenačních metod nesekvencuje celý fragment DNA, prvních několik nukleotidů vynechá. Tomu se lze vyvarovat

právě sekvenováním cílové DNA vložené do plasmidu, prvních pár vynechaných nukleotidů jsou plasmidového původu a sekvenován je insert beze ztrát.

3.7.1 Ligace cDNA a plasmidu

Insertová DNA a plasmidový vektor musí být spojeny v jednu molekulu. Tento proces se nazývá ligace (Obr. č. 21). Ligaci katalyzuje enzym DNA ligáza (Promega). Použitý plasmidový vektor je pGEM®-T linearizovaný vektor (Promega). Na 3' koncích plasmidové DNA je jeden thyminový nukleotid. RT-PCR produkt z předchozí reakce má komplementární adeninový nukleotid na svém 3' konci. Tyto úseky k sobě samovolně přilehnou svými komplementárními T/A konci. Přidáním enzymu DNA ligáza jsou tyto úseky spojeny vytvořením kovalentní fosfodiesterové vazby mezi 5' fosforem (fosforečnou skupinou) a 3' hydroxyskupinou dvou nukleotidů. Produktem reakce je plasmid s vloženou insertovou DNA (Holton & Graham, 1991).



Obrázek 21: Schéma ligace insertu a plasmidu DNA ligázou s TA přesahy. Jednonukleotidové thyminové a adeninové přesahy se spojí vodíkovými můstky podle komplementarity bazí a DNA ligáza dvě molekuly spojí v jednu vytvořením nových fosfodiesterových vazeb. Vyznačena je 3' a 5' direkcionalita molekul. Zdroj: Martin Mátl

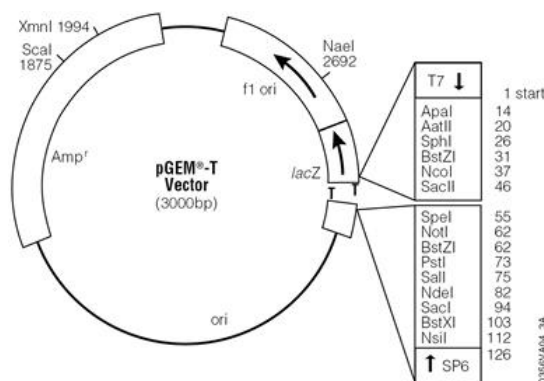
Složky směsi byly napipetovány do mikrozkušavek (Tab. č. 5). Dva vzorky a jedna kontrola byly inkubovány při 10 °C přes noc. Důležitá je opatrná manipulace s enzymy. Ty jsou do reakčních směsí obecně přidávány nejpozději. Když se s nimi bezprostředně nepracuje, jsou uchovávány krátkodobě v lednici při 4 °C.

Objem	Reagencie	Fin. množ.	Inkubace
1 µl	pGEM®-T vektor (Promega)	50 ng	12 h 10 °C
1 µl	T4 DNA ligáza (Promega)	3 U	
5 µl	2X Rapid Ligation Buffer (Promega)	1X	
5 µl	Insertová cDNA	neznámé	

Tabulka 5: Složení reakční směsi pro ligaci na jeden vzorek. Ve sloupci množství je pro plasmid uvedena hmotnost, pro pufr je uvedena doporučená koncentrace a pro enzymy je uveden počet jednotek (U) v reakci. Zdroj: Martin Mátl

pGEM®-T linearizovaný vektor

Linearizovaný vektor znamená, že plasmid není v přirozené kružnicové formě, ale je naštěpen v jednom místě. Na 3' konce tohoto místa jsou přidány thyminová rezidua. To umožňuje jednoduchou ligaci na základě kompatibility T/A konců. Prostřednictvím tzv. plasmidové mapy se znázorňují všechny geny, restriční místa a primer-komplementární sekvence na daném plasmidu (Obr. č. 22). Na plasmidu se nachází gen k rezistenci vůči antibiotiku ampicillinu. Po transformaci jsou bakterie naočkovány na živné médium obsahující ampicillin. Bakterie postrádající rezistenci k němu, tzn. bakterie postrádající plasmid jsou tímto antibiotikem zlikvidovány. Rezistenční gen je tudíž “selekcí marker”.



Obrázek 22: Mapa vektoru pGEM®-T. Insert je vložen mezi thyminové přesahy. Vektor obsahuje mnoho restričních míst. Amp^r označuje gen kódující rezistenci vůči ampicillinu, běžnému antibiotiku. Zkratka ori označuje místo počátku replikace plasmidu (origin of replication). V pravém sloupci je výčet restričních míst pro restriční endonukleázy. Zkratky T7 a SP6 označují promotory. Zdroj: Promega, pGEM(R)-T and pGEM(R)-T Easy Vector Systems Technical Manual

3.7.2 Příprava kompetentních buněk

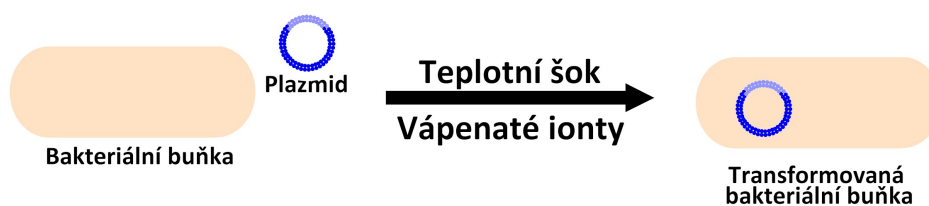
Pro molekulární klonování byl zvolen *Escherichia coli* kmen DH5 α . Postrádá geny pro některé exonukleázy a rekombinaci, což z něj dělá ideální vektor pro přípravu cDNA knihoven pro sekvenování (Taylor *et al.* , 1993). Je to tzv. neexpresní kmen. Bakteriální buňky jsou ošetřeny speciálním způsobem, aby se z nich staly buňky kompetentní. Takové buňky jsou ochotny přijímat extracelulární DNA (Solomon & Grossman, 1996). Samotná příprava kompetentních buněk spočívá ve vystavování buněk teplotním výkyvům a zvýšené koncentraci Ca²⁺ iontů.

1. Buňky *Escherichia coli* kmen DH5 α (Novagen) byly naočkovány do 2 ml tekutého LB média a ponechány na třepačce při 37 °C přes noc.
2. Druhý den byla kultura přeočkována do 110 ml tekutého LB média a inkubována při 37 °C dokud nedosáhla optické hustoty OD 0,3 - 0,5.
3. Kultura byla rozdělena po 50 ml do sterilních chlazených kyvet a kyvety byly chlazeny 10 minut na ledu.
4. Po chlazení byly kultury centrifugovány 7 minut při 1 680 g a 4 °C. Supernatant byl odstraněn a pelet byl resuspendován ve 20 ml vychlazeného 50 mM roztoku CaCl₂.
5. Směs byla inkubována 145 minut na ledu a centrifugována 7 minut při 1 680 g a 4 °C.
6. Supernatant byl odstraněn a pelet resuspendován v 1 ml vychlazeného 72 mM CaCl₂.
7. Ke směsi bylo připipetováno 230 μ l 80% glycerolu a směs byla aliquotována po 100 μ l do zkumavek a uchována při -80 °C.

