

MOLECULAR DETECTION OF VIRAL PATOGENS IN GENERA *CANNA* AND *HOSTA* IN THE CZECH REPUBLIC

Kolářková, A., Šafránková, I., Holková, L.

Department of Crop Science, Breeding and Plant Medicine, Faculty of Agronomy, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: xbradaco@mendelu.cz, ivana.safrankova@mendelu.cz,
ludmila.holkova@mendelu.cz

ABSTRACT

The purpose of the study was to evidence occurrence of *Canna yellow mottle virus* (CaYMV) and *Canna yellow streak virus* (CaYSV) in *Canna* spp. and *Hosta virus X* in *Hosta* spp. in the Czech Republic. *Canna* plants showing symptoms such as mottling and veinal streaking and *Hosta* plants showing symptoms such as mosaic, mottling and chlorosis were analyzed by PCR in the year 2010. The viruses were detected from leaves. Symptomatic leaves of *Canna* were collected at the locality Lednice (FH MENDELU BRNO), other samples were purchased at garden centres in areas: South Moravia, Hradec Králové, Central Bohemia and Prague. Symptomatic leaves of *Hosta* were collected at the locality Lednice (FH MENDELU BRNO), Arboretum Brno (MENDELU Brno), horticulture Prague, garden Brno, other samples were purchased at garden centres in areas: South Moravia, Central Bohemia. Occurrence of all of three viruses was confirmed. This is the first report of the identification of CaYMV, CaYSV and HVX in the Czech Republic. Occurrence of CaYMV was 44%, CaYSV was 96% and HVX was 76%. CaYMV and CaYSV were found in mixed infections, too (40%). Viruses, which were detected by PCR method, were compared with sequences available in the GenBank. Identity of sequence CaYMV was > 98%, identity of sequence CaYSV was > 96% and identity of sequence HVX was > 98%.

Key words: *Canna*, *Hosta*, CaYMV, CaYSV, HVX, PCR

Acknowledgments: This project was supported by IGA AF MENDELU Brno No. IP 6/2010 and IGA AF MENDELU BRNO No. TP 4/2010.

ÚVOD

Dosny (*Canna* L., *Cannaceae*) jsou vytrvalé okrasné rostliny s širokými plochými listy a atraktivními květy. Přestože pocházejí z tropických a subtropických oblastí, byla většina kultivarů vyšlechtěna pro mírné klima. S kosmopolitním rozšířením dosen souvisí i zvýšený výskyt virových onemocnění podmíněný vegetativním množením a častými mezinárodními výměnami necertifikovaného materiálu. V počátečním stadiu napadení se na listech objevují světle zelené skvrny a krátké zelené proužky podél žilnatiny (okolní pletivo je tmavší než barevné změny), dochází ke kroucení a deformacím listů. Při vyšší intenzitě napadení skvrny blednou, žloutnou a postupně nekrotizují. Stejně příznaky se mohou projevit i na stoncích. Silně napadené rostliny zůstávají zakrnělé a odumírají. V případě, že infikované rostliny kvetou, jsou květy hůře vybarvené, se světlými skvrnami a proužky. Na dosnách byl dosud zaznamenán výskyt pěti virů, přičemž pouze dva z nich jsou specializované pouze na dosny. *Canna yellow mottle virus* (CaYMV) z rodu *Badnavirus* (YAMASHITA a kol. 1985), byl poprvé zaznamenán v Japonsku v roce 1985, následně také v USA, Velké Británii, Rakousku, Holandsku a Itálii. *Canna yellow streak virus* (CaYSV) z rodu *Potyvirus* byl identifikován teprve v roce 2007 ve Velké Británii, a to na základě konkrétního symptomu, tj. pruhovitosti listů (Monger a kol. 2007). CaYMV a CaYSV jsou často přítomny v rostlinách ve směsné infekci, v tomto případě bývají symptomy mnohem výraznější. Viry se šíří infikovanými rhizomy, přenos hmyzem u nich dosud prokázán nebyl. ALAN (2010) uvádí přenos CaYMV i osivem (ALAN 2010). K identifikaci těchto virových patogenů se používá metoda PCR s využitím specifických primerů. K detekci CaYMV byly navrženy dva druhy primerů CaYMV-3, CaYMV-4 (MOMOL a kol. 2004) a pCan1, pCan2 (BORROTO-FERNÁNDEZ a kol. 2008).

