

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra ochrany rostlin



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Výskyt virových chorob v porostech cukrové řepy
a tykvovité zeleniny**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. David Kraus

Obor studia: Rostlinolékařství (SANIM)

Vedoucí práce: prof. Ing. Pavel Ryšánek, CSc.

Školitel: Ing. Lenka Grimová, Ph.D.

© 2023 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Výskyt virových chorob v porostech cukrové řepy a tykvovité zeleniny" jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 14. 4. 2023

Poděkování

Rád bych touto cestou poděkoval vedoucímu prof. Ing. Pavlu Ryšánkovi, CSc. a školiteli Ing. Lence Grimové, Ph.D. za trpělivé a odborné vedení, poskytnuté rady a připomínky při psaní práce.

Výskyt virových chorob v porostech cukrové řepy a tykvovité zeleniny

Souhrn

Choroby rostlin způsobené virovými patogeny působí každoročně významné ztráty na výnosu a kvalitě zemědělské produkce po celém světě. Tato diplomová práce poskytuje základní informace o výskytu virových patogenů na cukrové řepě a tykvovité zelenině v polních podmínkách České republiky. Detekce patogenů byla provedena pomocí třech diagnostických metod, a to konkrétně s využitím sérologických metod DAS-ELISA (double antibody sandwich – enzyme-linked immuno-sorbent assay), TAS-ELISA (triple antibody sandwich – enzyme-linked immuno-sorbent assay) a molekulární metody RT-PCR (reverzní transkripce – polymerázová řetězová reakce).

V první části zaměřené na virové choroby cukrové řepy se konkrétně jednalo o virus žloutenky řepy (beet yellows virus, BYV), virus mírného žloutnutí řepy (beet mild yellowing virus, BMYV) a virus chlorózy řepy (beet chlorosis virus, BChV). Pro tyto účely bylo vybráno několik lokalit z oblasti Středočeského, Kralovohradeckého, Pardubického, Olomouckého a Moravskoslezského kraje. U námi testovaných vzorků bylo přítomno 31,34 % zástupců z rodu Polorovirus a 19,4 % rostlin pozitivních na BYV. U části testovaných vzorků byla dále pomocí metody RT-PCR potvrzena přítomnost BChV, naopak přítomnost BMYV nebyla zaznamenána.

Dále byla tato diplomová práce zaměřena na výskyt virových patogenů u tykvovité zeleniny. Jednalo se konkrétně o virus žluté mozaiky cukety (zucchini yellow mosaic virus, ZYMV), virus mozaiky okurky (cucumber mosaic virus, CMV), virus mozaiky tykve (squash mosaic virus, SqMV), virus mozaiky vodního melounu (watermelon mosaic virus, WMV) a virus žloutnutí okurky přenášený mšicemi (cucurbit aphid-borne yellow virus, CABYV). U námi testovaných vzorků byli přítomni pouze zástupci ZYMV a to u 88,81 % testovaných rostlin, WMV u 87,50 % a CMV pouze u 3,95 % testovaných rostlin.

Klíčová slova: ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), RT-PCR (Reverse Transcription – Polymerase chain reaction), rostlinné viry, cukrová řepa, tykvovitá zelenina.

Occurrence of virus diseases in sugar beet and cucurbitaceous vegetable

Summary

Plant diseases caused by viral pathogens cause significant losses in the yield and quality of agricultural production worldwide every year. This diploma thesis provides basic information about the incidence of viral pathogens on sugar beet and cucurbit vegetables in the field conditions of the Czech Republic. Pathogens were detected using three diagnostic methods, specifically using the serological methods DAS-ELISA (double antibody sandwich – enzyme-linked immuno-sorbent assay), TAS-ELISA (triple antibody sandwich – enzyme-linked immuno-sorbent assay) and molecular method RT-PCR (reverse transcription – polymerase chain reaction).

In the first part of the thesis focused on virus diseases of sugar beet, it was specifically the beet yellows virus (BYV), the beet mild yellowing virus (BMV) and the beet chlorosis virus (BChV). Several locations from the, Central Bohemian region, Hradec Kralove region, Pardubice region, Olomouc region and Moravian-Silesian region were selected for the purpose. In the samples we tested, were presence of the genus *Polerovirus* in 31.34 % and BYV in 19.4 % of the tested plants. In part of the tested samples, the presence of BChV was further confirmed using the RT-PCR method, on the contrary, the presence of BMV was not confirmed.

Furthermore, this thesis focused on the incidence of viral pathogens in cucurbit vegetables. These were specifically zucchini yellow mosaic virus (ZYMV), cucumber mosaic virus (CMV), squash mosaic virus (SqMV), watermelon mosaic virus (WMV) and cucurbit aphid-borne yellow virus (CABYV). In the samples we tested, were only representatives of ZYMV who was present in 88.81 % of the tested plants, WMV in 87.50 % and CMV in only 3.95 % of the tested plants.

Keywords: ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), RT-PCR (Reverse Transcription – Polymerase chain reaction), plant viruses, sugar beet, cucurbit vegetables.

Obsah

1	Úvod	10
2	Vědecká hypotéza a cíle práce	11
3	Literární rešerše	12
3.1	Cukrová řepa	12
3.1.1	Nároky cukrové řepy na prostředí	12
3.1.2	Škodlivé organismy cukrové řepy	13
3.1.3	Ochrana cukrové řepy	14
3.2	Tykvovitá zelenina	15
3.2.1	Nároky tykvovité zeleniny na prostředí	16
3.2.2	Choroby a škůdci tykvové zeleniny	16
3.2.3	Ochrana tykvovité zeleniny	17
3.3	Virové choroby rostlin	18
3.3.1	Viry	18
3.3.2	Morfologie a struktura virů	18
3.3.3	Přenos infekce u virových patogenů	19
3.3.4	Rozvoj virové infekce	20
3.3.5	Příznaky virových chorob na rostlinách	21
3.3.6	Obrana rostliny proti virům	22
3.3.7	Klasifikace virů	22
3.4	Virové choroby cukrové řepy	23
3.4.1	Virus žloutenky řepy (beet yellows virus, BYV)	23
3.4.1.1	Popis virové částice	23
3.4.1.2	Rozšíření	23
3.4.1.3	Hostitelský okruh	23
3.4.1.4	Příznaky	24
3.4.1.5	Přenos	24
3.4.1.6	Ochrana	24
3.4.1.7	Význam	25
3.4.2	Virus mírného žloutnutí řepy (beet mild yellowing virus, BMV)	25
3.4.2.1	Popis virové částice	25
3.4.2.2	Rozšíření	25
3.4.2.3	Hostitelský okruh	25
3.4.2.4	Příznaky	26
3.4.2.5	Přenos viru	26
3.4.2.6	Ochrana	26
3.4.2.7	Význam	26
3.4.3	Virus chlorózy řepy (beet chlorosis virus, BChV)	27
3.4.3.1	Popis virové částice	27

3.4.3.2 Rozšíření.....	27
3.4.3.3 Hostitelský okruh.....	27
3.4.3.4 Příznaky.....	27
3.4.3.5 Přenos viru	27
3.4.3.6 Ochrana.....	28
3.4.3.7 Význam	28
3.5 Virové choroby tykvovité zeleniny	29
3.5.1 <i>Virus žloutnutí okurky přenášený mšicemi (cucurbit aphid-borne yellows virus, CABYV)</i>	29
3.5.1.1 Popis virové částice.....	29
3.5.1.2 Rozšíření.....	29
3.5.1.3 Hostitelský okruh.....	29
3.5.1.4 Příznaky.....	29
3.5.1.5 Přenos viru	30
3.5.1.6 Ochrana.....	30
3.5.1.7 Význam	30
3.5.2 <i>Virus mozaiky okurky (cucumber mosaic virus, CMV)</i>	31
3.5.2.1 Popis virové částice.....	31
3.5.2.2 Rozšíření.....	31
3.5.2.3 Hostitelský okruh.....	31
3.5.2.4 Příznaky.....	31
3.5.2.5 Přenos viru	32
3.5.2.6 Ochrana.....	32
3.5.2.7 Význam	32
3.5.3 <i>Virus mozaiky tykve (squash mosaic virus, SqMV)</i>	33
3.5.3.1 Popis virové částice.....	33
3.5.3.2 Rozšíření.....	33
3.5.3.3 Hostitelský okruh.....	33
3.5.3.4 Příznaky.....	33
3.5.3.5 Přenos viru	34
3.5.3.6 Ochrana.....	34
3.5.3.7 Význam	34
3.5.4 <i>Virus žluté mozaiky cukety (zucchini yellow mosaic virus, ZYMV)</i>	35
3.5.4.1 Popis virové částice.....	35
3.5.4.2 Rozšíření.....	35
3.5.4.3 Hostitelský okruh.....	35
3.5.4.4 Příznaky.....	35
3.5.4.5 Přenos viru	35
3.5.4.6 Ochrana.....	36
3.5.4.7 Význam	36
3.5.5 <i>Virus mozaiky vodního melounu (watermelon mosaic virus, WMV)</i>	36

3.5.5.1 Popis virové částice	36
3.5.5.2 Rozšíření	36
3.5.5.3 Hostitelský okruh.....	36
3.5.5.4 Příznaky	37
3.5.5.5 Přenos viru	37
3.5.5.6 Ochrana	37
3.5.5.7 Význam	37
3.6 Způsoby detekce virů u rostlin.....	38
3.6.1 Symptomatické metody.....	38
3.6.2 Biologické metody	38
3.6.3 Fyzikální metody.....	38
3.6.3.1 Elektronová mikroskopie	38
3.6.4 Sérologické metody	39
3.6.4.1 ELISA.....	39
3.6.5 Molekulární metody	40
3.6.5.1 RT-PCR	40
3.6.5.2 Real-time PCR.....	40
4 Materiál a metody	41
4.1 Metodický postup pro odběr vzorků	41
4.1.1 Biologický materiál	41
4.1.2 Odběr vzorků.....	41
4.1.3 Lokality odběru.....	41
4.2 Detekce virů pomocí sérologické metody DAS a TAS ELISA	43
4.2.1 Protilátky	43
4.2.2 DAS ELISA.....	43
4.2.3 TAS ELISA	44
4.2.3.1 Složení použitých pufrů.....	45
4.3 Detekce virů pomocí metody RT-PCR	45
4.3.1 Izolace celkové RNA pomocí Spectrum™ Plant Total RNA Kit (Sigma-Aldrich)	45
4.3.2 Stanovení koncentrace a čistoty celkové RNA.....	46
4.3.3 Reverzní transkripce	46
4.3.4 Polymerázová řetězová reakce.....	46
4.3.4.1 Použité primery	47
4.3.5 Elektroforetická separace nukleových kyselin	47
4.3.5.1 Složení použitých pufrů.....	48
5 Výsledky.....	49
5.1 Detekce virových patogenů u cukrové řepy.....	49
5.1.1 Detekce virových patogenů u cukrové řepy pomocí metody ELISA	49
5.1.2 Detekce virových patogenů u cukrové řepy pomocí metody RT-PCR.....	53
5.2 Detekce virových patogenů u tykvovitě zeleniny	54
5.2.1 Detekce virových patogenů u tykvovitě zeleniny pomocí metody ELISA.....	54

6	Diskuze.....	64
6.1	Stav porostů cukrové řepy na území České republiky	64
6.2	Stav porostů tykvovité zeleniny na území České republiky	65
7	Závěr	67
8	Literatura	68
8.1	Literární informační zdroje	68
8.2	Elektronické informační zdroje.....	71

1 Úvod

Choroby rostlin způsobené virovými patogeny působí každoročně významné ztráty na výnosu a kvalitě zemědělské produkce po celém světě. Každá ze zemědělsky využívaných plodin je hostitelem celé řady ekonomicky významných virů, které se vyskytují s různou frekvencí. Jejich výskyt je často ovlivněn celou řadou faktorů. Mnohé z těchto virů sdílí způsob přenosu a ostatní biologické vlastnosti. Tyto viry se často vyskytují ve směsné infekci dvou i více virů, jež mohou mít synergické nebo antagonistické působení na intenzitu projevu výsledných symptomů. Proto nám výzkum virů poskytuje celou řadu nových poznatků, které nám mohou pomoci při ochraně proti jednotlivým virovým chorobám.

Cukrová řepa (*Beta vulgaris* var. *altissima*) představuje v rámci okopanin pěstovaných v České republice ekonomicky nejvýznamnější plodinu. Pěstuje se především pro výrobu cukru. V poslední době se intenzivně rozvíjí i její využití k výrobě lihu, dále používaného především jako biopalivo (Pulkrábek *et al.* 2007).