3.7.3 Transformace teplotním šokem

Jako transformace se označuje genetická modifikace organismu exogenní DNA (Chen & Dubnau, 2004). V tomto případě transformujeme kompetentní buňky *E. coli* plasmidem obsahujícím fragment transkribované virové genetické informace (Obr. č. 23). Kompetentní buňky jsou při transformaci teplotním šokem spolu s plasmidem vystaveny výkyvům teplot. Plasmid, za normálních podmínek negativně nabitá DNA, je v pufru obalen Ca²⁺ ionty a náboj je neutralizován. Taková neutrálně nabitá molekula projde díky teplotnímu šoku přes buněčnou stěnu *E. coli* a dostane se do buňky. Šance, že bakterie

plasmid přijme, se zvyšuje v nepříznivých podmínkách, proto bakterie vystavujeme nepříznivým, ale definovaným podmínkám. Bakterie, které přijaly plasmid označujeme jako transformované. Replikují plasmid když se samy dělí a syntetizují podle něj proteiny. Plasmid pGEM®-T s vloženou insertovou DNA (viz sekce 3.7.1) byl transformován do kompetentních buněk *Escherichia coli* DH5α (viz sekce 3.7.2). Mikrozkuhavky s aliquoty kompetentních buněk uchovávané při -80 °C byly přeneseny na led. V tomto stádiu jsou buňky citlivé na stres z vnějšího prostředí, rozmrznutí musí proběhnout pozvolna. Ke kompetentním buňkám bylo přidáno 12 µl zligovaného plasmidu a buňky s plasmidem byly inkubovány na ledu 30 minut. Teplotní šok byl proveden 45s inkubací při 42 °C a následným chlazením na ledu dvě minuty. Disrupce buněčné stěny při zvýšené teplotě umožní vniknutí plasmidu. Integrita bakteriálních buněk je obnovena při nižších teplotách. V části bakteriálních buněk je nyní přítomen plasmid, mluvíme o transformovaných buňkách. Bylo k nim přidáno 900 µl LB média a následovala hodinová inkubace při 37 °C na stolní třepačce (300 rpm). Tato fáze se nazývá regenerace. V médiu může kultura růst a začít s expresí plasmidu. U transformovaných bakterií dochází k expresi genu kódujícího resistenci vůči ampicillinu. Regenerované buňky byly centrifugovány 2 minuty na 5000 rpm a 800 µl supernatantu bylo odebráno. Propipetováním byl buněčný pelet na dně mikrozkuhavky promíchán se zbytkem kapaliny ve zkuhavce. Zhruba 200 µl této transformované bakteriální suspenze bylo inokulováno na Petriho misky s LB médiem a ampicillinem (100 µg/ml). Petriho misky s *E. coli* byly inkubovány při 37 °C (Green & Sambrook, 2012). Transformované buňky jsou rezistentní vůči ampicillinu a přežijí na médiu, ale buňky bez plasmidu postrádají gen pro resistenci a tak je ampicilin zničí (Bush & Sykes, 1984).



Obrázek 23: Schematické znázornění bakteriální transformace jedné bakteriální buňky teplotním šokem. Bakteriální buňka spolu s plasmidem jsou vystaveny teplotnímu šoku v přítomnosti Ca^{2+} iontů. Plasmid vnikne do buňky a výsledkem je transformovaná bakteriální buňka. Zdroj: Martin Mátl

3.7.4 Colony PCR

Pro zjištění přítomnosti či absence inserové DNA v transformovaných kulturách byla provedena colony PCR. Tato PCR metoda zakládá na použití bakteriálních buněk jako templátové DNA pro PCR. Primery jsou voleny tak, aby obklopovaly insertovou DNA, pro naše potřeby byl použit primer z PCR amplifikace inserové DNA. Tato PCR je ve své podstatě identická s tou v sekci 3.6.3., ale jejím hlavním cílem je posoudit přítomnost insetové DNA v jednotlivých bakteriálních koloniích. Očekávaným produktem jsou fragmenty DNA v přibližné velikosti insertu. Vizualizace proběhla opět na standardní agarózové gelové elektroforéze.

Pro colony PCR byl připraven master mix na deset vzorků (tudíž s jedním vzorkem navíc) podle upraveného protokolu ze sekce 3.6.3 (Tab. č. 6). Master mix byl rozpipetován po 25,5 l do deseti 0,2 ml PCR mikrozkušavek. Jako templátová DNA byly použity bakteriální kolonie. Špičkou mikropipety byly kolonie z povrchu živného média na Petriho misce nabrány a přeneseny do příslušné mikrozkušavky. Tato práce byla provedena asepticky v UV boxu. Čtyři mikrozkušavky obsahovaly čtyři různé kolonie z transformace dsRNA pozitivního vzorku, další čtyři mikrozkušavky obsahovaly čtyři různé kolonie z transformace dsRNA negativního kmenu a poslední dvě zkumavky obsahovaly dvě různé kolonie z kontrolní transformace. Vzorky z kontrolní transformace zde slouží jako negativní kontrola - v plasmidech kontrolních bakterií je kontrolní insertová DNA. Ta neobsahuje insert ohraničený sekvencí komplementární s použitým primerem. Tudíž musí nutně vyjít negativně. Bakteriální buňky byly zničeny a zlyzovány prodlouženou denaturací, 10 minut při 94 °C. Všechny ostatní parametry reakce byly shodné s protokolem polymerázové řetězové reakce virové cDNA sekce 3.6.3 (Tab. č. 7). Vyhodnocení Colony PCR bylo provedeno metodou agarózové gelové elektroforézy stejně jako v sekci 3.2.4.

Objem	Reagencie	Fin. množ.
2,5 µl	<i>Taq</i> pufr (10X, Top Bio)	1X
1 µl	Primer 5'-CCT TCG GAT CCT CC-3'	0,78 µM
1 µl	Směs dNTP	200 µM
20 µl	Voda	
1 µl	<i>Taq</i> polymerasa 1.1 (Top Bio)	1 U

Tabulka 6: Rozpis složek pro Colony PCR master mix. Ve sloupci množství je pro enzymy uveden celkový počet jednotek (U), pro primery a jiné chemikálie molární koncentrace a pro pufr doporučená koncentrace. Zdroj: Martin Mátl

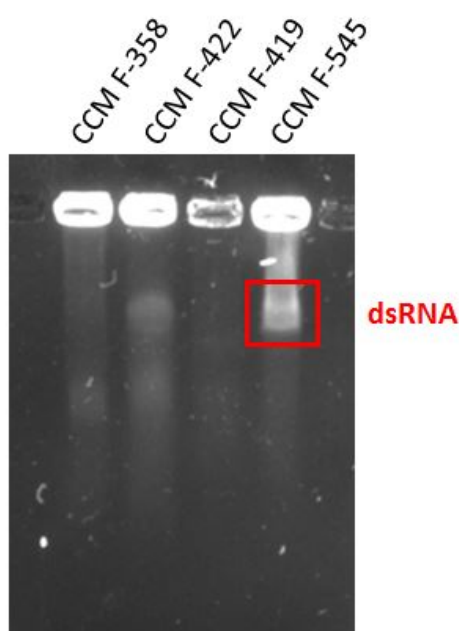
Fáze	Teplota(°C)	Čas(mm:ss)	Opakování
Iničiační denaturace	94	10:00	1X
Denaturace	94	0:30	45X
Nasedání primerů	94	0:30	45X
Elongace	94	1:00	45X
Finální elongace	94	10:00	1X