Bohyšky (*Hosta* Tratt.) patří mezi trvalky z čeledi *Liliaceae*. Dlouho byly považovány za rostliny, které nejsou poškozovány škůdci a netrpí chorobami. V posledních letech však bylo zaznamenáno rozšíření nového druhu viru *Hosta virus X* (HVX), který je považován z hlediska výskytu a hospodářského dopadu za velmi významný (LOCKHART 2002). Virus byl poprvé objeven v USA v roce 1996 (CURRIER a LOCKHART 1996). Postupně bylo zaznamenáno značné rozšíření jak v USA, tak v dalších zemích, včetně Kanady, Koreje, Velké Británie a Nového Zélandu. PARK a RYU (2003) prokázali, že HVX je samostatný druh rodu *Potexvirus*. Infekce listů se obvykle projevuje mozaikami, chlorózami, skvrnitostmi podél žilnatiny a nekrotizacemi, přičemž u rostlin často dochází k redukci růstu a změně zabarvení (RYU a kol. 2006). HVX se šíří vegetativním rozmnožováním infikovaných rostlin, nebo mechanicky prostřednictvím zahradnických nástrojů a půdy, ve které jsou úlomky infikovaných rostlinných částí. Přenos HVX živočišnými vektory nebyl dosud zaznamenán. RYU a kol. (2006) prokázali přenos HVX

semenem. K přenosu viru nedochází v době odkvétání rostliny, a když je rostlina v dormanci. K identifikaci tohoto patogenu se využívají dvě metody, serologická DAS-ELISA a molekulární RT-PCR. PARK a RYU (2003) vyvinuli metodu detekce pomocí RT-PCR s HVX - specifickými primery PHVXCP5 a PHVXCP3.

Nejnovější výzkumy jsou zaměřeny na rozšíření a identifikaci těchto tří virů v různých kultivarech r. *Hosta* a r. *Canna*. Symptomy na listech bohyšek a dosen poukazovaly na to, že se tyto viry v České republice pravděpodobně vyskytují, avšak systematické vyhledávání a identifikace dosud prováděny nebyly. Cílem práce bylo zjistit výskyt CaYMV, CaYSV a HVX v ČR.

MATERIÁL A METODIKA

V roce 2010 byly odebrány listy dosen a bohyšek se symptomy ukazujícími na výskyt virových patogenů. V případě dosen byly za symptomy považovány barevné změny na listech, hlavně podél žilnatin (Obr. 1, 2) a listové deformace (Obr. 3). Symptomy na bohyškách byly skvrnitosti podél žilnatin (Obr. 4), mozaiky (Obr. 5), chlorózy (Obr. 6) a deformace listové plochy (Obr. 7). Vzorky symptomatických dosen byly sbírány na lokalitě Lednice (ZF Mendelu Brno), ostatní vzorky pocházely ze zahradnických center v Jihomoravském, Královéhradeckém, Středočeském kraji a Praze. Vzorky symptomatických bohyšek byly odebírány na lokalitách Lednice (ZF Mendelu Brno), Botanická Zahrada a Arboretum Brno (BZA Mendelu Brno), zahradnictví (lokalita Praha), zahrádky (lokalita Brno), ostatní vzorky pocházely ze zahradnických center v Jihomoravském a Středočeském kraji. Při vlastním odběru byly nástroje desinfikovány v 70 % etanolu, tak aby byl co nejvíce eliminován přenos viru mezi jednotlivými rostlinami.