Na cukrové řepě se vyskytuje celá řada virových chorob. V současné době nabývají na významu především viry způsobující tzv. chorobu virového žloutnutí řepy, jež způsobuje virus žloutenky řepy (beet yellows virus, BYV), virus mírného žloutnutí řepy (beet mild yellowing virus, BMYV) a virus chlorózy řepy (beet chlorosis virus, BChV). Virové žloutenky jsou známé již od 30. let 20. století (Watson 1940). Před zavedením insekticidního moření osiva látkami ze skupiny neonikotinoidů byl běžný jejich každoroční výskyt. V dalších letech díky využívání zmíněného moření byl výskyt a ztráty způsobené virovými žloutenkami minimální. V roce 2018 však Evropská komise uvedla v platnost zákaz moření osiv polních plodin insekticidními látkami z této skupiny. České republice, a i některým dalším členským zemím Evropské unie, byla doposud každoročně udělována výjimka na používání látky thiamethoxam pro účely moření osiva cukrové řepy. 19. 1. 2023 však Evropský soudní dvůr rozhodl o neoprávněnosti těchto výjimek. Zmíněný zákaz byl již uplatněn v roce 2019 ve Francii, kde došlo v druhém roce tohoto nařízení k rozšíření virových žloutek, které se výrazně projevilo na výsledných výnosech (Chochola 2021). Podobný průběh nárůstu výskytu virových žloutenek je pravděpodobný i v podmínkách České republiky.

Význam zeleniny ve výživě člověka v posledních letech neustále stoupá, zejména díky její celoroční dostupnosti a zájmu společnosti o zdravou či racionální výživu. Druhy plodové zeleniny z čeledi tykvovitých (*Cucurbitaceae*) tvoří významnou skupinu zeleniny, kterou obecně nazýváme tykvovitá zelenina (Petříková *et al.* 2006). Rostliny z této čeledi jsou napadány zejména virem žluté mozaiky cukety (zucchini yellow mosaic virus, ZYMV), virem mozaiky okurky (cucumber mosaic virus, CMV), virem mozaiky tykve (squash mosaic virus, SqMV), virem mozaiky vodního melounu (watermelon mosaic virus, WMV), virem žloutnutí okurky přenášený mšicemi (cucurbit aphid-borne yellow virus, CABYV) a celou řadou dalších virů které způsobují ekonomicky významné ztráty na tržní produkci (Wisler *et al.* 1998).

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Mezi hlavní vědecké hypotézy předkládané diplomové práce patří předpoklad, že v porostech cukrové řepy se vyskytují viry, které jsou původci choroby virového žloutnutí řepy. Výskyt těchto patogenů by se mohl po zákazu používání mořidel na bázi neonikotinoidů postupně zvyšovat.

Druhou hypotézou této práce je předpoklad možného výskytu velkého množství virových chorob na tykvovité zelenině, kde kromě viru žluté mozaiky cukety má i velký význam virus mozaiky vodního melounu.

Hlavním cílem diplomové práce bylo tedy zjistit současné spektrum a význam virů, které se v ČR na cukrové řepě a tykvovité zelenině vyskytují.

3 Literární rešerše

3.1 Cukrová řepa

Cukrová řepa (*Beta vulgaris* var. *altissima*) je dvouletá bylina patřící do čeledi laskavcovitých (*Amaranthaceae*). Tato bylina se vyznačuje svým kúlovým kořenem. Kořen je ztloustlý v kuželovitou, dolů protaženou bulvu, která je na povrchu žlutobílá a má bílou dužinu (Hejný & Slavík 2003).

Cukrová řepa se pěstuje především pro výrobu cukru. V poslední době se intenzivně rozvíjí i její využití k výrobě lihu, dále používaného především jako biopalivo. Pro tyto účely je sklizena podzemní část rostliny, již v prvním roce pěstování (Pulkrábek *et al.* 2007).

Jedná se o hojně pěstovanou plodinu v našich podmínkách. Celosvětově je po cukrové třtině (*Saccharum officinarum*) druhou nejdůležitější plodinou využívanou pro výrobu cukru. Chemicky není rozdíl mezi cukrem třtinovým a cukrem řepným. V obou případech jde o sacharózu. Cukrová třtina však poskytuje v průměru o 20–25 % vyšší produkci cukru z jednotky plochy než cukrová řepa. Cukrová třtina je však, ve srovnání s cukrovou řepou, limitována svým areálem pěstování jen do tropických oblastí. Právě to dělá z cukrové řepy dominantní plodinu mírného pásma, a je také nezbytnou surovinou pro cukrovarnický průmysl (Pulkrábek *et al.* 2007). Výroba cukru z cukrové řepy tvoří asi 16 procent světové produkce cukru. Např. světová produkce cukrové řepy v roce 2021 činila zhruba 270 milionů tun (FAO 2022).

Při značném využití intenzivních pěstitelských technologií se jedná o bezpochyby nejproduktivnější plodinu mírného zeměpisného pásma. Nejvyšší hektarové výnosy jsou dosahovány především při pěstování pod závlahou a přesahují 60 tun z jednoho hektaru. Největší plochy pěstování cukrové řepy jsou v Rusku, na Ukrajině, Číně, USA, Německu, Francii, Polsku a Turecku (Pulkrábek *et al.* 2007). V České republice dosahovala roku 2021 produkce cukrové řepy 4,35 milionů tun a osevní plocha 63916 ha (Ministerstvo zemědělství 2023).

3.1.1 Nároky cukrové řepy na prostředí

Cukrová řepa se nejčastěji zařazuje na nejkvalitnější pozemky. Kvalitní řepařská půda má mít optimální strukturu a pórovitost, objemovou hmotnost pod $1,45 \text{ g.cm}^{-3}$ a nízký penetrační odpor půdy maximálně 3,5 MPa, příznivý vzdušný a vodní režim, neutrální až slabě alkalickou reakcí s hodnotami pH 6,8 až 7,3 a obsah kvalitního humusu nejlépe nad 2,5 %. Těmto požadavkům odpovídají podmínky řepařské výrobní oblasti. Z bonitačních produkčních parametrů pro cukrovou řepu, vyjádřených výnosem bulev a utříděných podle hlavních půdně klimatických jednotek vyplývá, že nejvhodnější klimatické regiony jsou T3 (teplý, mírně vlhký) a T2 (teplý, mírně suchý) a půdními typy hnědozem (HM), černozem (CE), luvizem (LU) a fluvizem (FL) (Pulkrábek *et al.* 2007).

V osevním postupu zařazujeme cukrovou řepu nejčastěji po obilné předplodině se zaorávkou hnoje v dávce 30-50 t/ha, nejčastěji po ozimé pšenici. Zcela nevhodnými

předplodinami jsou jetel, vojtěška a kukuřice, které zhoršují vzcházejivost cukrové řepy a také u luskovin dochází k zhoršení jakosti řepy pro pozdní čerpání uvolňovaného dusíku z posklizňových zbytků. Do osevního postupu není vhodné zařazovat řepku a ostatní brukvovité plodiny, jež mohou být hostitelé háďátek parazitujících na řepě (Chochola 2010).

Vývoj odběru hlavních živin během vegetace je soustředěn do června a července. Koncentrace živin v rostlině v dalších měsících klesá. Živiny jsou v rostlině zředovány s narůstající biomasou. V současné době orientujeme hnojení přímo k cukrovce. Výše dávek živin vychází z analýzy půdy a z operativního stanovení jarní zásoby dusíku v půdě, zejména z rozborů rostlin, neboť cukrová řepa přijímá dusík většinou v nitrátové formě (Pulkrábek *et al.* 2007). Cukrová řepa je pak zvláště náročná na draslík, který čerpá v průběhu celé vegetace a ovlivňuje její cukernatost. Nelze opomínat důležitost bóru jako mikrobiogenního prvku, který se uplatňuje při floémovém transportu sacharózy a při dalších procesech metabolismu cukrů (Bittner 2012).

3.1.2 Škodlivé organismy cukrové řepy

V prvních růstových fázích řepy jsou škody způsobeny zejména maločlencem čárkovitým (*Atomaria linearis*), květilkou řepnou (*Pegomya hyoscyamin*), dřepčíkem řepným (*Chaetocnema tibialis*) a dřepčíkem rdesnovým (*Chaetocnema concinna*).

Maločlenec čárkovitý škodí zejména na vzcházející řepě, kde vytváří požerky na hypokotylu a kořínkách přerušující vodivé cesty. Vzcházející rostlinky řepy následně odumírají.

Dospělci dřepčíků mohou způsobit významné škody, zejména u porostů řepy, při jejímž setí bylo použito jednoklíčkové osivo. Dřepčící vyžírají otvory na děložních lístcích vzcházejících rostlin a tím výrazně snižují listovou plochu. Ačkoliv larvy dřepčíků ožírají kořínky rostlin, nepůsobují výrazné výnosové ztráty (Kazda 2014).

Larvy květilky vyžírají mezofyl děložních i prvých pravých listů. Na počátku se objevují chodbičkové miny, které se později rozšiřují do bělavě zelených, až průsvitných plošných min.

Na cukrové řepě se dále vyskytuje mšice maková (*Aphis fabae*) a mšice broskvoňová (*Myzus persicae*), které škodí sáním na listech. Listy cukrové řepy reagují zduřením, kroutí se, žloutnou a odumírají. Významné jsou však nepřímé škody, způsobené přenosem virů, jejichž jsou mšice hlavními vektory.

V prvních růstových fázích mohou být vzcházející rostlinky postiženy spálou řepy, způsobenou komplexem hub (*Rhizoctonia solani*, *Aphanomyces cochlioides* a *Pythium spp*) (Bittner 2018).

Mezi další významné živočišné škůdce cukrové řepy patří háďátka řepné (*Heterodera schachtii*). V důsledku sání a fyzického stresu snižuje účinnost kořenového systému. Rostlina je menší, na kořenech se vytváří mnoho vláscitých kořínků a je značně snížený výnos bulev (Pulkrábek *et al.* 2007).

Cerkosporová listová skvrnitost (*Cercospora beticola*) je nejškodlivější houbová choroba na cukrové řepě. K rozvoji této choroby dochází zejména za teplého a vlhkého počasí, zpravidla se vyskytuje od července. Zpočátku se na nejstarších listech objevují okrouhlé skvrny o průměru 3–5 mm s šedým středem a hnědým okrajem. Na nekrotizovaných skvrnách jsou vidět stromata jako malé černé tečky. Později, při vhodných podmínkách pro rozvoj této choroby, se pokryjí léze šedavým povlakem konidií. Skvrny postupně splývají a dochází k usychání celých listů (Prokinová 2014).

Na cukrové řepě se také vyskytuje celá řada virových chorob. Mezi nejvýznamnější virové choroby patří virus žloutenky řepy (beet yellows virus, BYV), virus mírného žloutnutí řepy (beet mild yellowing virus, BMV), virus chlorózy řepy (beet chlorosis virus, BChV) a virus mozaiky řepy (beet mosaic virus, BtMV). Podrobněji o nich bude pojednávat kapitola 3.4 (Virové choroby cukrové řepy).

Dalším důležitým virem vyskytujícím se na cukrové řepě je virus nekrotického žloutnutí žilek řepy (beet necrosis yellow vein virus, BNYVV). Tento virus je přenášen půdním vnitrobuněčným parazitem *Polymyxa betae* perzistentním způsobem. Virus přetrvává v trvalých sporách vektora v půdě po dobu 15 až 20 let. Příznaky se objevují od června na nadzemní části chlorózou až žloutnutím listů v ohniscích. U silně napadených rostlin dochází ke žloutnutí a nekróze žilek. Typické příznaky se projevují na kořenech a to nadměrnou tvorbou rychle odumírajících postranních kořínků, kdy vzniká tzv. voutsatost bulvy (Víchová 2021).