Tabulka 7: Parametry Colony PCR reakce. Zdroj: Martin Mátl

4 Výsledky

4.1 Detekce dsRNA

Z devíti kmenů *F. oxysporum* v České sbírce mikroorganismů byly vybrány čtyři pro izolaci dsRNA. Izolace byla provedena metodou kyselým fenolem (Flegr, 1987) i celulózou (Morris *et al.*, 1979). Tyto dva nezávislé způsoby izolace dsRNA potvrdily její přítomnost. Přítomnost proužku na gelu naznačuje přítomnost dsRNA ve zkoumaném vzorku, naopak jeho absence svědčí o její nepřítomnosti (Obr. č. 24).



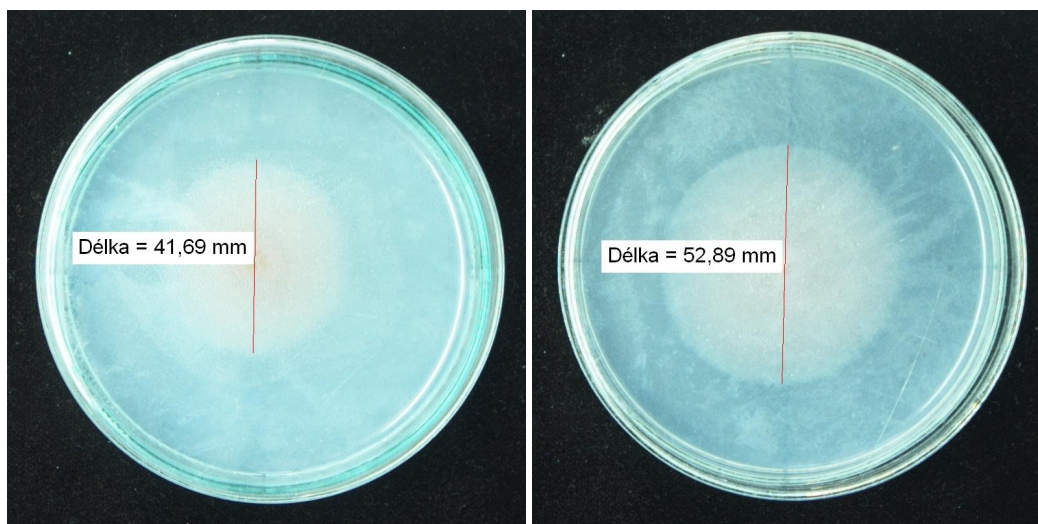
Obrázek 24: Fotografie agarózového gelu enzymaticky štěpených vzorků z izolace kyselým fenolem. Světlý proužek značí přítomnost dsRNA ve vzorku. Zdroj: Martin Mátl

Kmen *F. oxysporum* CCM F-545 byl vyhodnocen jako dsRNA obsahující kmen kvůli nejjasnějšímu proužku na gelu. Je možné, že jamky 1 a 2 také obsahují dsRNA, ale kvůli reprodukovatelnosti výsledků a jasnosti proužku byl jako vzorový dsRNA-pozitivní kmen zvolen *F. oxysporum* CCM F-545. Kmen *F. oxysporum* CCM F-419 byl vyhodnocen jako dsRNA neobsahující kmen. Tyto dva kmeny byly použity jako reprezentativní kmeny dsRNA pozitivního a dsRNA negativního izolátu *F. oxysporum*. Výskyt dsRNA v izolátu *F. oxysporum* poukazuje na přítomnost mykoviru.

4.2 Porovnání myceliálního růstu

Rozdíl v rychlosti růstu mycelií byl stanoven na PDA médiu. Dva kmeny *F. oxysporum*, dsRNA pozitivní a dsRNA negativní, byly naočkovány do středu misky a foceny po dvou, pěti a sedmi dnech od naočkování. Fotografie byly pořízeny softwarem NIS elements ver. 4.20.00. V tomto programu bylo také provedeno měření průměru mycelií. Průměry mycelií byly vykresleny na grafu v závislosti na vzorku a na počtu dní od inokulace. Po sedmi dnech růstu mycelií byl experiment ukončen z obav o přerůstání mycelií přes Petriho misky.

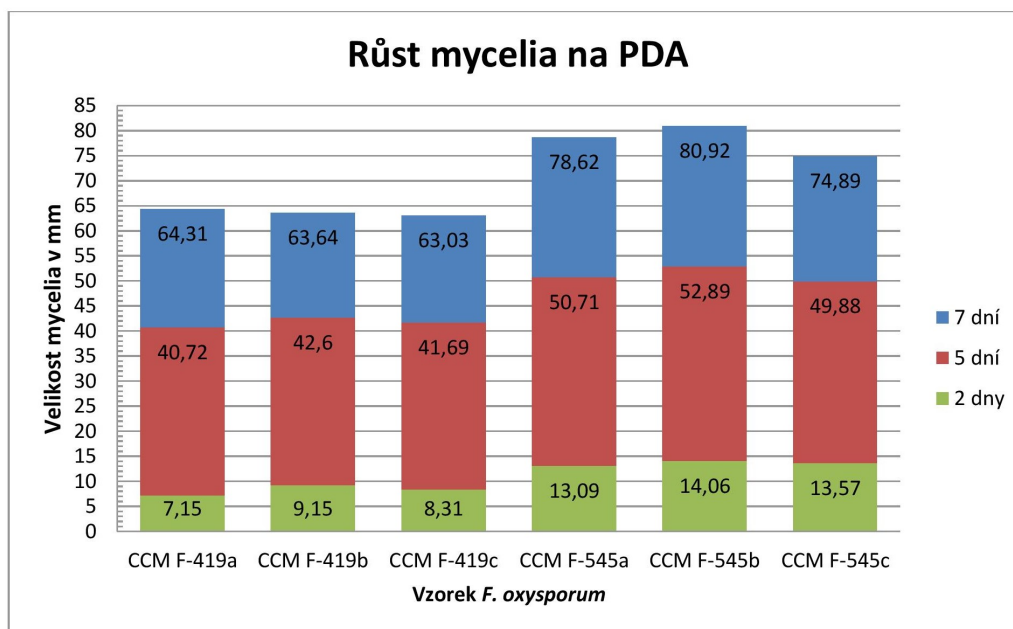
Byl pozorován rozdíl v růstu dsRNA negativního CCM F-419 a dsRNA pozitivního vzorku CCM F-545 (Obr. č. 25, obr. č. 26). Morfologicky byly oba izoláty identické.