K molekulární detekci CaYMV, CaYSV a HVX byla použita metoda PCR. K extrakci nukleové kyseliny bylo použito 100 mg rostlinného pletiva pocházejícího ze symptomatických listů. Vzhledem k tomu, že CaYSV a HVX jsou RNA viry, kdežto CaYMV DNA virus, musely být použity rozdílné metody extrakce. DNA byla extrahována pomocí DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Německo) a k PCR byla použita Hot Start DNA Polymerase (Finnzymes, Finsko). RNA byla extrahována pomocí RNeasy Plant Mini Kit a k PCR byl použit One step RT PCR Kit (oba Qiagen, Německo). K detekci CaYMV byly použity specifické primery CaYMV-3, CaYMV-4 (MOMOL a kol. 2004) a pCan1, pCan2 (BORROTO-FERNÁNDEZ a kol. 2008). K detekci CaYSV specifické primery Canna-F1 a Canna-R2 (MONGER a kol. 2007). K detekci HVX specifické primery PHVXCP5 a PHVXCP3 (PARK a RYU 2003). PCR produkty byly analyzovány elektroforézou na 1% agarózovém gelu. Pro potvrzení jednotlivých virů byla provedena sekvenace vybraných vzorků. Jednotlivé produkty byly izolovány z gelu, přečištěny pomocí MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen, Německo) a sekvenovány. Přečtené sekvence byly porovnány se sekvencemi v GenBank.



Obr. 1: Počáteční stadium napadení



Obr. 2: Vyšší intenzita napadení



Obr. 3: Deformace čepele listu



Obr. 4: Skvrnitosti podél žilnatiny



Obr. 5: Mozaika na listu



Obr. 6: Chloróza listu

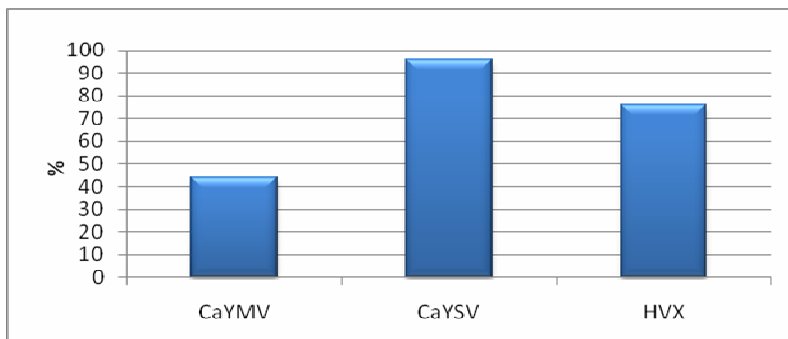


Obr. 7: Deformace (zvrásnění) listu

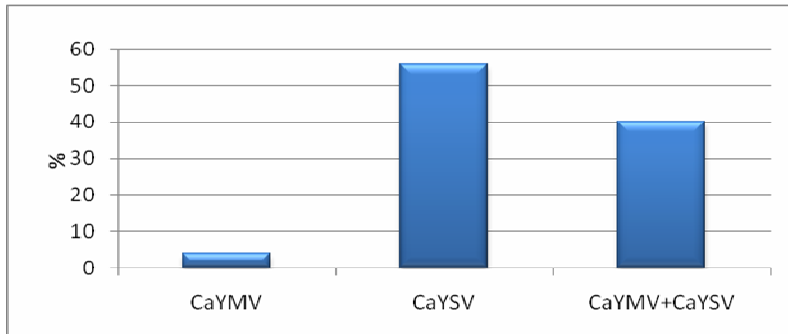
VÝSLEDKY A DISKUZE

Celkem bylo získáno 25 rostlin dosen z pěti lokalit a 25 rostlin bohyšek z šesti lokalit. Výskyt CaYMV byl potvrzen v 44 %, CaYSV v 96 % a HVX v 76 % (Graf 1). Druhy, které napadají dosny, byly v rostlinách přítomny buď samostatně, nebo ve směsné infekci. Výskyt jednotlivých druhů virů ve vybraných lokalitách a výsledky analýz jsou shrnuty v Tabulce 1 a Tabulce 2.