3.1.3 Ochrana cukrové řepy

Ochrana proti škůdcům vzcházející řepy a časným infekcím virovými žloutenkami způsobeným nálety mšic do současné doby spočívala v insekticidním moření osiva látkami ze skupiny neonikotinoidů (thiamethoxam, clothianidin, imidacloprid). V roce 2018 však Evropská komise uvedla v platnost zákaz moření osiv polních plodin insekticidními látkami z této skupiny. V České republice i v některých dalších členských zemích Evropské unie byla každoročně udělována výjimka na používání látky thiamethoxam pro účely moření osiva cukrové řepy. 19. 1. 2023 Evropský soudní dvůr rozhodl o neoprávněnosti těchto výjimek. Pro rok 2023 má již Česká republika výjimku na moření neonikotinoidy schválenou. V dalších letech však bude moření touto látkou zakázáno i u nás (Chochola 2021). V následujících letech bude proto nutné sledovat přítomnost těchto škůdců. A nahradit původní ochranu, které zajišťovalo insekticidní moření, několika ošetřeními některými z dostupných insekticidních přípravků např. Afinto, Pirimor 50 WG, Teppeki nebo pyretroidy Karate se Zeon technologií 5 CS, Nexide, Rapid (Agromanual 2022).

Z hlediska ochrany proti háďátku řepném je třeba uplatňovat dostatečný odstup cukrovky v osevním sledu a to minimálně 4 roky. A následné zařazení háďátku nepřátelských plodin (např. jeteloviny, kukuřice, čekanka, bob) a omezení háďátku přátelských brukvovitých

druhů. V případě zamořených pozemků hádátkem je možnost využití tolerantních odrůd cukrové řepy (Pulkrábek *et al.* 2007).

Koncem července bychom měli věnovat zvýšenou pozornost ochraně proti cerkosporové listové skvrnitosti. Důležité je včas rozpoznat první příznaky choroby. Ochrana se provádí 5–8 dní po zjištění prvního výskytu nebo do 4 dnů po větším dešti, kdy jsou příznivé podmínky pro šíření choroby. Z dostupných přípravků lze aplikovat: Amistar Gold, Belanty, Eminent 125 ME, Spyrale. Dále je nutné v případě výskytu vhodných podmínek pro rozvoj choroby ošetření po 2 týdnech opakovat. Jako preventivní ochranná opatření se doporučují důsledné zapravení posklizňových zbytků cukrové řepy, uplatňovat dostatečný odstup cukrovky v osevním sledu, minimálně 4 roky a nepřehnojování dusíkem (Agromanual 2022).

Přípravky užívané při ochraně proti cerkosporové skvrnitosti jsou také účinné proti padlí řepy a ramuláriové listové skvrnitost řepy (Kazda 2003).

O ochraně cukrové řepy proti virovým chorobám bude podrobněji pojednávat kapitola 3.4 (Virové choroby cukrové řepy).

3.2 Tykvovitá zelenina

Pod pojmem zelenina rozumíme většinou kulturní rostliny, nebo jejich části sloužící lidem jako potrava konzumující se často v syrovém stavu. Celá řada druhů zeleniny patří do čeledi tykvovitých (*Cucurbitaceae*). Čeleď samotná zahrnuje asi 850 druhů zařazených do 118 rodů. Je kosmopolitně rozšířena, vyskytuje se na všech světových světadílech, kromě Antarktidy. Tato čeleď zahrnuje nejrůznější hospodářky využívané druhy rostlin, od známých a velice oblíbených okurek (*Cucumis sativus*), melounů (*Citrullus lanatus*) a tykví (*Cucurbita pepo*), po méně známé až neznámé druhy jako je třeba lufa (*Luffa spp.*) nebo benikáza (*Benincasa hispida*) (Petříková *et al.* 2006).

Co do počtu odrůd se jedná o velmi bohatou skupinu zeleniny. Jako zástupci plodové zeleniny pocházející z teplých oblastí mají určitá specifika. Vyznačují se vysokou náročností na půdní a klimatické podmínky, a to zejména na teplotní nároky (citlivost na mráz). V našich klimatických podmínkách vyžaduje výběr vhodné lokality nebo využívání pěstitelských zařízení jako jsou skleníky, fóliovníky, netkané textilie, využívané v polních podmínkách na počátku vegetačního období (Hlava *et al.* 1998).

Z tykvovité zeleniny se ve světě nejvíce pěstují okurky. Odhaduje se, že v roce 2021 světová produkce okurek činila 93 milionů tun. A u různých odrůd dýní a tykví jako světově druhé nejpěstovanější tykvovité zeleniny činila produkce v roce 2021 23,78 milionů tun (FAO 2022). Obdobná situace je v České republice, kde patří okurky také mezi nejpěstovanější tykvovitou zeleninu. Ministerstvo zemědělství (2022) uvádí, že bylo v roce 2021 vyprodukováno na 312 ha 11,9 tisíc tun okurek a u tykví činila produkce 12,4 tisíc tun při osevní ploše 673 ha.

3.2.1 Nároky tykvovité zeleniny na prostředí

Zelenina se nejčastěji zařazuje na nejkvalitnější pozemky. Půda pro pěstování zeleniny by měla být snadno obdělávatelná, drobtovitě struktury s propustnou spodinou, dostatečným obsahem vzduchu, vláhy a snadno přijatelných živin. Z fyzikálního hlediska jsou pro zeleninu vhodné půdy písčitohlinité, půdy naplavené či humózní tmavé písčiny (Hlava *et al.* 1998).

Teplota je v našich podmínkách pro tykvovitou zeleninu jedním z limitujících faktorů jejího pěstování. Proto je důležité věnovat pozornost mikroklimatickým podmínkám při výběru pozemku pro jejich pěstování. Kromě rovinatých poloh jsou také vhodné mírné jižní nebo jihozápadní svahy. Mikroklimatické podmínky můžeme také zlepšit výsadbou kulis z vysokých rostlin např. kukuřice nebo slunečnice. Tyto kulisy chrání porosty proti výsušným větrům a zvyšují průměrnou teplotu v době vegetace o 2 až 3 °C. Dalším významným faktorem ovlivňující pěstitelský úspěch je délka dne. U krátkodenní zeleniny se při dlouhém dni (den delší než 12 hodin) nevytváří generativní orgány, dochází pouze k tvorbě biomasy. Začínají kvést teprve, až když jsou osvětleny po dobu kratší než 12 hodin. Do této skupiny patří většina tropických a subtropických druhů, byly ovšem i vyšlechtěny odrůdy indiferentní (Petříková *et al.* 2006).

Vláhové nároky u tykvovité zeleniny dosahují svého maxima v období po odkvětu rostlin a nasazování plodů. V tomto zásadním období je potřeba podpořit rostliny vydatnou závlahou (Petříková & Hlušek 2012).

3.2.2 Choroby a škůdci tykvové zeleniny

Mezi významné škůdce patří sviluška chmelová (*Tetranychus urticae*). Poškození tímto roztočem se projevuje světlými tečkovitými skvrnami na listech. Napadené rostliny jsou opředeny tenkou pavučinkou (Hlava *et al.* 1998).

Častými škůdci ve sklenících a ostatních pěstebních zařízeních jsou molice skleníková (*Trialeurodes vaporariorum*) a molice bavlníková (*Bemisia tabaci*). Dospělci i nymfy tohoto škůdce se živí sáním na spodní straně listu. Rostliny jsou kromě přímého poškození sáním sekundárně poškozovány vylučováním medovice (Štamberková 2012).

Na tykvovité zelenině se dále vyskytuje mšice bavlníková (*Aphis gossypii*), mšice řešetláková (*Aphis nasturtii*) a mšice krušínová (*Aphis frangulae*), které škodí sáním na listech. Listy rostlin reagují zduřením, kroutí se a dochází i ke barevným změnám listu. Významné jsou však nepřímé škody, způsobené přenosem virů chorob, jejichž jsou mšice hlavními vektory.

V prvních růstových fázích mohou být vzcházející rostlinky postiženy padáním klíčnic rostlin, způsobeným komplexem hub (*Rhizoctonia solani* a *Pythium spp.*).

Z bakteriálních chorob může být tykvovitá zelenina napadena bakteriální skvrnitostí okurek způsobené *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*. Projevem této choroby jsou sytě zelené vodnaté nepravidelně hranaté skvrny na listech. Skvrny zasychají a uschlé pletivo často vypadává. U napadených rodin se mohou také vyskytovat hniloby plodů (Kazda 2003).

V posledních letech je nejvýznamnější chorobou okurek v polních podmínkách plíseň okurková (*Pseudoperenospora cubensis*). Primárním příznakem jsou světle zelené skvrny na listových čepelích. Skvrny rychle žloutnou a na spodní straně listu vyrůstá šedý povlak sporangioforů. Později se skvrny zvětšují. Napadené pletivo zasychá. Konečným příznakem je zaschnutí celé rostliny (Hlava *et al.* 1998).

Plody tykvovité zeleniny mohou být dále napadeny polyfágními patogeny, kteří způsobují jejich uhnívání jako je např. hlízenka (*Sclerotinia sclerotiorum*) a plíseň šedá (*Botrytis cinerea*) (Kazda 2003).

Další často vyskytující se chorobou na tykvovité zelenině je padlí (*Erysiphe cichoracearum*, *Sphaerotheca fuliginea*) Hlavním příznakem jsou bílé povlaky mycelia pokrývající svrchní stranu listu. Tato choroba se objevuje většinou až ke konci vegetace, kdy již nepůsobí zásadní výnosové ztráty (Štamberková 2012).

Na tykvovité zelenině se také vyskytuje celá řada virových chorob. Mezi nejvýznamnější virové patogeny patří virus žluté mozaiky cukety, virus mozaiky okurky, virus mozaiky tykve, virus mozaiky vodního melounu a virus žloutnutí okurky přenášený mšicemi. Podrobněji o těchto virových patogenech bude pojednávat kapitola 3.5 (Virové choroby tykvovité zeleniny).

Mezi další viry, které byly do dnešní doby popsány na tykvovité zelenině patří zucchini yellow fleck virus (ZYFV), tomato black ring virus (TBRV), melon necrotic spot virus (MNSV), cucurbit chlorotic yellows virus (CCYV), morrocan watermelon virus (MWMV), cucumber Bulgarian latent virus (CBLV), cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV), cucumber necrosis virus (CNV), cucumber leaf spot virus (CLSV), papaya ring spot virus (PRSV), watermelon silver mottle virus (WSMoV), cucurbit yellow stunting disorder virus (CYSDV) a tomato spotted wilt virus (TSWV) (Wisler *et al.* 1998).

3.2.3 Ochrana tykvovité zeleniny

Při výskytu svilušky chmelové mohou být porosty ošetřeny některým z dostupných akaricidů, např. přípravky Eradicoat Max, Floramite 240 SC, Kanemite 15 SC, Mirical. Nebo může být využita biologická ochrana v podobě dravých roztočů *Typhlodromus pyri* nebo *Phytoseiulus persimilis* (Agromanual 2022).

Při ochraně proti molícím můžeme využívat metodu monitoringu pomocí žlutých lepových desek. Ošetření provádíme při zjištění výskytu dospělých jedinců. Porosty mohou být ošetřeny některým z dostupných insekticidních přípravků, Movento 100 SC, DEMETRINA 25 EC, Scatto, Benevia. Lze také využít celou řadu bio-agens např. *Encarsia formosa* a *Eretmocerus eremicus* (Agromanual 2022).

Při zakládání porostu je nutné uplatnit preventivní opatření proti padání klíčnicích rostlin, mezi které patří dezinfekce půdy nebo fungicidní moření osiva (Kazda 2003).

Plíseň okurková je nejdůležitější chorobou tykvovité zeleniny, proti které je nutné uplatňovat komplex preventivních ochranných opatření, jmenovitě optimální výživa a závlaha

(směřování závlahy ke kořenům a snaha zabránění ovlhčení listů), opatření vedoucí k rychlému nástupu plodnosti a sklizně (včasné výsevy a výsadby) a využívání rezistentních nebo tolerantních odrůd. První fungicidní ošetření se provádí v souladu s vyhledávanou signalizací, další pak podle průběhu počasí. Výskyt choroby podporuje vysoká vzdušná vlhkost a teploty neklesající pod 15 °C (Kazda 2003). Porosty mohou být ošetřeny některým z dostupných fungicidních přípravků na např. ALIETTE 80 WG, DITHANE M 45, ENERVIN SC, INFINITO, ORTIVA nebo přípravky na bázi mědi. Při výběru vhodných přípravků je třeba volit podle načasování sklizně a délky ochranných lhůt daného přípravku (Agromanual 2022).