(a) Vzorek *F. oxysporum* CCM F-419. (b) Vzorek *F. oxysporum* CCM F-545.

Obrázek 25: Vzorky *F. oxysporum* po pětidenní kultivaci na PDA médiu. Zdroj: Martin Mátl

Ve všech časových bodech pozorování měřil průměr mycelií dsRNA pozitivního vzorku více než průměr mycelií vzorku dsRNA negativního. Tento trend byl pozorován u všech triplikátů obou izolátů.



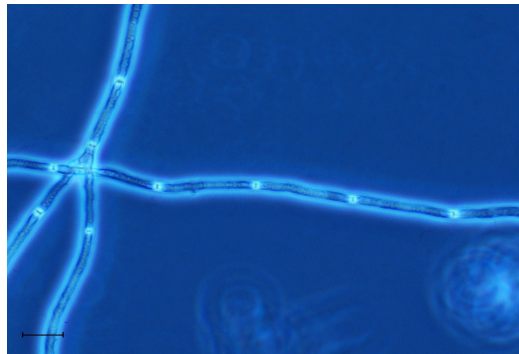
Obrázek 26: Růst mycelia dvou izolátů *F. oxysporum* (každý ve třech triplikátech) na PDA médiu. Průměr mycelia v milimetrech byl změřen a nanesen na graf dva, pět a sedm dní od naočkování na PDA médium. Rychlejší růst dsRNA pozitivního kmenu oproti dsRNA negativnímu kmenu je patrný. Zdroj: Martin Mátl

4.3 Sklíčkové kultury

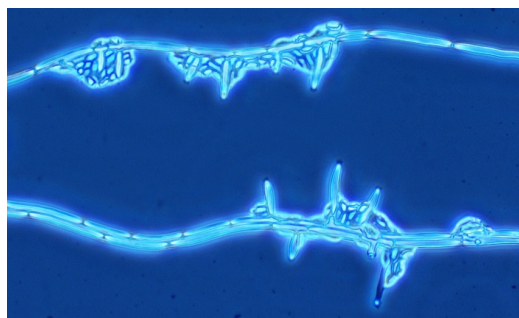
Mikroskopická práce byla provedena na mikroskopu Olympus a snímky byly foceny softwarem NIS elements 4.20.00. Krycí skla byla opatrně vyjmuta z agarů a mikroskopována ve fázovém kontrastu. Na zkoumaných vzorcích byly zkoumány dva typy mycelia: vzdušné mycelium a substrátové mycelium. Substrátové mycelium se skládá z hyf ponořených přímo v médiu, kdežto vzdušné mycelium se skládá z volných hyf na sklíčku a na vzduchu. Na každém krycím skle byla zhruba polovina mycelia vzdušného a polovina substrátového. Zvláštní zřetel byl dán na pozorování rozdílů mezi zkoumanými kmeny *F. oxysporum*, nicméně žádné markantní rozdíly nebyly pozorovány. Na snímcích níže je vidět řada struktur, některé z nich jsou zde blíže popsány (Obr. č. 27, 28, 29 a 30).

Základem mycelia jsou houbová vlákna - hyfy. Hyfy jsou mnohobuněčné a rozdělené přepážkami zvanými septa. Rozdělují se a zase spojují. Fúze dvou hyf jedné houby (nebo dvou příbuzných hub) se nazývá anastomóza. *F. oxysporum* má tři typy asexuálních spor - mikrokonidie, makrokonidie a chlamydostry. Mikrokonidie jsou malé oválné, elipsoidní či ledvinovité neseptované buňky. V myceliu jsou velmi hojné. Na fotografiích je vidíme volně umístěné, nahromaděné kolem hyf nebo na konidioforech. Konidiofory jsou konidie produkující hyfy. Konidie jsou na nich tvořeny ze špičky a hromadí se v kupkách. Makrokonidie byly na našich vzorcích pozorovány velice vzácně. Konidie mají většinou 3-5 sept a jsou zahnuté.

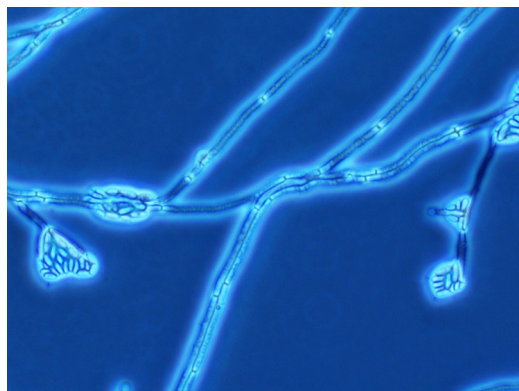
Viditelné rozdíly mezi dsRNA pozitivním a dsRNA negativním kmenem nebyly na mikrofotografiích pořízených metodou sklíčkových kultur pozorovány. Velké množství mikrokonidií bylo pozorováno u obou kmenů.



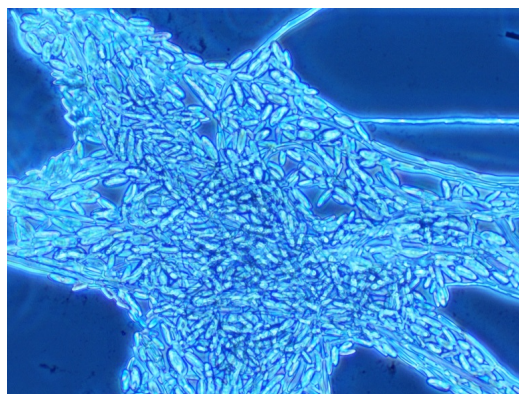
Obrázek 27: Hyfy se septy. Vzdušné mycelium. *Fusarium oxysporum* CCM F-545 z=400x. Zdroj: Martin Mátl



Obrázek 28: Mikrokonidie nakupené okolo hyf. Na hyfách vyrůstají pravděpodobně neseptované nezralé konidiofory. Vzdušné mycelium. *Fusarium oxysporum* CCM F-419, z=400x. Zdroj: Martin Mátl



Obrázek 29: Mikrokonidie nahromaděné na konidioforech. Vzdušné mycelium, *Fusarium oxysporum* CCM F-419, z=400x. Zdroj: Martin Mátl



Obrázek 30: Extrémní nahromadění konidií. Substrátové mycelium. *Fusarium oxysporum* CCM F-545 , z=400x. Zdroj: Martin Mátl

4.4 Test patogenity na *Arabidopsis thaliana*

Po třech týdnech od výsevu byly rostliny považovány za dostatečně staré pro pletí. Z každého květináče byly pinzetou vyjmuty mladé rostliny tak, aby v květináči zůstala pouze jedna. Obecně lze tvrdit, že rostliny *A. thaliana* v průběhu tohoto experimentu rostly pomalu. Pravděpodobně je tato redukce v rychlosti růstu způsobena zkrácenou podzimní fotoperiodou nebo umístěním květináčů na východ.