Graf 1: Výskyt CaYMV a CaYSV na dosnách a HVX na bohyškách v České republice v roce 2010 (%)



Graf 2: Zastoupení jednotlivých druhů virů (v %) v testovaných vzorcích listů dosen



MENDELNET 2010

Tab. 1: Molekulární detekce CaYMV a CaYSV na různých druzích a kultivarech rodu *Canna* v jednotlivých lokalitách České republiky v roce 2010

	PCR			PCR	
	CaYMV	CaYSV		CaYMV	CaYSV
Vzorky Lednice			Nákup Jihomoravský kraj		
<i>Canna</i> 'Wyoming'	-	+	<i>Canna indica</i> 3	+	-
<i>Canna</i> 'Spitfire'	+	+	<i>Canna indica</i> 4	+	+
<i>Canna</i> 'Perkeo'	+	+	<i>Canna indica</i> 5	+	+
<i>Canna</i> 'Picher'	-	+	<i>Canna indica</i> 6	+	+
<i>Canna</i> 'Centanaire de Rozain – Bourcharlat '	-	+	<i>Canna indica</i> 7	-	+
<i>Canna</i> <i>coccinea</i>	-	+	<i>Canna indica</i> 8	-	+
<i>Canna</i> <i>lanuginosa</i>	-	+	Nákup Královehradecký kraj		
<i>Canna</i> <i>indica</i> 1	-	+	<i>Canna</i> 'Cleopatra'	+	+
<i>Canna</i> <i>indica</i> 2	-	+	<i>Canna</i> 'Perkeo'	+	+
<i>Canna</i> <i>indica</i> lososová	+	+	<i>Canna</i> 'Lucifer'	-	+

MENDELNET 2010

Nákup Praha			<i>Canna 'Wyoming'</i>	-	+
<i>Canna indica 9</i>	-	+	<i>Canna 'Black knight'</i>	-	+
<i>Canna indica 10</i>	+	+	<i>Canna 'Louis cotton'</i>	-	+
Nákup Středočeský kraj					
<i>Canna indica 11</i>	+	+			

Tab. 2: Molekulární detekce HVX na různých druzích a kultivarech bohyšek v jednotlivých lokalitách České republiky v roce 2010

	PCR		PCR
Vzorky Lednice	HVX	Vzorky zahrádky Brno	HVX
<i>Hosta 'Stiletto'</i>	+	<i>Hosta neznámá 1</i>	-
<i>Hosta 'Blue Wedgewood'</i>	+	<i>Hosta neznámá 2</i>	-
<i>Hosta 'Blue Angel'</i>	+	<i>Hosta neznámá 3</i>	-
<i>Hosta undulata 'Univittata'</i>	-	<i>Hosta neznámá 4</i>	-
<i>Hosta Krossa regal'</i>	-	Nákup Jihomoravský kraj	
<i>Hosta 'Patriot'</i>	+	<i>Hosta neznámá 5</i>	+

Vzorky Arboretum Brno		<i>Hosta neznámá 6</i>	+
<i>Hosta ventricosa</i>	+	<i>Hosta neznámá 7</i>	+
<i>Hosta minor</i>	+	<i>Hosta neznámá 8</i>	+
<i>Hosta fortunei</i>	+	<i>Hosta neznámá 9</i>	+
<i>Hosta 'DuPage Delight'</i>	+	Nákup Středočeský kraj	
<i>Hosta 'Wide Brim'</i>	+	<i>Hosta sieboldiana</i>	+
Vzorky Praha			
<i>Hosta 'Mourning Dove'</i>	+		
<i>Hosta 'Scooter'</i>	+		
<i>Hosta 'Sum and Substance'</i>	+		
<i>Hosta 'Paul's Glory'</i>	+		

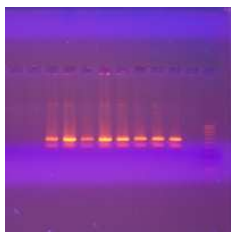
Rostliny dosen byly nejčastěji napadeny CaYSV (96 %, samostatně či ve směsné infekci), což se shoduje s výsledky uváděnými MONGER a kol. (2007), kteří zaznamenali 100% napadení rostlin virem CaYSV. CaYMV byl v rostlinách samostatně přítomen pouze ve 4 %, ve většině případů byl nalezen ve směsné infekci s CaYSV (Graf 2). U rostlin, které se nacházely na lokalitě Lednice, nebyly před odstraněním nadzemních částí (na podzim) nástroje opakovaně desinfikovány, a proto se předpokládá přenos virů mezi rostlinami navzájem. Tento předpoklad se potvrdil u CaYSV (Tab. 1). U CaYMV byly napadeny pouze 3 rostliny z 10 (Tab. 1), což může být způsobeno obtížnějším přenosem tohoto viru.