3.3 Virové choroby rostlin

3.3.1 Viry

Viry řadíme do skupiny tzv. nebuněčných částic společně s viroidy, virusoidy a priony. Tato skupina struktur se nachází na hranici živých a neživých systémů (Lhotský 2015). Jedná se o částice, které jsou mnohonásobně menší než buňky. Žijí jako obligátní vnitrobuněční parazité. Vně hostitelské buňky nevykazují viry žádné známky života. Nemají vlastní metabolismus, nejsou schopny proteosyntézy, transformace energie a samy se množit. Aby se mohly rozmnožit, musí proniknout do hostitelské buňky a využít její syntetický aparát pro syntézu vlastních bílkovin a replikaci genetické informace (Rosypal *et al.* 2002).

Rostlinné viry mohou způsobit velké ztráty na výnosech a ovlivňují zásoby potravin pro lidstvo i vzhled krajiny. Podle Akademie věd České republiky (2021) virové choroby a viroidy působí na celém světě každoročně ztráty na kvalitě a výnosu zemědělské produkce ve výši více než 600 miliard korun. U některých plodin jsou tyto ztráty až katastrofální. Hlavní příčinou vzniku epidemií je mezinárodní obchod, protože plodiny, osiva i sadba se ve velkých objemech transportují mezi kontinenty. Šíří se tak nové viry a viroidy, agresivnější varianty známých virů i jejich hmyzí přenašeči, kteří se adaptují v nových oblastech v důsledku klimatické změny.

3.3.2 Morfologie a struktura virů

Základní jednotka viru schopná infikovat hostitelskou buňku a množit se v ní se nazývá virion. Virion se skládá z vnitřní části nazývané nukleoid, tvořené nukleovou kyselinou, jež kóduje genetickou informaci viru, a vnější proteinové schránky, obklopující nukleovou kyselinu viru, která se nazývá kapsida. Celý komplex se nazývá nukleokapsid (Rosypal *et al.* 2002).

Nukleoid viru může obsahovat nukleovou kyselinu, která je buď ve formě RNA nebo DNA. Obě tyto formy nukleové kyseliny mohou být dále ve formě jednovláknové (ss) či dvouvláknové (ds). Jednovláknovou formu RNA dále dělíme na pozitivní (+RNA) a negativní (–RNA). Těchto rozdílů využívá tzv. Baltimorská klasifikace, která rozděluje viry do sedmi skupin, jmenovitě dsDNA viry, ssDNA viry, dsRNA viry, ssRNA viry s pozitivní polaritou, ssRNA viry

s negativní polaritou, ssRNA viry s reverzní transkriptázou, dsDNA viry s reverzní transkriptázou (Knipe *et al.* 2007).

Kapsida viru se skládá z proteinových podjednotek tzv. kapsomer. Jejich tvar umožňuje vzájemné skládání do větších celků. Skládáním kapsomer vznikají určité symetrie kapsidu, které rozdělujeme na ikosaedrální (kubická), helikální (spirální) nebo komplexní (Knipe *et al.* 2007). Z kapsidy mohou vyčnívat různé výběžky nebo hroty. Tyto struktury jsou, stejně jako kapsida viru, bílkovinného charakteru. Mnohé viry jsou z vnějšku navíc obaleny lipoproteinovou dvouvrstvou membránou, pocházející z cytoplazmatické nebo jaderné membrány buněk, ze které se daný virus uvolnil (Rosypal *et al.* 2002). Tento vnější obal se vyskytuje zejména u řady živočišných virů. Fytoviry v naprosté většině tento obal postrádají (Burchett & Burchett 2017).

3.3.3 Přenos infekce u virových patogenů

Prvním krokem patogeneze rostlin virovou chorobou je samotný vstup viru do hostitelské rostliny. Rostlinné viry se musely přizpůsobit svým životním cyklem i stavbou virové částice specifické stavbě rostlin a jejich rostlinné buňce. Na rozdíl od živočišných virů musí rostlinné viry překonat kutikulu a buněčnou stěnu pro svůj vstup přes cytoplazmatickou membránu do hostitelské buňky. Je zde uplatňován pasivní přenos, kdy je rostlina infikována z okolního prostředí díky mechanickému poškození. Mechanické poškození však nesmí být příliš velké, protože by okolní buňky odumřely, což by mohlo zabránit infekci virového patogenu. Mechanické poškození může být způsobeno mrazem, silným větrem, deštěm, sestřihem nebo prořezáváním při zahrádkářských úpravách (Navrátil 2011).

K samotnému přenosu virové částice na poškozenou rostlinu dochází za pomoci větru, vody nebo činnosti člověka. Nejběžněji je však přenos uskutečňován hmyzími vektory, kdy vektor zajistí jak prostorový přenos na novou hostitelskou rostlinu, tak její mechanické poškození, které umožní virové částici proniknutí do rostliny. Nejčastěji tento typ přenosu zajišťuje hmyz s bodavě sacím ústním ústrojím, kam patří mšice, křísi, molice, červci, třásněnky a některé druhy ploštic. Méně běžný je přenos virů hmyzem s kousacím ústním ústrojím, který probíhá u některých druhů brouků. Vektory virů také mohou být někteří roztoči, prvoci, houby a v půdě žijící hádátka. Přenos viru pomocí vektorů může být uskutečněn třemi způsoby tzv. perzistentním, neperzistentním nebo semiperzistentním způsobem (Rosypal *et al.* 2002).

Při neperzistentním přenosu jsou virové částice zachyceny v ústním ústrojí vektoru. K uchycení virové částice na stěnu ústního ústrojí pomáhá viru jeho obal, který interaguje přímo s vazebnými místy v částech úst vektoru. Hovoříme pak o kapsidové strategii viru. Zatímco u pomocné strategie jsou vyžadovány k zachycení na stěnách ústního ústrojí další nestrukturální proteiny tzv. helper component (Froissart *et al.* 2002). Vektoru stačí k získání viru z infekční rostliny jen krátká doba sání, zpravidla desítky sekund. Virus je pak prakticky přenosný jen po dobu jednoho nebo dvou dalších sání (Navrátil 2011).

Při semiperzistentním přenosu je zapotřebí delší sání vektoru z infekční rostliny, ale přenos na neinfikovanou rostlinu probíhá ihned, jelikož virus neprochází latentní periodou. Doba infekčnosti vektoru je delší, maximálně však do jeho svlékání (Rosypal *et al.* 2002).

Při perzistentním přenosu je zapotřebí dlouhá doba saní z infikované rostliny. Virová částice se musí dostat až do trávicího traktu mšice, odkud proniká do slinných žláz. Důsledkem je také dlouhá inkubační doba, po jejímž uplynutí se stává vektor infekční do konce svého života, dokonce i po proběhnutí svlékání. Infekci pak uvolňuje při každém dalším kontaktu ústního ústrojí s rostlinou (Navrátil 2011). Speciálním případem perzistentního přenosu jsou viry, které jsou schopné se ve vektoru pomnožit. Hovoříme pak o perzistentně-propagativním přenosu. Pokud je ve vektoru virus schopný se pomnožit a zároveň se předat na potomstvo přes vajíčka, jedná se o přenos perzistentně-transovariální (Rosypal *et al.* 2002).

3.3.4 Rozvoj virové infekce

Po proniknutí primární viru do cytoplazmy rostlinné buňky dochází k rozpoznání hostitelské buňky virovou částicí pomocí specifických receptorů, které jsou součástí kapsidové schránky. Poté dochází k dekapsidaci virové částice a uvolnění nukleové kyseliny viru do cytoplazmy (Knipe *et al.* 2007).

K vlastní reprodukci virionů je zapotřebí syntéza viru-specifických makromolekul, nukleových kyselin a kapsidového proteinu. Syntéza nukleových kyselin je katalyzována jak virovými enzymy, tak enzymy původem z hostitelské buňky. Strategie replikace a transkripce virového genomu je typická pro jednotlivé skupiny virů, podle typu nukleové kyseliny, která kóduje jejich genetickou informaci (Rosypal *et al.* 2002). U pozitivní ssRNA, která se nejčastěji vyskytuje u rostlinných virů, je podle Navrátila (2011) virová RNA přímo využita jako mRNA a je překládána do řetězců aminokyselin na buněčných ribozomech bezprostředně po průniku do buňky. Primárním translačním produktem je polyprotein, který se štěpí na jednotlivé funkční a strukturní proteiny. Štěpení polyproteinu je zahájeno již během translace a je zprostředkováno autokatalytickou aktivitou virem kódované proteázy. Replikace zdrojového genomu pak probíhá přes dsRNA formu, která slouží k syntéze mnoha kopií virového genomu. Tento proces je zprostředkován po infekci buňky syntetizovanou virovou RNA polymerázou

Ve chvíli, kdy je v infikované buňce syntetizováno dostatečné množství virových nukleových kyselin a proteinů, je zahájeno skládání virové částice. Samotné skládání pokračuje v buňce tak dlouho, dokud je buňka metabolicky aktivní (Hull 2001).

V iniciační fázi infekce se virus po pomnožení šíří z místa infekce do okolních pletiv. K šíření mezi sousedními buňkami využívá plazmodezmatické propojení sousedních buněk. Pro toto šíření replikuje pouze nukleovou kyselinu a syntetizuje speciální transportní protein, který pomáhá nukleové kyselině projít mnohem menšími plazmodezmaty, pomocí jejich modifikace. Tento způsob šíření je velice pomalý, proto se jím viry v rostlině mohou šířit jen na krátkou vzdálenost. V následné akutní fázi je virus rychle reprodukován a šířen po celé rostlině. K šíření virové infekce na delší vzdálenosti je nutné, aby se virus dostal do cévních

svazků rostliny a společně s produkty fotosyntézy dále do dalších částí rostliny. Infekce se nejprve šíří do míst intenzivního růstu, kam rostlina stahuje organické látky. Jedná se o tzv. „sink“ zpravidla o místa kolem vzrostlého vrcholu stonku a kořene. K šíření viru poté dochází i do ostatních částí rostliny. Hovoříme pak o systémové infekci. Fáze akutní je vystřídána fází chronickou, která může být doprovázena zmírněním příznaků napadení a snížením koncentrace virových částic v pletivech rostliny. V dalším vývoji často dochází k periodickému střídání fází akutních, s fázemi chronickými až do smrti rostliny (Rosypal *et al.* 2002).

3.3.5 Příznaky virových chorob na rostlinách

O závažnosti projevu infekce rozhoduje jak genetická výbava patogenu, určující jeho agresivitu, tak genetická výbava hostitele a jeho citlivost vůči virovému patogenu. Pokud je rostlina imunní, není hostitelem daného viru. Při proniknutí do rostliny virový patogen není schopný se množit. Rezistentní rostlina je sice hostitelem viru, ale infekci se na různých úrovních brání. V případě infekce se na pletivech rostliny vyskytuje virus pouze v nízkých koncentracích. Opakem rezistentních rostlin jsou rostliny náchylné. V tomto případě se infikovaná rostlina nebrání infekci. Důsledkem je vysoká koncentrace virových částic v pletivech rostliny. U tolerantních rostlin se virus v rostlině množí, ale rostlina vykáže jen slabé nebo vůbec žádné příznaky. V případě nákazy rostliny virem dochází k menším ekonomickým škodám. Opakem tolerantních rostlin jsou rostliny citlivé, které při přítomnosti viru vykazují silné, až destruktivní příznaky (Rosypal *et al.* 2002).

Během virové infekce dochází nejprve k metabolickým změnám u infikovaných buněk. U infikované buňky navzdory vhodným podmínkám, dochází k snížení fotosyntetické aktivity, zvyšuje se buněčné dýchání, dochází k opožděné translokaci škrobu z infikovaných pletiv. V buňce dochází k produkci virových nukleoproteinů. Dále se zrychluje stárnutí buňky a snižují se koncentrace auxinů a giberelinů. Naopak jsou zvyšovány koncentrace kyseliny abcisové a ethylenu. Metabolické změny se nemusí na rostlině projevit viditelnými symptomy. Hovoříme pak o latentní infekci (Navrátil 2011).

Mezi nejčastější a nejlépe rozpoznatelné příznaky virových chorob patří barevné změny na listech. Ty mohou mít mozaikový charakter nebo se může jednat o difuzně chlorotické skvrny. Může docházet ke žloutnutí žilek, proužkovitosti, čárkovitosti, chloróze celého listu či pouze okrajových částí, kroužkovitosti, tečkovitosti, antokyanizaci a bronzovitosti. Na rostlině se také mohou vyskytovat nekrotické léze. Mezi další příznaky patří deformace listů, květních obalů a plodů. Může docházet k tzv. svinutce, kadeřavosti, drobnolistosti a nitkovitosti. Dále se na listech se mohou vyskytovat rýhy a prolákliny. U napadených rostlin se také může vyskytovat zakrslost, kdy rostliny dosahují menšího vzrůstu než zdraví jedinci. Extrémní formou zakrslosti je tzv. nanismus (Hull 2001).