Významné rozdíly v růstu a vzezření byly mezi *F. oxysporum* CCM F-545 a *F. oxysporum* CCM F-419 inokulovanými rostlinami pozorovány. Rostliny *A. thaliana* inokulované dsRNA-pozitivním kmenem *F. oxysporum* byly fenotypově velice blízké kontrolním rostlinám (Obr. č. 33 a 31). Měly 7 - 13 lístků s jasně zeleným zbarvením. Jejich růžice měřily jeden až tři centime-

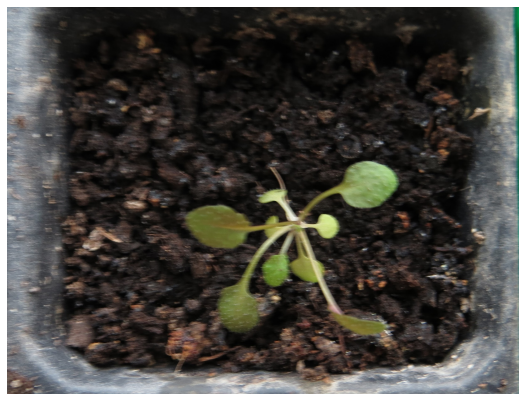
try. Tyto znaky sdílely s kontrolní skupinou rostlin. *A. thaliana* inokulované dsRNA-negativním kmenem *F. oxysporum* jevíly známky choroby (Obr. č. 32). Měly 5 - 8 lístků s proměnlivým zbarvením. Některé jasně zelené, jiné nažloutlé. Velikost růžice se pohybovala okolo jednoho centimetru. Nemocné rostliny zahynuly zhruba stý den od vysetí. Tento experiment měl sledovat celý životní cyklus hostitele včetně vývoj pupene a květu, kvůli rychlému průběhu nemoci u rostlin s dsRNA-negativním kmenem však tato data nebyla získána.



Obrázek 31: Fotografie *A. thaliana* ze skupiny rostlin neinokulovaných *F. oxysporum* 72. den po vysetí. Zdroj: Martin Mátl



Obrázek 32: Fotografie *A. thaliana* ze skupiny rostlin inokulované dsRNA-negativním kmenem *F. oxysporum* 72. den po vysetí. Zdroj: Martin Mátl



Obrázek 33: Fotografie *A. thaliana* ze skupiny rostlin inokulované dsRNA-pozitivním kmenem *F. oxysporum* 72. den po vysetí. Zdroj: Martin Mátl

Významné rozdíly v míře patogenity byly mezi dsRNA pozitivním a dsRNA negativním kmenem *F. oxysporum* pozorovány. Rostliny vystavené přítomnosti dsRNA-pozitivního kmenu houby rostly jako neinfikované rostliny. Rostliny vystavené přítomnosti dsRNA-negativního izolátu *F. oxysporum* jevíly vážné známky choroby. Tyto rostliny podlely chorobě.

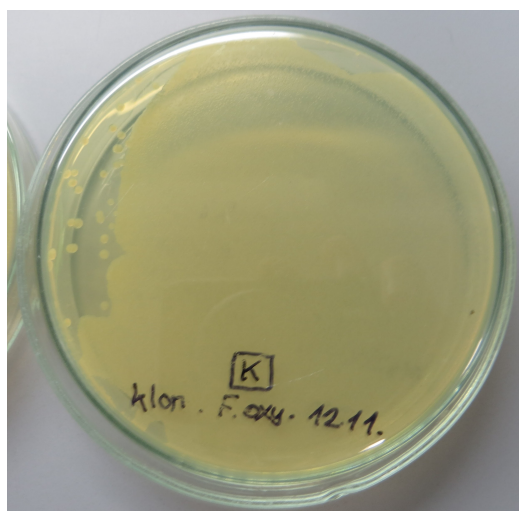
4.5 Reverzně transkripční polymerázová řetězová reakce

Agarózová gelová elektroforéza potvrdila úspěch reverzně transkripční polymerázové řetězové reakce.

4.6 Příprava cDNA knihovny

Transformované bakterální buňky vyseté na Petriho misky s LB médiem s ampicillinem rostly překvapivě hustě (Obr. č. 34). Jednotlivé kolonie nebylo možné od sebe rozlišit. Tento jev byl pozorován na všech miskách s transformanty, jak dsRNA-negativní, dsRNA-pozitivní a kontrolní vzorek. Pro rozlišení jednotlivých bakteriálních kolonií byla zvolena metoda křížového roztěru na nové Petriho misky s LB médiem a ampicillinem. Křížový roztěr byl úspěšný v rozdělení kolonií a z něj byly vybírány kolonie pro colony PCR.

Výsledek Colony PCR byl negativní. Na agarózovém gelu nebyl pozorován žádný proužek korespondující k insertu v žádném ze vzorků. Negativní kontrola také vyšla záporně.



Obrázek 34: Fotografie *E. coli* transformantů (kontrolní vzorek) vyšetých na Petriho misku s LB médiem a ampicillinem třetí den po inokulaci. Petriho miska je focena ze spodní strany. Jednotlivá vrstva bakterií je viditelná. Vlevo vidíme oddělené kolonie a neporostlý agar, pravděpodobně způsobeno nedokonalým rozprostřením inokula na Petriho misku. Zdroj: Martin Mátl

5 Diskuze

Detekce a izolace dsRNA proběhla úspěšně. Dalším analýzám byly podrobeny jen dva vzorky, CCM F-545 (reprezentativní dsRNA pozitivní vzorek) a CCM F-419 (reprezentativní dsRNA negativní vzorek). Hojnost dsRNA pozitivních výsledků i v tak malém počtu vzorků naznačuje nečekaný výskyt dsRNA mykovic v dosud neprozkoumaných taxonech jako je *F. oxysporum*. O diverzitě a vlastnostech mykovic v *F. oxysporum* není mnoho známo. Výzkum na tomto ekonomicky významném subjektu slibuje zajímavé výsledky. Dalším poznatkem “oficiálně nezahrnutým” do této práce je porovnání metod izolace dsRNA. Flegrova metoda extrakce kyselým fenolem je výrazně rychlejší, snadnější a produkuje výborné výsledky. Její nevýhodou je vysoká cena kyselého fenolu a horší dostupnost této reagentie. Izolace celulózu je mnohem pracnější a produkuje menší množství dsRNA. Cena spotřebované celulózy je relativně nízká, a její selektivita pro vazbu dsRNA přináší lepší teoretickou čistotu oproti extrakci kyselým fenolem. Jsem přesvědčen, že pečlivým kvalitativním porovnáním a optimalizací těchto metod je možné zefektivnit izolaci dsRNA pro účely mykovirolgie.

Pozorováním růstu CCM F-545 a CCM F-419 byl zjištěn rozdíl v růstu těchto kmenů. Významně rychlejší růst CCM F-545 oproti CCM F-419 naznačuje, že přítomnost dsRNA mykoviru může ovlivňovat rychlost růstu na obecném médiu. Zjištění že právě dsRNA obsahující vzorek rostl rychleji je poněkud překvapující. Spolu s výsledkem testu fytopatogenity jsou tyto fenotypové rozdíly zajímavým výsledkem. Potenciální význam a uplatnění jsou probrány níže.