Symptomy na listech bohyšek nebyly v porovnání s rostlinami dosen tak výrazné, i přesto byl výskyt HVX prokázán i u rostlin s méně viditelnými symptomy. Sedmdesát šest procent rostlin bohyšek, ze kterých byl odebrán symptomatický materiál, bylo napadeno HVX. Při srovnávání lokalit, kde byly vzorky odebrány bylo zjištěno, že nejvíce napadené byly rostliny zakoupené

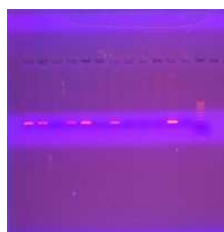
MENDELNET 2010

v zahradnických centrech. Na lokalitách Lednice a BZA Brno, kde se jedná o sbírky různých kultivarů bohyšek, byl výskyt potvrzen u 9 rostlin z 11 (Tab. 2). U těchto dvou sbírek může být výskyt HVX způsoben i tím, že probíhá vzájemná výměna rostlinného materiálu. Rostliny odebrané ze zahrádek (Brno) byly na přítomnost HVX negativní. Je zde možnost, že byly tyto rostliny vysazeny ještě před rokem 2000, než došlo k masivnímu rozšíření viru HVX.

Přítomnost CaYSV, CaYMV a HVX byla potvrzena metodou druhově-specifické PCR. U CaYMV byly porovnávány primery CaYMV-3, CaYMV-4 (MOMOL a kol. 2004) a pCan1, pCan2 (BORROTO-FERNÁNDEZ a kol. 2008). V případě primerů CaYMV-3 a CaYMV-4 docházelo k tvorbě nespecifických produktů (Obr. 8). Pro další analýzy byly proto používány pouze primery pCan1 a pCan2. Amplifikované fragmenty měly velikost 315 bp (Obr. 9) pro CaYMV, 691 bp (Obr. 10) pro CaYSV a 720 bp (Obr. 11) pro HVX. Pro další potvrzení specifické PCR byly PCR produkty pozitivních vzorků sekvenovány. Získaná sekvence byla srovnána se sekvencemi dostupnými v GenBank. Identita srovnávané sekvence CaYSV byla více než 98 %, identita srovnávané sekvence CaYSV byla více než 96 % a identita srovnávané sekvence HVX byla více než 98 %.

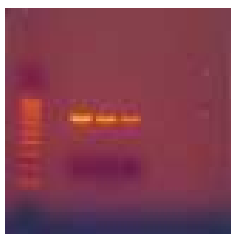


Obr. 8

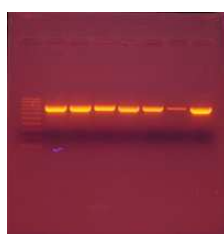


Obr. 9

Obr. 8, 9: Vizualizace CaYMV pomocí specifických primerů CaYMV-3 a CaYMV-4 (obr. 8) a pCan1 a pCan2 (Obr. 9)



Obr. 10



Obr. 11

Obr. 10, 11: Vizualizace CaYSV pomocí specifických primerů Canna-F1 a Canna-R2 (Obr. 10) a vizualizace HVX pomocí specifických primerů PHVXCP5 a PHVXCP3

ZÁVĚR

Na základě analýz provedených v roce 2010 byl potvrzen výskyt CaYSV, CaYMV na dosnách a HVX na bohyškách v České republice. Nejvíce byly rostliny dosen napadeny CaYSV, což je

MENDELNET 2010

velice zajímavý výsledek, vzhledem k tomu, že se jedná o virus objevený teprve v roce 2007. Byl také potvrzen výskyt směsných infekcí, CaYMV a CaYSV, což se shoduje s údaji profesora LOCKHARTA (2010, písemné sdělení) z univerzity v Minnesotě, který uvedl, že je velmi obtížné nalézt jednotlivé viry v rostlinách samostatně. Identifikace CaYMV, CaYSV a HVX byla provedena metodou PCR, byla tak ověřena funkčnost této metody pro izoláty vyskytující se v České republice.