3.3.6 Obrana rostliny proti virům

Rostliny se brání proti virům především pasivně. Jejich obranný mechanismus tkví především v přítomnosti kutikuly, voskem pokryté buněčné stěny, či jinými úpravami pokožky, které pomáhají zabránit vniknutí patogenu do rostliny.

Mají také k dispozici mechanismy, kterými rostlina reaguje na infekci patogenem. Je známa celá řada proteinů a enzymů, které se objevují v buňkách po infekci virem např. peroxidázy, polyfenoloxidázy a ribonukleázy (Navrátil 2011). Pokud se v rostlině vyskytnou specifické geny rezistence, dokáže se bránit virové infekci pomocí tzv. hypersenzitivní reakce. Dochází při ní k odumření místního pletiva nakaženého virem. Za destrukci pletiv jsou zodpovědné kyselé proteiny, označené jako „pathogenesis related proteins“ (PR proteiny), jež se při nákaze shromažďují v mezibuněčných prostorech a zajišťují destrukci pletiv. Patří mezi ně glukonáza, chitináza či peroxidáza (Rosypal *et al.* 2002).

3.3.7 Klasifikace virů

Viry představují velice heterogenní skupinu, jejich klasifikace je daleko složitější, než u buněčných organismů. Existence velkého počtu virových druhů schopných infikovat všechny známé buněčné organismy, si vyžádala jejich systematické rozčlenění. O vytvoření prvního taxonomického systému se pokusil rostlinný virolog F. O. Holmes. Jeho tzv. Holmesova klasifikace z roku 1948 rozdělovala viry podle hostitelských organismů na takzvané fágy, např. bakteriofágy (napadající bakterie), fytofágy (napadající rostliny), cyanofágy (napadající sinice) a zoofágy (napadající živočichy). V roce 1962 následovala tzv. LTH klasifikace pojmenována podle svých třech zakladatelů André Lwoff, R. W. Horne a P. Tournier. V tomto systému se začaly viry rozdělovat podle společně sdílených strukturních, fyzikálních a chemických vlastností. O zařazení viru rozhodovalo 5 hlavních kritérií, zahrnujících druh nukleové kyseliny genomu (DNA, RNA), symetrie kapsidy (šroubovice, dvacetistěn, složitý tvar), přítomnost či nepřítomnost virového obalu, počet kapsomer, rozměry virionu a kapsidy (Hull 2001).

Snaha vytvořit taxonomický systém virů, který by se blížil co nejvíce jejich fylogenetické příbuznosti, vyústila roku 1966 v Moskvě k zřízení Mezinárodní komise pro nomenklaturu virů, později v roce 1974 přejmenovanou na Mezinárodní výbor pro taxonomii virů (International Committee on Taxonomy of Viruses = ICTV) (Regenmortel & Mahy 2008). ICTV klasifikuje jednotlivé druhy virů do říší, kmenů (případně i podkmenů), tříd, řádů (podřádů), čeledí (podčeledí) a rodů (podrodů), pravidelně vypracovává zprávy upravující zmíněnou nomenklaturu na základě nových poznatků (Hull 2001).

V roce 1971 byla také navržena D. Baltimorem zjednodušená klasifikace virů podle typu jejich genetické informace. Viry jsou zde rozděleny do sedmi skupin (dsDNA viry, ssDNA viry, dsRNA viry, ssRNA viry s pozitivní polaritou, ssRNA viry s negativní polaritou, ssRNA viry s reverzní transkriptázou, dsDNA viry s reverzní transkriptázou). Jedná se o běžně používanou alternativu k systému ICTV (Knipe *et al.* 2007).

3.4 Virové choroby cukrové řepy

3.4.1 Virus žloutenky řepy (beet yellows virus, BYV)

Realm: *Riboviria*, Říše: *Orthornavirae*, Kmen: *Kitrinoviricota*, Třída: *Alsuviricetes*, Řád: *Martellivirales*, Čeleď: *Closteroviridae*, Rod: *Closterovirus*, Druh: virus žloutenky řepy (ICTV 2021).

3.4.1.1 Popis virové částice

Virus žloutenky řepy řadíme do čeledi *Closteroviridae*, rodu *Closterovirus*. Částice BYV mají kapsidu se spirální symetrií. Celkový průměr virionu je asi 12 nm a dosahuje délky 1300 nm (Dolja *et al.* 2003).

Genom BYV se skládá z pozitivní ssRNA a obsahuje 15480 nukleotidů (Agranovsky *et al.* 2006).

3.4.1.2 Rozšíření

Virové žloutnutí cukrové řepy bylo popisováno již v meziválečném období celou řadou autorů (Roland 1936, Van Schreven 1936). Není však jasné, jaký patogen byl příčinou této choroby, zda BYV či BMVYV, jelikož se tyto viry vyskytují velmi často ve směsných infekcích a do roku 1958 nebyly rozlišovány.

Virus je v dnešní době celosvětově rozšířen, byl monitorován téměř ve všech oblastech pěstování cukrové řepy.

Choroba vyvolaná tímto virem se před zavedení účinných neonikotinoidů v 80. letech 20. století běžně vyskytovala v Rakousku, Bělorusku, Belgii, Bulharsku, České republice, Dánsku, Finsku, Francii, Německu, Maďarsku, Itálii, Lucembursku, Nizozemsku, Rumunsku, Ruské federaci, Španělsku, Švédsku, Švýcarsku, Ukrajině, Velké Británii a bývalé Jugoslávii, Japonsku v Asii a Kanadě a USA v Severní Americe (PlantwisePlus Knowledge Bank 2022).

3.4.1.3 Hostitelský okruh

U BYV byla experimentálně prokázána schopnost viru infikovat 120 druhů rostlin, pocházejících z 15 čeledí (Dolja *et al.* 2003). Jedná se zejména o druhy z čeledi merlíkovitých (*Chenopodiaceae*), laskavcovitých (*Amaranthaceae*), kosmatcovitých (*Aizoaceae*) a hvozdíkovitých (*Caryophyllaceae*) (Bittner 2018). Z hospodářsky významných plodin infikuje zejména řepu, ale také salát a špenát (Dolja *et al.* 2003).

Virus také může infikovat celou řadu plevelů, zejména z čeledi merlíkovitých (*Chenopodiaceae*), brukvovitých (*Brassicaceae*) a také hvězdicovitých (*Asteraceae*). Mezi tyto plevele patří kokoška pastuší tobolka (*Capsella bursa pastoris*), starček obecný (*Senecio vulgaris*), lebeda rozkladitá (*Atriplex patula*) a merlík bílý (*Chenopodium album*). BYV byl také dále detekován na hluchavce nachové (*Lamium purpureum*), vlčím máku (*Papaver rhoeas*), kolenci rolním (*Spergula arvensis*) a ptačinci prostředním (*Stellaria media*) (Bittner 2018).

3.4.1.4 Příznaky

První příznaky se u cukrové řepy při nákaze BYV začínají objevovat po třech až čtyřech týdnech od infekce rostliny. Mezi tyto první příznaky patří žloutnutí žilnatiny, které postupně přechází ve žloutnutí celé plochy listu od místa infekce. Příznaky napadení se mohou lišit svou intenzitou v závislosti na kmenu BYV. U silně patogenních kmenů se může vyskytnout lemování žilek, nebo hnědé až černé nekrotické skvrny. U slabě patogenních kmenů listy žloutnou obvykle od okraje a část listů kolem žilnatiny může zůstat delší dobu zelená (Bittner 2018). Napadené listy se stávají křehkými, předčasně odumírají, nebo se stávají náchylnými pro napadení padlím a houbami rodu *Alternaria*. BYV má výrazné účinky na fyziologii cukrové řepy a významně snižuje růst rostliny (Kazda 2003).

3.4.1.5 Přenos

BYV je přenášen především mšicemi. Jedná se zde výhradně o semiperzistentní přenos. Na přenosu se může podílet až 22 druhů mšic. Nejčastějším vektorem BYV je mšice maková (*Aphis fabae*) a mšice broskvoňová (*Myzus persicae*), vektorem viru dále může být i mšice česneková (*Myzus ascalonicus*), kyjatka zahradní (*Macrosiphum euphorbiae*) a *Myzus certus*.

Mechanický přenos viru byl s obtížemi prokázán pouze v laboratorních podmínkách (Bittner 2018).

Přenos semeny a pylem nebyl nikdy prokázán (Adams & Antoniw 2005).

3.4.1.6 Ochrana

Intenzita výskytu BYV závisí na početnosti zdrojů infekce a dále na intenzitě a časnosti náletu mšic. Jako preventivní ochranné opatření se doporučuje likvidace zdrojů primární infekce, z kterých se virus šíří v jarním období do porostů řepy. Jedná se zejména o hostitelské druhy plevelů, plevelnou řepu či regenerující rostliny řepy zaplevelující následnou plodinu. Jako zdrojem primární infekce také mohou být semenné porosty řepy (PlantwisePlus Knowledge Bank 2022).

Z hlediska fytosanitárního je doporučováno provedení hluboké orby po sklizni řepy s důsledným zaklopením jejich posklizňových zbytků (Bittner 2018). V rámci agrotechnických ochranných opatření se doporučuje včasný výsev plodiny tak, aby bylo docíleno rychlého vývoje rostlin, aby první nálet mšic zasáhl co nejstarší, a pro mšice méně atraktivní rostliny. Starší rostliny jsou zároveň daleko odolnější a lépe snáší případnou nákazu (Kazda 2003).

Vzhledem k semiperzistentnímu přenosu viru má přímá ochrana insekticidy, za účelem zabránění přenosu viru do porostu, nižší význam. Regulace populací mšic však má své opodstatnění, snižuje pravděpodobnost šíření viru v porostu (Lennefors 2021).

3.4.1.7 Význam

Ztráty způsobené BYV jsou velice variabilní. Závisí zejména na odolnosti dané odrůdy a časnosti infekce rostliny. Smith & Hallsworth (1990) uvádějí, že BYV ve fázi 4-6 listů na začátku června snížila výnos cukru o 22 %, ve fázi 18-20 listů v polovině konce července infekce snížila výnos cukru o 9 % a infekce v srpnu již neovlivnila výnos cukrové řepy.

V ČR byly v posledních třech desetiletích škody způsobené BYV ojedinělé, a to zejména díky využívání insekticidního moření semen cukrové řepy na bázi neonikotinoidů. Nicméně díky zákazu využívání neonikotinoidů se očekává, že se tato situace rapidně zhorší (Chochola 2021).

3.4.2 Virus mírného žloutnutí řepy (beet mild yellowing virus, BMYV)

Realm: *Riboviria*, Říše: *Orthornavirae*, Kmen: *Pisuviricota*, Třída: *Pisoniviricetes*, Řád: *Sobelivirales*, Čeleď: *Solemoviridae*, Rod: *Polerovirus*, Druh: virus mírného žloutnutí řepy (ICTV 2021).

3.4.2.1 Popis virové částice

Virus mírného žloutnutí řepy řadíme do čeledi *Solemoviridae*. Dále je řazen do rodu *Polerovirus*. Kapsida viru má šestiúhelníkový obrys a skládá se z 180 podjednotek uspořádaných v T = 3 ikosahedrál ní symetrii (ICTV 2021).

Genom BMYV je tvořen jednou molekulou ssRNA s pozitivní polaritou a obsahuje 5722 nukleotidů (Guilley *et al.* 2018).

3.4.2.2 Rozšíření

Viz. kapitola 3.4.1.2 (Rozšíření BYV) BMYV se vyskytuje často ve směsných infekcích s BYV, oba viry mají stejnou historii a podobný areál rozšíření.

3.4.2.3 Hostitelský okruh

U BMYV byla experimentálně prokázána schopnost viru infikovat 100 druhů rostlin pocházejících z 21 čeledí. Z hospodářsky významných plodin napadá zejména řepu, ale také ředkvičky (*Raphanus sativus*), cizrnu beraní (*Cicer arietnum*), čočku (*Lens culinaris*) špenát (*Spinacia oleracea*), hrách setý (*Pisum sativum*) a bob obecný (*Vicia faba*) (Adams & Antoniw 2005).