Skličkové kultury *F. oxysporum* neprokázaly žádný rozdíl mezi dsRNA negativním a dsRNA pozitivním kmenem na úrovni mikroskopické morfologie. Vzhledem k tomu, že dsRNA pozitivní kmen nezpůsobuje viditelnou deterioraci mycelia a hyf, není toto zjištění překvapující.

Patogenita a virulence je velice významným znakem u choroboplodných organismů. V testu patogenity na *A. thaliana* byly pozorovány významné rozdíly mezi dsRNA pozitivním a dsRNA negativním kmenem *F. oxysporum*. Rostliny inokulované dsRNA negativním kmenem jevíly viditelné známky

nemoci, zatímco rostliny inokulované dsRNA pozitivním kmenem vypadaly stejně jako kontrolní rostliny. Vadnutí nemocných rostlin probíhalo tak rychle, že po několika měsících rostliny inokulované dsRNA negativním kmenem *F. oxysporum* uvadly. Změna v míře patogenity je výrazná, naznačuje, že přítomnost mykoviru negativně ovlivňuje schopnost jeho houbového hostitele napadat rostliny. Přenos fenotypu snížené patogenity by jednoznačně potvrdil virový původ. Toho lze docílit v rámci jedné VCG prostřednictvím anastomózy (Chu *et al.* , 2002) a v rámci různých VCG protoplastovou fúzí (Lee *et al.* , 2011). Snížení patogenity infikovaného izolátu *F. oxysporum* by umožnilo uplatnění mykoviru v ochraně plodin. Interakce, příp. kompetice těchto dvou kmenů v rostlinném hostiteli také stojí za prozkoumání. Existuje případ, kdy přítomnost neškodného endofytického kmenu *F. oxysporum* v rostlině vyvolalo rezistenci vůči patogenním kmenům (Aimé *et al.* , 2013). Je třeba zmínit, že test patogenity byl prováděn v laboratorních podmínkách, nikoliv ve skleníku, a to kvůli obavám z introdukce *F. oxysporum* do prostoru vyhrazenému pro práci s rostlinami.

Reverzně transkripční polymerázová řetězová reakce proběhla úspěšně. Na agarózové gelové elektroforéze PCR reakce byla vidět šmouha, což znamená směs ampliconů různé délky. To je očekávaný produkt RT-PCR reakce. Získaná DNA je dále amplifikovatelná a využitelná pro další analýzy s cílem získání sekvence mykoviru.

Výsledek Colony PCR byl negativní. Na agarózovém gelu nebyl v ani jednom zkoumaném vzorku pozorován proužek signalizující přítomnost inserové DNA v plasmidu bakteriálních buněk. Negativní kontrola vyšla také negativně. Možných vysvětlení neúspěchu je několik. První z nich je použití neaktivního ampicillinu. Toto antibiotikum je poměrně choulostivé a po několika měsících skladování při -20 °C podstupuje hydrolyzu a ztrácí aktivitu. Nepřítomnost aktivního ampicillinu na Petriho miskách umožňuje růst netransformovaným buňkám. To by vysvětlovalo abnormální počet “transformantů” na prvotním výsevu. Další možností je použití kompetentních buněk rezistentních vůči ampicillinu. Předpokladem pro tento scénář je nechtěná introdukce Ampr genu do populace kompetentních buněk. K té by pravděpodobně došlo ještě před přípravou kompetentních buněk. Třetí možností je religace. Plasmid může svými konci přilnout k sobě a ligací opět zaujmout svou původní kružnicovou formu. V kružnicové formě se dostane do bakteriálních buněk. Ty jsou díky plasmidu rezistentní vůči ampicillinu a tudíž rostou, ale jejich plasmid neobsahuje požadovaný insert. Religaci lze předejít purifikací plasmidu a insertu. Je třeba znovu provést ligaci a transformaci. Hotová cDNA knihovna umožní sekvenaci genomu zkoumaného mykoviru.

6 Závěr

Ze vzorků fytopatogenní plísně *Fusarium oxysporum* byla izolována dvouřetězcová RNA, charakteristická pro virovou infekci. Dva kmeny této houby, CCM F-545 a CCM F-419 byly zvoleny jako reprezentativní dsRNA pozitivní a dsRNA negativní vzorky. Na nich bylo zkoumáno, jak přítomnost mykoviru ovlivňuje fenotypové charakteristiky *F. oxysporum*. Významné rozdíly mezi těmito kmeny byly pozorovány v ohledu rychlosti růstu a fytopatogenity. *F. oxysporum* CCM F-545 obsahující dsRNA nezpůsobilo fusariové vadnutí u modelové rostliny *Arabidopsis thaliana*, kdežto dsRNA negativní *F. oxysporum* CCM F-419 v rostlinách vyvolalo viditelné zpomalení růstu, žloutnutí listů a vadnutí. To nás vede k domněnce, že přítomnost mykoviru zmírňuje patogenitu této houby. Kmen obsahující dsRNA rostl na PDA agaru rychleji než dsRNA neobsahující kmen. Rozdíly v mikro- a makroskopické morfologii nebyly pozorovány. Dvouvláknová RNA byla po izolaci převedena na cDNA a amplifikována metodou PCR. Ligace této DNA do vektoru pGEM®-T a následná transformace do *Escherichia coli* DH5 neproběhla úspěšně. Pravděpodobné příčiny selhání byly probrány a byla navržena preventivní opatření. Budoucí úspěšná transformace povede k sekvenování virové genetické informace. Další výzkum je nutný v oblasti přenosu mykoviru a fenotypu na nové hostitele. Podrobnější výzkum mykovirů v dosud neprozkoumaných taxonech jako *Fusarium oxysporum* je nutný pro pochopení jejich role v ekosystému, a prověřit možnost použití mykovirů v ochraně plodin.

Literatura

- Agrios, GN. 2005. Plant pathology, 5th. *Elsevier Acad. Press. Burlington. Mass, EU*, 251–262.
- Aimé, Sébastien, Alabouvette, Claude, Steinberg, Christian, & Olivain, Chantal. 2013. The endophytic strain *Fusarium oxysporum* Fo47: a good candidate for priming the defense responses in tomato roots. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **26**(8), 918–926.
- Baayen, Robert P, O'Donnell, Kerry, Bonants, Peter JM, Cigelnik, Elizabeth, Kroon, Laurens PNM, Roebroek, Eugène JA, & Waalwijk, Cees. 2000. Gene genealogies and AFLP analyses in the *Fusarium oxysporum* complex identify monophyletic and nonmonophyletic formae speciales causing wilt and rot disease. *Phytopathology*, **90**(8), 891–900.
- Baltimore, D. 1971. Expression of animal virus genomes. *Bacteriological reviews*, **35**(3), 235.
- Baltimore, DAVID. 1970. Viral RNA-dependent DNA Polymerase: RNA-dependent DNA Polymerase in Virions of RNA Tumour Viruses. *Nature*, **226**(5252), 1209–1211.
- Becher, Paul, & Tautz, Norbert. 2011. RNA recombination in pestiviruses: cellular RNA sequences in viral genomes highlight the role of host factors for viral persistence and lethal disease. *RNA biology*, **8**(2), 216–224.
- Benhamou, Nicole, Charest, P-M, & Jarvis, WR. 1989. Biology and host-parasite relations of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Pages 95–105 of: Vascular Wilt Diseases of Plants*. Springer.
- Boutati, Eleni I, & Anaissie, Elias J. 1997. *Fusarium*, a significant emerging pathogen in patients with hematologic malignancy: ten years' experience at a cancer center and implications for management. *Blood*, **90**(3), 999–1008.