Virové patogeny na doznách a bohyškách způsobují závažné ztráty, ochrana proti nim je velmi obtížná. Ochrana proti virům, které jsou přenášeny mechanicky, spočívá v preventivních opatřeních. Je důležité, aby veškeré nástroje a zařízení, které přijdou do styku s infikovaným materiálem, byly patřičně očištěny a desinfikovány, tak aby nedošlo k přenosu virů mezi jednotlivými rostlinami. Největší potenciál má ozdravování virózního materiálu metodou mikropropagace *in vitro*. Bohužel distribuce netestovaného materiálu stále převažuje nad snahou některých pěstitelů prodávat pouze zdravé rostliny z explantátových kultur. Přesto se tato metoda dostává stále více do podvědomí jak pěstitelů, tak i zákazníků a představuje cestu, jak zamezit rozšiřování virových patogenů.

LITERATURA

BORROTO-FERNÁNDEZ, E.G., MAGHULY, F., FELLNER, A., LAIMER, M. (2008): Determination of viral infections in an Austrian collection of *Canna indica*. Journal of Plant Diseases and Protection, 115 (3): 102–103.

CURRIER, S., LOCKHART, B.E.L. (1996): Characterization of a potexvirus infecting *Hosta* spp. Plant Dis. 80: 1040–1043.

LOCKHART, B.E.L. (2002): Differential response of *hosta* cultivars to infection by *Hosta* virus X potexvirus - a basis for practical disease management. Acta Horticulturae 568: 69–72.

HOLLINGS, M., STONE, O.M. (1971): *Tomato aspermy virus*. CMI=AAB Descriptions of Plant Viruses No. 79, Wallingford.

LOCKHART, B.E.L. (1988): Occurrence of *Canna yellow mottle virus* in North America. Acta Hort. 234: 69–72.

MARINO, M. T., RAGOZZINO, E., ALIOTO, D. (2009): *Canna yellow mottle badnavirus* (CaYMV) in Central and Southern Italy. Protezione delle Colture. 1: 18–21.

MOMOL, M.T., LOCKHART, B.E.L., DANKERS, H., ADKINS, S. (2004): *Canna yellow mottle virus* detected in *canna* in Florida. Plant Health Progress. 1–3.

MONGER, W.A., HARJU, V., SKELTON, A., SEAL, S.E., MUMFORD, R.A. (2007): *Canna yellow streak virus*: a new potyvirus associated with severe streaking symptoms in *Canna*. Archives of Virology 152 (8): 1527–1530.

PARK, M.H., RYU, K.H. (2003): Molecular evidence supporting the classification of *Hosta* virus X as a distinct species of the genus Potexvirus. Archives of Virology 148: 2039–45.

MENDELNET 2010

RYU, K.H., PARK, M.H., LEE, M.Y., LEE, J.S. (2006): Characterization and seed transmission of Hosta virus X isolated from Hosta plants. *Acta Hort.* 722: 91–93.

SAMUITIEN, M., NAVALINSKIENE, M. (2008): Occurrence of *Cucumber mosaic cucumovirus* on ornamental plants in Lithuania. *Zemdirbyste (Agriculture)*. 95 (3): 135–143.

YAMASHITA, S., NATSUAKI, T., DOI, Y., YORA, K. (1985): *Canna yellow mottle virus*, a non-enveloped small bacilliformvirus in *Canna* sp. *Ann Phytopathol Soc Japan* 51: 642–646.

ALAN, P. (2010): “Canna” We Save the Canna???. [cit. 2010]. Dostupné: <http://longwoodgardens.wordpress.com/2010/08/24/canna-we-save-the-canna/>

LOCKHART (2010): písemné sdělení