Hostitelem BMYV je také celá řada plevelů zejména z čeledi merlíkovitých (*Chenopodiaceae*), brukvovitých (*Brassicaceae*) a také hvězdicovitých (*Asteraceae*). Mezi tyto plevele patří kokoška pastuší tobolka (*Capsella bursa pastoris*) a starček obecný (*Senecio vulgaris*). BMYV byl také dále zaznamenán na hluchavce nachové (*Lamium purpureum*), vlčím máku (*Papaver rhoeas*), kolenci rolním (*Spergula arvensis*) a ptačinci prostředním (*Stellaria media*) (Bittner 2018).

3.4.2.4 Příznaky

Infikované rostliny BMVYV vykazují charakteristické difuzní chlorotické skvrny na plně vyvinutých listech, které se objevují 3–5 týdnů po infekci. Tyto skvrny se vyskytují na plochách mezi listovou žilnatinou a postupně se rozšiřují a spojují v chlorózu celé plochy listu. Na starších listech se objevuje oranžovo-červené zbarvení (Bittner 2018). Napadené listy se stávají křehkými a jsou náchylné pro napadení padlím a houbami rodu *Alternaria*, jež má za následek rozsáhlé nekrózy na listech. BMVYV má také výrazné účinky na fyziologii cukrové řepy a významně snižuje růst rostliny a redukuje kořenový systém (Kazda 2003).

3.4.2.5 Přenos viru

BMVYV je přenášen především mšicemi. Jedná se zde výhradně o perzistentní přenos viru. Na přenosu se může podílet 8 druhů mšic. Nejčastějším vektorem BMVYV je mšice broskvoňová (*Myzus persicae*). Při delším sání může BMVYV přenášet také mšice maková (*Aphis fabae*) a kyjatka zahradní (*Macrosiphum euphorbiae*) (Adams & Antoniw 2005).

BMVYV není přenosný mechanicky, semeny ani pylem. Také experimentální přenos pomocí kokotice nebyl prokázán (Adams & Antoniw 2005).

3.4.2.6 Ochrana

Preventivní ochranná opatření jsou stejného charakteru jako u BYV kapiola 3.4.1.6, tedy likvidace zdrojů primární infekce, včasný výsev plodin a důkladné zapravení posklizňových zbytků po ukončení sklizně.

Přímá ochrana insekticidy za cílem zabránění přenosu viru do porostu vzhledem k perzistentnímu způsobu přenosu má svůj význam. Musela by být ovšem provedena co v nejkratší době po zachycení náletu mšic do porostu (Lennefors 2021).

3.4.2.7 Význam

Ztráty způsobené BMVYV jsou velice variabilní. Závisí zejména na odolnosti dané odrůdy a časnosti infekce rostliny. Smith & Hallsworth (1990) uvádějí že BMVYV způsobuje v případě časně infekce největší ztrátu na výnose okolo 30 %.

V ČR jsou v posledních třech desetiletích škody způsobené BMVYV ojedinělé, a to zejména díky využívání insekticidního moření semen cukrové řepy na bázi neonikotinoidů. Nicméně, díky zákazu využívání neonikotinoidů se očekává, že se tato situace rapidně zhorší (Chochola 2021).

3.4.3 Virus chlorózy řepy (beet chlorosis virus, BChV)

Realm: *Riboviria*, Říše: *Orthornavirae*, Kmen: *Pisuviricota*, Třída: *Pisoniviricetes*, Řád: *Sobelivirales*, Čeleď: *Solemoviridae*, Rod: *Polerovirus*, Druh: virus mírného žloutnutí řepy (ICTV 2021).

3.4.3.1 Popis virové částice

Virus chlorózy řepy řadíme do čeledi *Solemoviridae*, dále je řazen do rodu *Polerovirus*. Kapsida viru má šestiúhelníkový obrys a skládá se ze 180 podjednotek uspořádaných v T = 3 ikosahedrální symetrii (ICTV 2021). Genetická informace BChV je tvořena jednou molekulou ssRNA s pozitivní polaritou a obsahuje 5776 nukleotidů (Hauser *et al.* 2018).

3.4.3.2 Rozšíření

BChV byl poprvé popsán v roce 1989 jak v USA, tak i ve Velké Británii. BChV byl původně považován za sérotyp viru BMVYV, protože vyvolával slabší příznaky u řepy a nereagoval s klíčovou diagnostickou monoklonální protilátkou BYDV-PAV-IL-1. V roce 2002 byl Mezinárodním výborem pro taxonomii virů (ICTV) přiřazen jako samostatný druh rodu *Polerovirus*.

Výskyt BChV byl často pozorován v Kalifornii, Coloradu, Nebrasce, Texasu, Velké Británii a Francii na polích cukrové řepy (Stevens *et al.* 2005).

Do dnešní doby nebyla přítomnost BChV v České republice zatím potvrzena.

3.4.3.3 Hostitelský okruh

BChV vykazuje výrazně užší rozsah hostitelů ve srovnání s BMVYV, např. nedokáže infikovat tradiční indikátorové druhy BMVYV zdrojovku málolistou (*Montia perfoliata*) a kokošku pastuší tobolku (*C. bursa-pastoris*). Hostitelský areál BChV zahrnuje druhy rodu *Beta*, ale také merlík hlavatý (*Chenopodium capitatum*), koniklec rolní (*Spergula arvensis*) a špenát setý (*Spinacia oleracea*) (Wetzel 2018).

3.4.3.4 Příznaky

Infikované rostliny BChV vykazují charakteristické mezižilkové chlorózy na plně vyvinutých listech. Na starších listech se objevuje oranžovo-červené zbarvení. Oproti BMVYV jsou vyvolané chlorózy listů BChV světlejšího charakteru. Na starších listech se mohou vyskytovat nekrotické skvrny spolu se žloutnutím žilek (Wetzel 2018).

3.4.3.5 Přenos viru

BChV je přenášén mšicemi. Jedná se zde výhradně o perzistentní přenos viru. Na přenosu se podílí nejčastěji mšice broskvoňová (*Myzus persicae*).

BMVYV není přenosný mechanicky, semeny ani pylem (Stevens *et al.* 2005).

3.4.3.6 Ochrana

Ochrana opatření jsou stejného charakteru jako u BMVYV kapitola 3.4.2.6.

3.4.3.7 Význam

V roce 1999 Lewellen použil kalifornský izolát BChV k inokulaci cukrové řepy, aby určil účinky viru na výnos cukrové řepy. Potenciální ztráty na výnosu cukru byly odhadnuty mezi 5-40 % v závislosti na časnosti infekce.

3.5 Virové choroby tykvovité zeleniny

3.5.1 Virus žloutnutí okurky přenášený mšicemi (cucurbit aphid-borne yellows virus, CABYV)

Realm: *Riboviria*, Říše: *Orthornavirae*, Kmen: *Pisuviricota*, Třída: *Pisoniviricetes*, Řád: *Sobelivirales*, Čeleď: *Solemoviridae*, Rod: *Polerovirus*, Druh: mšicemi přenosný virus žloutenky tykvovitých (ICTV 2021).

3.5.1.1 Popis virové částice

Mšicemi přenosný virus žloutenky tykvovitých řadíme do čeledi *Solemoviridae*. Dále je řazen do rodu *Polerovirus*. Kapsida viru má šestiúhelníkový obrys a skládá se ze 180 podjednotek uspořádaných v T = 3 ikosahedrál ní symetrii (ICTV 2021).

Genetická informace CABYV je tvořena ssRNA s pozitivní polaritou a obsahuje 5672 nukleotidů (Rabadan 2023).

3.5.1.2 Rozšíření

CABYV byl poprvé izolován v jižní Francii v roce 1988. CABYV se dlouhodobě vyskytuje ve Středomoří a v Asii. Je také přítomen v subsaharské Africe a byl také hlášen na několika místech v Americe a v Oceánii. V některých zemích je CABYV jedním z nejběžnějších virů vyskytujících se na tykvovitých plodinách, jmenovitě ve Francii, Španělsku, Tunisku, Íránu a Súdánu (Lecoq *et al.* 2022). V ostatních oblastech se CABYV vyskytuje méně frekventovaně, například v České republice, kde byl virus poprvé zaznamenán v roce 2009 na jižní Moravě (Svoboda 2011).

3.5.1.3 Hostitelský okruh

CABYV infikuje zejména druhy z čeledi tykvovitých (*Cucurbitaceae*). Z hospodářsky pěstovaných plodin infikuje zejména okurky (*Cucumis sativus*), dýně (*Cucurbita pepo*) a melouny (*Citrullus lanatus*). Virus může infikovat také hlávkový salát (*Lactuca sativa*), krmnou řepu (*Beta vulgaris var. rapacea*) a cizrnu beraní (*Cicer arietinum*). Dále pak i plevelné rostliny, které se stávají hlavními rezervoáry nákazy mšic. Patří mezi ně hluchavka objímavá (*Lamium amplexicaule*), kokoška pastuší tobolka (*Capsella bursa-pastoris*), tykvice stříkavá (*Echallium elaterium*), posed dvoudomý (*Bryonia dioica*) a merlík zední (*Chenopodium murale*) (Lecoq *et al.* 2022).

3.5.1.4 Příznaky

Mezi první příznaky patří zakrslost a zpoždění růstu rostlin. Postižené rostliny mohou být menší a slabší, než zdravé rostliny stejného věku. Dále se objevují malé chlorotické skvrny na listech, přecházejících postupně v chlorózu celého listu. Pletiva těchto listů často zesilují a

stávají se křehkými. Významné rozdíly jsou pozorovány v rámci kultivarů. U některých se objevují jen velmi mírné příznaky na několika listech, zatímco u jiných se na celé rostlině rozvíjí jasně žlutá barva. Také dochází ke snížené tvorbě květů, která má za následek snížení počtu plodů (Lecoq *et al.* 2022).

3.5.1.5 Přenos viru

CABYV je přenášen mšicemi. Jedná se zde o perzistentní způsob přenosu viru. Na přenosu se podílí nejméně tři druhy mšic, jmenovitě mšice broskvoňová (*Myzus persicae*), kyjatka zahradní (*Macrosiphum euphorbiae*) a mšice bavlníková (*Aphis gossypii*) (Lecoq *et al.* 2022).

Mechanický přenos u virů z rodu *Polerovirus* není možný (Khan & Dijkstra 2006).

Přenos semeny ani pylem nebyl dosud potvrzen. Nebyl také pozorován žádný vliv virové infekce na kvalitu osiva (Lecoq & Desbriez 2017).

3.5.1.6 Ochrana

Existuje řada možností, jak omezit šíření CABYV. Jedním z preventivních ochranných opatření může být likvidace zdrojů primární infekce, ze kterých se virus šíří v jarním období do porostů tykví. Jedná se zejména o hostitelské druhy plevelů. U CABYV byla identifikována řada hostitelských plevelných rostlin v různých klimatických prostředích, mírných, středomořských nebo subtropických. Ale pravděpodobně existuje mnoho dalších volně rostoucích hostitelů, kteří dosud nebyli identifikováni. Proto se odstranění divokých zdrojů virů nezdá být ekologicky přijatelné nebo realistické.

Mezi další preventivní ochranná opatření patří regulace mšic jako vektorů CABYV pomocí účinného insekticidního ošetření, jež může zabránit jak primární, tak sekundární infekci v porostu.

Časnou kontaminaci CABYV lze také zabránit ochranou mladých výsadeb pod sítěmi, odolnými proti průniku hmyzu nebo pod netkanými textiliemi.

Dalším účinným opatřením je používání rezistentních nebo tolerantních odrůd, které jsou dostupné u okurek, melounů a dýní (Lecoq *et al.* 2022).

3.5.1.7 Význam

Virus může způsobovat zejména významné snížení počtu plodů na rostlinu. U okurek může míra snížení počtu plodů dosahovat až 51 % oproti zdravým rostlinám a 40% snížení bylo zaznamenáno i u melounů (Lecoq *et al.* 1992).

V České republice nebyly zaznamenány významné ekonomické škody způsobené CABYV.

3.5.2 Virus mozaiky okurky (cucumber mosaic virus, CMV)

Realm: *Riboviria*, Říše: *Orthornavirae*, Kmen: *Kitrinoviricota*, Třída: *Alsuviricetes*, Řád: *Martellivirales*, Čeleď: *Bromoviridae*, Rod: *Cucumovirus* Druh: virus mozaiky okurky (ICTV 2021).