- Bush, K, & Sykes, RB. 1984. Interaction of β -lactam antibiotics with β -lactamases as a cause for resistance. *Pages 1–28 of: Antimicrobial drug resistance*. Academic Press, Inc London.
- Casillas, Adrian M, Nyamathi, Adeline M, Sosa, Anthony, Wilder, Cam L, & Sands, Heather. 2003. A current review of Ebola virus: pathogenesis, clinical presentation, and diagnostic assessment. *Biological research for nursing*, **4**(4), 268–275.
- Chen, Inês, & Dubnau, David. 2004. DNA uptake during bacterial transformation. *Nature Reviews Microbiology*, **2**(3), 241–249.
- Chiba, Sotaro, Salaipeeth, Lakha, Lin, Yu-Hsin, Sasaki, Atsuko, Kanematsu, Satoko, & Suzuki, Nobuhiro. 2009. A novel bipartite double-stranded RNA mycovirus from the white root rot fungus *Rosellinia necatrix*: molecular and biological characterization, taxonomic considerations, and potential for biological control. *Journal of virology*, **83**(24), 12801–12812.
- Chu, Yeon-Mee, Jeon, Jae-Jin, Yea, Sang-Jin, Kim, Yong-Ho, Yun, Sung-Hwan, Lee, Yin-Won, & Kim, Kook-Hyung. 2002. Double-stranded RNA mycovirus from *Fusarium graminearum*. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**(5), 2529–2534.
- Deng, Fuyou, Allen, Todd D, Hillman, Bradley I, & Nuss, Donald L. 2007. Comparative analysis of alterations in host phenotype and transcript accumulation following hypovirus and mycoreovirus infections of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. *Eukaryotic cell*, **6**(8), 1286–1298.
- Dimmock, NJ, Easton, AJ, & Leppard, KN. 2007. Appendixes: survey of virus properties. *Introduction to modern virology*, 444–479.
- Dinman, Jonathan D, Icho, Tateo, & Wickner, Reed B. 1991. A-1 ribosomal frameshift in a double-stranded RNA virus of yeast forms a gag-pol fusion protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **88**(1), 174–178.
- Drake, John W, & Holland, John J. 1999. Mutation rates among RNA viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **96**(24), 13910–13913.
- Egel, DS, & Martyn, RD. 2007. *Fusarium wilt of watermelon and other cucurbits*. *The Plant Health Instructor DOI: 10.1094*. Tech. rept. PHI-I-2007-0122-01. Disponible en <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/ascomycetes/Pages/FusariumWatermelon.aspx> [Consulta 3 de diciembre 2011].

- Elias, K, Zamir, D, Lichtman-Pleban, Tzili, Katan, Talma, *et al.* . 1993. Population structure of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*: restriction fragment length polymorphisms provide genetic evidence that vegetative compatibility group is an indicator of evolutionary origin. *Molecular Plant Microbe Interactions*, **6**, 565–565.
- Elias, Karol S, Schneider, RW, & Lear, MM. 1991. Analysis of vegetative compatibility groups in nonpathogenic populations of *Fusarium oxysporum* isolated from symptomless tomato roots. *Canadian Journal of Botany*, **69**(10), 2089–2094.
- Figlerowicz, Marek, & Bujarski, Jozef J. 2011. RNA-RNA Recombination in Plant Virus Replication and Evolution. *Annu. Rev. Phytopathol*, **49**, 415–43.
- Flegr, Jaroslav. 1987. A rapid method for isolation of double stranded RNA. *Preparative biochemistry*, **17**(4), 423–433.
- Fravel, D, Olivain, C, & Alabouvette, C. 2003. *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. *New Phytologist*, **157**(3), 493–502.
- Geering, Andrew DW. 2007. Caulimoviridae (Plant Pararetroviruses). *eLS*.
- Ghabrial, Said A, & Suzuki, Nobuhiro. 2009. Viruses of plant pathogenic fungi. *Annual review of phytopathology*, **47**, 353–384.
- Ghabrial, Said A, Castón, José R, Jiang, Daohong, Nibert, Max L, & Suzuki, Nobuhiro. 2015. 50-plus years of fungal viruses. *Virology*, **479**, 356–368.
- Göker, Markus, Scheuner, Carmen, Klenk, Hans-Peter, Stielow, J Benjamin, & Menzel, Wulf. 2011. Codivergence of mycoviruses with their hosts. *PLoS One*, **6**(7), e22252.
- Gordon, TR, & Martyn, RD. 1997. The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*. *Annual review of phytopathology*, **35**(1), 111–128.
- Gordon, TR, Okamoto, D, & Jacobson, DJ. 1989. Colonization of muskmelon and nonsusceptible crops by *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* and other species of *Fusarium*. *Phytopathology*, **79**(10), 1095–1100.
- Gordon, WL. 1965. Pathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. *Canadian Journal of Botany*, **43**(11), 1309–1318.
- Grattidge, R, O'Brien, RG, *et al.* . 1982. Occurrence of a third race of *Fusarium* wilt of tomatoes in Queensland. *Plant Disease*, **66**(2), 165–166.

- Green, MR, & Sambrook, J. 2012. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Hay, Alan J, Gregory, Victoria, Douglas, Alan R, & Lin, Yi Pu. 2001. The evolution of human influenza viruses. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **356**(1416), 1861–70.
- Heiniger, Ursula, & Rigling, Daniel. 1994. Biological control of chestnut blight in Europe. *Annual review of phytopathology*, **32**(1), 581–599.
- Hillman, Bradley I, & Cai, Guohong. 2013. The family Narnaviridae: simplest of RNA viruses. *Adv. Virus Res*, **86**, 149–176.
- Holton, TA, & Graham, MW. 1991. A simple and efficient method for direct cloning of PCR products using ddT-tailed vectors. *Nucleic Acids Research*, **19**(5), 1156.
- Howitt, Robyn LJ, Beever, Ross E, Pearson, Michael N, & Forster, Richard LS. 2001. Genome characterization of Botrytis virus F, a flexuous rod-shaped mycovirus resembling plant ‘potex-like’viruses. *Journal of General Virology*, **82**(1), 67–78.
- Jiang, Daohong, & Ghabrial, Said A. 2004. Molecular characterization of Penicillium chrysogenum virus: reconsideration of the taxonomy of the genus Chrysovirus. *Journal of general virology*, **85**(7), 2111–2121.
- Jiménez-Gasco, M, Navas-Cortés, Juan A, & Jiménez-Díaz, Rafael M. 2010. The Fusarium oxysporum f. sp. ciceris/Cicer arietinum pathosystem: a case study of the evolution of plantpathogenic fungi into races and pathotypes. *International Microbiology*, **7**(2), 95–104.
- Jones, J.P., J.B. Jones, & Miller, J.W. 1982. Fusarium wilt of tomato. *Plant Pathology Circular*.
- Khalifa, Mahmoud E, & Pearson, Michael N. 2013. Molecular characterization of three mitoviruses co-infecting a hypovirulent isolate of Sclerotinia sclerotiorum fungus. *Virology*, **441**(1), 22–30.
- King, Andrew MQ, Adams, Michael J, & Lefkowitz, Elliot J. 2011. *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Vol. 9. Elsevier.
- Lee, Kyung-Mi, Yu, Jisuk, Son, Moonil, Lee, Yin-Won, & Kim, Kook-Hyung. 2011. Transmission of Fusarium boothii mycovirus via protoplast fusion