3.5.2.1 Popis virové částice

Virus mozaiky okurky řadíme do čeledi *Bromoviridae*, dále je řazen do rodu *Cucumovirus*. Viriony CMV mají izometrický tvar o průměru 29 nm. Kapsida se skládá z podjednotek uspořádaných v ikosaedrální symetrii.

Genetická informace CMV je tvořena ssRNA s pozitivní polaritou. Genom je složený ze tří molekul RNA (ICTV 2021). Molekuly RNA 1,2,3 se vyskytují samostatně ve třech samostatných virionech. Velikost genomu jednotlivých částí činí u RNA 1 3357 bp, RNA2 3044 bp a RNA3 2212 bp (Suzuki *et al.* 2011).

Na základě údajů o nukleotidové sekvenci rozdělujeme izoláty CMV do podskupin I a II. Podskupina I se dále dělí na kmeny IA a IB na základě rozdílů v patogenitě u hrachu divokého (*Vigna unguiculata*), přičemž kmeny IA indukují symptomy systémové mozaiky a IB kmeny indukují lokální nekrotické léze na inokulovaných listech (Zitter & Murphy 2009).

3.5.2.2 Rozšíření

Choroba vyvolávající mozaiku okurky byla poprvé popsána v roce 1916 Doolittlem v Michiganu a Jaggerem v New Yorku (Palukaitis *et al.* 1992).

Virus je rozšířen po celém světě. Podskupina II je omezena hlavně na chladnější oblasti, vyskytuje se především v mírném pásu. Izoláty z podskupiny I jsou naopak rozšířenější v tropických a subtropických oblastech (Regenmortel & Mahy 2010)

3.5.2.3 Hostitelský okruh

CMV má velmi široký hostitelský areál. Caciagli 2008 uvádí, že hostitelský areál CMV zahrnuje až 800 druhů rostlin, pocházejících ze 70 čeledí. Infikuje zejména druhy z čeledi tykvovitých (*Cucurbitaceae*). Z hospodářských plodin infikuje okurky (*Cucumis sativus*), dýně (*Cucurbita pepo*), melouny (*Citrullus lanatus*), papriky (*Capsicum annum*), rajčata (*Solanum lycopersicum*), celer (*Apium graveolens*) a celou řadu dalších plodin, včetně velkého množství okrasných rostlin. Dále infikuje celou řadu plevelných rostlin, které se stávají hlavními rezervoáry nákazy mšic (Agrios 2005).

3.5.2.4 Příznaky

Mezi časté příznaky CMV patří výrazný zakrslý vzrůst, který se vyskytuje zejména u rostlin infikovaných v počátečních vývojových stádiích. Na listech se často projevuje infekce tímto virem jako mozaika nebo mramorování na listech, dále také jako nekrotické skvrny

kruhového tvaru. Mladé listy bývají často zakrnělé a vyskytuje se u nich také kadeření listové čepele. U listů se může také vyskytnout v extrémních případech tzv. nitkovitost. Plody infikovaných rostlin bývají často menší velikosti, mohou se také vyskytovat tmavě zelené skvrny nebo nekrotické léze (Kazda 2003)

3.5.2.5 Přenos viru

CMV je přenášen především mšicemi neperzistentním způsobem. Na přenosu se podílí nejméně 80 druhů mšic. Nejvýznamnějšími přenašeči jsou mšice broskvoňová (*Myzus persicae*) a mšice bavlníková (*Aphis gossypii*). Přenos pomocí osiva byl hlášen u cizrny a u 19 dalších rostlin z čeledí *Amaranthaceae* a *Fabaceae*. V laboratorních podmínkách se také u CMV může využívat mechanického přenosu. Částice viru však nejsou stabilní ve vnějším prostředí, kde jsou schopné přežít jen velmi krátkou dobu. Pro experimentální mechanický přenos je nutné využití pufru, který zajistí v infekční rostlinné šťávě stabilní pH (Zitter & Murphy 2009).

3.5.2.6 Ochrana

Existuje řada možností, jak omezit výnosové ztráty způsobené CMV. Jedním z účinných způsobů je využívání rezistentních nebo tolerantních odrůd (Zitter & Murphy 2009).

Jedním z preventivních ochranných opatření může být eradikace hostitelských plevelných rostlin, ze kterých ve virus šíří v jarním období do porostů hostitelských plodin. Tento krok je často obtížným úkolem kvůli rozsáhlému počtu hostitelů u CMV. Odstranění několika klíčových trvalých nebo dvouletých plevelů nacházejících se v blízkosti plodiny však může snížit silný tlak a přispět tak ke kontrole CMV (Agrios 2005).

Mezi další preventivní ochranná opatření patří regulace mšic jako vektorů CMV pomocí účinného insekticidního ošetření. Ani včasným ošetřením insekticidy však u neperzistentního druhu přenosu nedokážeme zabránit infekci rostlin. Ke ztrátě infekčnosti vektorů může přispět výsev pásu vysoké plodiny kolem pozemku, která zároveň není hostitelskou rostlinou viru a má rychlejší počáteční vývoj. Časná nákaza CMV lze také zabránit ochranou mladých výsadeb pod sítěmi odolnými proti průniku hmyzu nebo netkanými textiliemi (Zitter & Murphy 2009).

3.5.2.7 Význam

Ekonomické ztráty jsou nejvyšší u zeleniny a okrasných rostlin pěstovaných v polních podmínkách, krmných luštěnin a banánů (Regenmortel & Mahy 2010). Průměrné ztráty při nákaze CMV u tykvovité zeleniny se běžně pohybují okolo 10-20 %. V některých případech mohou být plody sklizeny, ale mají horší kvalitu a vzhled (Zitter & Murphy 2009).

3.5.3 Virus mozaiky tykve (squash mosaic virus, SqMV)

Realm: *Riboviria*, Říše: *Orthornavirae*, Kmen: *Pisuviricota*, Třída: *Pisoniviricetes*, Řád: *Picornavirales*, Čeleď: *Secoviridae*, Podčeleď: *Comovirinae*, Rod: *Comovirus*, Druh: mšicemi přenosný virus žloutenky tykvovitých (ICTV 2021).

3.5.3.1 Popis virové částice

Virus mozaiky tykve řadíme do podčeledi *Comovirinae*, dále je řazen do rodu *Comovirus*. Viriony mají kulovitý tvar o průměru 28 nm. Kapsida se skládá z podjednotek uspořádaných v $T = 3$ ikosaedrální symetrii. Genetická informace SqMV je tvořena ssRNA s pozitivní polaritou. Genom viru je bipartitního charakteru. Obě RNA jsou zapouzdřeny v oddělených virionech. Vyskytují se i prázdné virové částice, neobsahující genetickou informaci (ICTV 2021). Velikost genomu jednotlivých částí činí u RNA1 5858 bp, RNA2 3370 bp (Li *et al.* 2015).

3.5.3.2 Rozšíření

První zmínka o SqMV je přisuzována v roce 1934 J. B. Kendrickovi. SqMV je široce rozšířen na západní polokouli, ale je také hlášen ve Středomoří, Austrálii a Blízkém východě. Zřejmě je celosvětově rozšířen ve všech hlavních oblastech pěstování druhů z čeledi tykvovitých (*Cucurbitaceae*) (Nelson & Knuhtsen 1977).

V České republice byl virus poprvé zaznamenán v roce 2010 v okolí obce Tasovice v okrese Znojmo (Svoboda & Leisova-Svobodova 2011).

3.5.3.3 Hostitelský okruh

Přirozený okruh hostitelů je omezen zejména druhy z čeledi tykvovitých (*Cucurbitaceae*). Experimentálně také dokáže infikovat některé druhy rostlin z čeledi laskavcovitých (*Amaranthaceae*), merlíkovitých (*Chenopodiaceae*), lepicovitých (*Hydrophyllaceae*), bobovitých (*Fabaceae*) a miříkovitých (*Apiaceae*). Z hospodářsky plodin infikuje zejména okurky, dýně a melouny (Haudenshield & Palukaitis 1998).

3.5.3.4 Příznaky

Mezi časté příznaky na listech patří tmavě zelené mozaiky, chlorotické skvrny, tvorba puchýřů a listové deformace. Mladé listy často vykazují nejzávažnější příznaky a dosahují mnohem menších velikostí než listy zdravých rostlin.

Symptomy také vykazují plody infikovaných rostlin. Příznaky zahrnují od malých chlorotických oblastí až po těžká deformace s vyvýšenými tmavě zelenými plochami (Agrios 2005).

3.5.3.5 Přenos viru

Vektorem viru jsou býložraví brouci. Brouci získávají virus žírem na infikované rostlině, latentní doba je kratší než 10 hodin. Infikovaný vektor může virus přenášet po dobu dalších dvaceti dnů (Adams & Antoniw 2005).

Virus je také přenášen semeny. Přenos byl zaznamenán u dýní (*Cucurbita moschata*, *C. pepo*, *C. maxima*, *C. mixta*) a melounu cukrového (*Cucumis melo*) (Nelson & Knuhtsen 1977).

Mechanický přenos je u SqMV také častý. A to zejména díky dlouhé životnosti virových částic v rostliné šťávě nacházející se mimo rostlinu, kde dokáží přežít virové částice schopné infikovat novou rostlinu až čtyři dny (Adams & Antoniw 2005).

3.5.3.6 Ochrana

Existuje řada preventivních opatření, jak omezit výnosové ztráty způsobené SqMV. Základním ochranným opatřením je používání viruprostého osiva a sadby a dále využívání rezistentních nebo tolerantních odrůd. Určitá tolerance k viru byla hlášena u některých druhů *Cucurbita* spp.

Dalším z preventivních ochranných opatření je hubení hostitelských plevelných rostlin, které se mohou stát zdrojem nákazy vektorů. Dále se doporučuje likvidace jedinců v porostu, kteří nesou jasné příznaky nákazy virem.

Důležitá je také kontrola populace brouků pomocí insekticidních přípravků (Agrios 2005).

3.5.3.7 Význam

Hlavní ekonomické škody jsou ve výskytu nestandardních plodů u nakažených rostlin, které jsou postiženy deformacemi nebo nestandardním vybarvením. Takto postižené plody jsou dále komerčně neprodejné (Agrios 2005).

3.5.4 Virus žluté mozaiky cukety (zucchini yellow mosaic virus, ZYMV)

Realm: *Riboviria*, Říše: *Orthornavirae*, Kmen: *Pisuviricota*, Třída: *Stelpaviricetes*, Řád: *Patatavirales*, Čeleď: *Potyviridae*, Rod: *Potyvirus*, Druh: virus žluté mozaiky cukety (ICTV 2021).

3.5.4.1 Popis virové částice

Virus žluté mozaiky cukety řadíme do čeledi *Potyviridae*, dále je řazen do rodu *Potyvirus*. Částice potyvirů jsou pružná 720 nm až 770 nm dlouhá a 11 nm až 13 nm široká vlákna s kapsidou helikální symetrie (ICTV 2021). Genom ZYMV se skládá z pozitivní ssRNA a obsahuje 9591 nukleotidů (Lin *et al.* 2001).

3.5.4.2 Rozšíření

ZYMV byl poprvé izolován v Itálii v roce 1973 a během dalších dvaceti let zaznamenán na všech světových kontinentech kromě Antarktidy (Desbiez & Lecoq 1997).

V bývalém Československu byla přítomnost ZYMV poprvé hlášena v roce 1990 na jižní Moravě (Svoboda & Polák 2007). Dále Svoboda & Polák (2007) uvádí, že až do roku 1997 byl výskyt ZYMV v České republice omezený na jihomoravské okresy Břeclav a Znojmo. V roce 2001 byl již výskyt ZYMV prokázán ve čtyřech okresech jižní Moravy: Břeclav, Znojmo, Brno a Hodonín.

3.5.4.3 Hostitelský okruh

ZYMV infikuje zejména druhy z čeledi tykvovitých (*Cucurbitaceae*). Z hospodářských plodin infikuje zejména okurky, cukety, dýně a melouny. Virus byl experimentálně přenesený i na druhy rostlin z čeledi kosmatcovitých (*Aizoaceae*), laskavcovitých (*Amaranthaceae*), hvězdicovitých (*Asteraceae*), hluchavkovitých (*Lamiaceae*), bobovitých (*Fabaceae*), pryskyřníkovitých (*Ranunculaceae*), krtičníkovitých (*Scrophulariaceae*) a lilkovitých (*Solanaceae*) (Desbiez & Lecoq 1997).