- causes hypovirulence in other phytopathogenic fungi. *PLoS One*, **6**(6), e21629.
- Lehman, IR, Bessman, Maurice J, Simms, Ernest S, & Kornberg, Arthur. 1958. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. *J. biol. Chem*, **233**, 163–170.
- Leslie, John F, Summerell, Brett A, Bullock, Suzanne, *et al.* . 2006. *The Fusarium laboratory manual*. Vol. 2. Wiley Online Library.
- Ma, Li-Jun, Van Der Does, H Charlotte, Borkovich, Katherine A, Coleman, Jeffrey J, Daboussi, Marie-Josée, Di Pietro, Antonio, Dufresne, Marie, Freitag, Michael, Grabherr, Manfred, Henrissat, Bernard, *et al.* . 2010. Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*. *Nature*, **464**(7287), 367–373.
- Mandeel, Qaher, & Baker, Ralph. 1991. Mechanisms involved in biological control of *Fusarium* wilt of cucumber with strains of nonpathogenic *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology*, **81**(4), 462–469.
- Marshall, Nicolle, Priyamvada, Lalita, Ende, Zachary, Steel, John, & Lowen, Anice C. 2013. Influenza virus reassortment occurs with high frequency in the absence of segment mismatch. *PLoS Pathog*, **9**(6), e1003421.
- Meyerowitz, Elliot M. 1987. *Arabidopsis thaliana*. *Annual review of genetics*, **21**(1), 93–111.
- Mirocha, Ch J, Abbas, HK, Kommedahl, T, & Jarvis, BB. 1989. Mycotoxin production by *Fusarium oxysporum* and *Fusarium sporotrichioides* isolated from *Baccharis* spp. from Brazil. *Applied and environmental microbiology*, **55**(1), 254–255.
- Morris, TJ, Dodds, JA, *et al.* . 1979. Isolation and analysis of double-stranded RNA from virus-infected plant and fungal tissue. *Phytopathology*, **69**(8), 854–858.
- Murray, Robert. 2012. *Harperova ilustrovaná biochemie*. Praha: Galén.
- Nagia, FA, & El-Mohamedy, RSR. 2007. Dyeing of wool with natural anthraquinone dyes from *Fusarium oxysporum*. *Dyes and pigments*, **75**(3), 550–555.
- Nishimura, Norio. 2007. Selective media for *Fusarium oxysporum*. *Journal of General Plant Pathology*, **73**(5), 342–348.

- Nuss, Donald L. 2005. Hypovirulence: mycoviruses at the fungal–plant interface. *Nature Reviews Microbiology*, **3**(8), 632–642.
- Özkan, Selin, & Coutts, Robert HA. 2015. *Aspergillus fumigatus* mycovirus causes mild hypervirulent effect on pathogenicity when tested on *Galleria mellonella*. *Fungal Genetics and Biology*, **76**, 20–26.
- Pariente, Nonia, Sierra, Saleta, & Airaksinen, Antero. 2005. Action of mutagenic agents and antiviral inhibitors on foot-and-mouth disease virus. *Virus research*, **107**(2), 183–193.
- Pasquali, Matias, Dematheis, Flavia, Gilardi, Giovanna, Gullino, Maria Lodovica, & Garibaldi, Angelo. 2005. Vegetative compatibility groups of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* from lettuce. *Plant Disease*, **89**(3), 237–240.
- Pearson, Michael N, Beever, Ross E, Boine, Barbara, & Arthur, Kieren. 2009. Mycoviruses of filamentous fungi and their relevance to plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, **10**(1), 115–128.
- Perkins, DAVID D, Radford, A, Newmeyer, D, & Björkman, M. 1982. Chromosomal loci of *Neurospora crassa*. *Microbiological reviews*, **46**(4), 426.
- Piškur, Jure, & Rupprecht, Allan. 1995. Aggregated DNA in ethanol solution. *FEBS letters*, **375**(3), 174–178.
- Ploetz, Randy C. 2006. *Fusarium* wilt of banana is caused by several pathogens referred to as *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Phytopathology*, **96**(6), 653–656.
- Roossinck, Marilyn J, Saha, Prasenjit, Wiley, Graham B, Quan, Jiayi, White, James D, Lai, Hongshing, Chavarria, Felipe, Shen, Guoan, & Roe, Bruce A. 2010. Ecogenomics: using massively parallel pyrosequencing to understand virus ecology. *Molecular Ecology*, **19**(s1), 81–88.
- Saiki, Randall K, Gelfand, David H, Stoffel, Susanne, Scharf, Stephen J, Higuchi, Russell, Horn, Glenn T, Mullis, Kary B, & Erlich, Henry A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**(4839), 487–491.
- Schürmann, E, & Diederichs, R. 1964. Thermodynamik des Systems Phenol-Wasser. *Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie*, **68**(5), 434–445.

- Scott, JW, & Jones, JP. 1989. Monogenic resistance in tomato to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3. *Euphytica*, **40**(1-2), 49–53.
- Skovgaard, Kerstin, Nirenberg, Helgard I, O'Donnell, Kerry, & Rosendahl, Søren. 2001. Evolution of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* races inferred from multigene genealogies. *Phytopathology*, **91**(12), 1231–1237.
- Solomon, Jonathan M, & Grossman, Alan D. 1996. Who's competent and when: regulation of natural genetic competence in bacteria. *Trends in Genetics*, **12**(4), 150–155.
- Tatum, JH, Baker, RA, & Berry, RE. 1985. Naphthoquinones produced by *Fusarium oxysporum* isolated from citrus. *Phytochemistry*, **24**(3), 457–459.
- Taylor, Robin G, Walker, David C, & McInnes, RR. 1993. *E. coli* host strains significantly affect the quality of small scale plasmid DNA preparations used for sequencing. *Nucleic acids research*, **21**(7), 1677.
- van Regenmortel, Marc HV, & Mahy, Brian WJ. 2009. *Desk encyclopedia of plant and fungal virology*. Academic Press.
- Worobey, Michael, & Holmes, Edward C. 1999. Evolutionary aspects of recombination in RNA viruses. *Journal of General Virology*, **80**(10), 2535–2543.
- Zeugin, JA, & Hartley, JL. 1985. Evolutionary aspects of recombination in RNA viruses. *Focus*, **7**(4), 1–2.