3.5.4.4 Příznaky

ZYMV způsobuje výrazné žloutnutí listů, které má mozaikovitý charakter. Objevují se na nich také puchýře a mívají často deformovaný tvar. Symptomy také vykazují plody, které mohou být zakrnělé, dochází k jejich barevným změnám a silným deformacím. Mohou se také vyskytovat deformace semen (INRAE 2021).

3.5.4.5 Přenos viru

ZYMV je přenášen především mšicemi, jedná se zde o neperzistentní způsob přenosu viru. Na přenosu se podílí kolem 38 druhů mšic. Nejvýznamnějšími přenašeči jsou mšice

broskvoňová (*Myzus persicae*), mšice bavlníková (*Aphis gossypii*) a kyjatka zahradní (*Macrosiphum euphorbiae*).

U ZYMV je také možnost šíření v porostu pomocí mechanického přenosu, který probíhá prostřednictvím pracovních nástrojů při sklizni plodů nebo pomocí poškození způsobující mechanizace vztupující do porostu v průběhu vegetace. (Gal-on 2007).

Přenos semen je také možný, je však ojedinělý (Müller *et al.* 2006).

3.5.4.6 Ochrana

Mezi neúčinnější ochranná opatření proti ZYMV patří využívání křížové ochrany, kdy jsou rostliny záměrně nakaženy slabě virulentním kmenem ZYMV (Svoboda & Polák 2007).

Dále je možné využití rezistentních nebo tolerantních odrůd, spojeného spolu se souborem preventivních opatření, která jsou stejného charakteru jako u CMV (Gal-on 2007).

3.5.4.7 Význam

ZYMV je jedním z ekonomicky nejdůležitějších virů tykvovitých plodin. Může způsobovat velké ztráty, které mohou dosahovat až 95 % z výnosu (Gal-on 2007).

3.5.5 Virus mozaiky vodního melounu (watermelon mosaic virus, WMV)

Realm: *Riboviria*, Říše: *Orthornavirae*, Kmen: *Pisuviricota*, Třída: *Stelpaviricetes*, Řád: *Patatavirales*, Čeleď: *Potyviridae*, Rod: *Potyvirus*, Druh: virus mozaiky vodního melounu (ICTV 2021).

3.5.5.1 Popis virové částice

Virus mozaiky vodního melounu řadíme do čeledi *Potyviridae*, dále je řazen do rodu *Potyvirus*. Částice viru mají kapsidu s helikální symetrií (ICTV 2021).

Genom WMV se skládá z pozitivní ssRNA a obsahuje 10035 nukleotidů (Desbiez & Lecoq 2004).

3.5.5.2 Rozšíření

WMV byl poprvé zaznamenán ve Francii v roce 1974 a nyní je celosvětově nejrozšířenějším virem tykvovitých plodin (Lecoq *et al.* 2011). Podle výsledků testování tykvovité zeleniny, které uvádí Svoboda (2011), se WMV v České republice v roce 2009 vyskytoval pouze na jižní a střední Moravě.

3.5.5.3 Hostitelský okruh

Bylo prokázáno, že WMV experimentálně infikuje více než 170 druhů rostlin patřících do 27 čeledí rostlin. WMV byl rozdělen do dvou skupin lišící se svým hostitelským rozsahem.

WMV-1 dokáže infikovat pouze hostitelské druhy z čeledi tykvovitých (*Cucurbitaceae*), zatímco WMV-2 infikuje kromě této čeledi i čeleď merlíkovitých (*Chenopodiaceae*), bobovitých (*Fabaceae*) a slézovitých (*Malvaceae*) (Webb & Scott 1965).

3.5.5.4 Příznaky

Mezi první příznaky WMV patří slabé žloutnutí na krajích listů. Často dochází i ke žloutnutí žilnatin a nepravidelnému žloutnutí prostoru mezi žilnatinou, což dodává listu charakteristický mozaikový vzhled. U mladých listů se objevují deformace, dosahující menší velikostí, než listy zdravých rostliny a může docházet k tvorbě nekrotických lokálních lézí.

Plody dorůstají menších rozměrů. Obvykle se na plodech objevují skvrnitosti a mohou se na nich vytvářet i puchýře. Takto napadené plody bývají často neprodejně (Agrios 2005).

3.5.5.5 Přenos viru

WMV je přenášen především mšicem. Jedná se zde o neperzistentní způsob přenosu viru. Na přenosu se podílí kolem 38 druhů mšic. Nejvýznamnějšími přenašeči jsou mšice bavlníková (*Aphis gossypii*), mšice broskvoňová (*Myzus persicae*), *Aphis citricola*, mšice vojtešková (*Aphis craccivora*), kyjatka zemáková (*Aulacorthum solani*) a kyjatka zahradní (*Macrosiphum euphorbiae*) (Castle *et al.* 1992).

Přenos semen je také možný. Může být jedním z důležitých způsobů šíření viru (Laneyová 2012).

3.5.5.6 Ochrana

Při ochraně plodin proti WMV je možné využití rezistentních odrůd, společně se souborem preventivních opatření, která jsou stejného charakteru jako v kapitole 3.5.2.6.

Insekticidní regulace mšic jako vektorů viru má jen malý význam, vzhledem k neperzistentnímu způsobu přenosu (Kazda 2003)

3.5.5.7 Význam

WMV je jedním z ekonomicky nejdůležitějších virů tykvovitých plodin. Alonso-Prados *et al.* (1997) uvádí 30% snížení objemu produkce v důsledku časně infekce WMV na melounu.

Dále také může způsobovat významné ztráty spočívající ve výskytu nestandardních plodů.

3.6 Způsoby detekce virů u rostlin

Přesná diagnostika virových patogenů nám poskytuje důležité informace o šíření virového patogenu a je nezbytným předpokladem jeho účinné kontroly. Do dnešní doby byla vyvinuta celá řada metod umožňujících určit virové patogeny (Jarošová & Kumar 2018).

3.6.1 Symptomatické metody

Virové infekce často způsobují více či méně patrné změny vzhledu rostliny (zpomalení růstu, žloutnutí, mozaiku, nekrózy či deformace). Na základě těchto typických symptomů, které virus způsobuje na hostitelské rostlině, je obvykle vybírán i název viru samotného.

Symptomatická metoda detekce se snaží identifikovat konkrétní virus podle symptomů specifických pro daný virus. V praxi se však jednotlivé symptomy mohou lišit svou formou, intenzitou nebo se nemusí na napadené rostlině vůbec vyskytovat. Forma projevu symptomů je závislá na celé řadě faktorů, zejména na kmenu viru, na odolnosti odrůdy hostitelské rostliny a na podmínkách prostředí, ve kterém se rostlina vyskytuje. Z toho důvodu symptomatologie nemůže obvykle sloužit jako jediný a spolehlivý způsob identifikace virové infekce, nicméně může být použita jako užitečné vodítko (Astier *et al.* 2001).

3.6.2 Biologické metody

Každý virus má svůj specifický rozsah hostitelských rostlin. Toho využívá metoda detekce virů za pomoci takzvaných indikátorových rostlin, kdy je potenciální virus z nakažené rostliny experimentálně přenesen na indikátorovou rostlinu, která je na daný virus citlivá a při jeho přítomnosti se objeví specifické symptomy charakterizující daný virus.

Velkou nevýhodou těchto metod je fakt, že jsou časově náročné (doba od inokulace do objevení zřetelných symptomů se může pohybovat od několika týdnů až po několik měsíců). Je zde také neustálá potřeba produkce viruprostých indikátorových rostlin. Výsledné symptomy také nejsou vždy jednoznačně vyhodnotitelné, což může být často zapříčiněno směsnými infekcemi (Astier *et al.* 2001).

3.6.3 Fyzikální metody

3.6.3.1 Elektronová mikroskopie

Objevení elektronového mikroskopu nám přineslo možnost přímého pozorování virionu v suspenzi extrahované z infikovaných rostlin. Díky tomu můžeme na základě tvaru a velikosti virionu identifikovat daný virus. Tato kritéria však nejsou efektivní v případě rozlišení dvou druhů virů pocházejících ze stejného rodu, z důvodu takřka stejné morfologie. Kromě těchto přímých pozorování virových částic v surových rostlinných extraktech poskytuje také analýza

infikované tkáně v ultratenkých řezech důležité informace o umístění virových částic v buňce, různých typech inkluzních tělísek a buněčných změnách, které slouží jako další užitečné informace pro diagnostiku viru (Astier *et al.* 2001).

Metody založené na elektronové mikroskopii mají velkou nevýhodu v potřebě velmi náročného a nákladného vybavení. Tyto metody také vyžadují vysoce kvalifikovanou obsluhu se zkušenostmi v přípravě a vyhodnocování preparátů (Khan & Dijkstra 2006).

3.6.4 Sérologické metody

Sérologické techniky jsou založeny na specifické interakce dvou typů proteinů. Antigenů (proteinů virového původu) a protilátky (proteinů specifických pro tyto antigeny). Specifické protilátky schopné se navázat na virový antigen jsou vytvářeny jako odezva imunitního systému zvířetem v reakci na injekci antigenu (Hull 2001).

3.6.4.1 ELISA

Jednou z nejčastěji používaných technik je metoda zvaná Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, zkráceně nazývána ELISA. Tato analytická metoda se využívá pro kvalitativní stanovení různých antigenů. Může být aplikována na viry rozdílných morfologických typů. Tyto testy jsou levné, nenáročné na vybavení a přípravu vzorků (Hull 2001).

Existuje několik typů ELISA testů. Pro testování rostlinných virů se však nejčastěji používá metoda DAS-ELISA (double antibody sandwich) a TAS ELISA (triple antibody sandwich).

Metoda DAS-ELISA probíhá následovně: antigen viru je zachycen specifickou protilátkou nanesenou na pevném nosiči (polystyrenová mikrotitrační deska). Poté je detekován specifickými protilátkami značenými enzymem (konjugát), které se naváže pouze v místě, kde je zachycen antigen viru. Pozitivní vzorek se zviditelní reakcí s vhodným chromogenním substrátem, což je bezbarvá látka, která se enzymovou reakcí mění na látku barevnou. Barevná reakce se měří spektrofotometricky a výstupem je soubor hodnot absorbance. Metoda DAS-ELISA dokáže zachytit koncentrace viru v rozsahu 1–10 ng.ml⁻¹ (Clark & Adams 1977).

Pro zlepšení této citlivosti a rozšíření spektra detekovaných kmenů se lze vyhnout kroku konjugace enzymu s glutaraldehydem, který degraduje významnou část protilátek. Detekční protilátky mohou být bez poškození značeny biotinem nebo použity neznačené. V tomto případě musí být použita sekundární protilátka z jiného zvířete. Výsledný produkt pak obsahuje tři vrstvy protilátek tzv. TAS ELISA (triple antibody sandwich). Tato metoda dokáže zachytit řádově menší koncentrace viru, a to v rozsahu 1 ng.ml⁻¹–10 pg.ml⁻¹ (Astier *et al.* 2001).

3.6.5 Molekulární metody

S rozvojem molekulární biologie v 80. letech 20 století se objevila možnost detekce sekvencí virové nukleové kyseliny. Tyto metody nalézají své uplatnění zejména tam, kde se dosud nepodařilo připravit specifické protilátky nebo v případě, že citlivost serologických metod není dostatečná (Hull 2001).

3.6.5.1 RT-PCR

Metoda RT-PCR neboli Reverse Transcription – Polymerase chain reaction patří mezi nejčastěji používanou kvalitativní molekulární metodu k detekci virových chorob rostlin. Většina rostlinných virů má svůj genom kódovaný v různých formách RNA. Při klasické detekci pomocí PCR je ovšem možné pracovat pouze s genetickou informací kódovanou v podobě DNA. V tomto případě je proto nutné před samotnou PCR provést krok takzvané reverzní transkripce, která nám převede totalní RNA vzorku do cDNA (komplementární DNA). Principem samotné PCR je replikace určitého, pro daný druh specifického, úseku DNA. Jedná o enzymatickou reakci, která se cyklicky opakuje. Reakce probíhá v termocykleru, který je naprogramován na přesné teploty, které se mění v daných časových intervalech. Na konci každého cyklu reakce dochází k exponenciálnímu množení určitého úseku DNA. Celá reakce se skládá ze 3 kroků (denaturace, hybridizace, elongace), které se opakují 30–40krát. Amplifikační produkt je dále vyhodnocen gelovou elektroforézou, při níž dochází k rozdělení úseků DNA v závislosti na jejich délce. Produkt je obarven ethidium bromidem a dále vyhodnocován pod UV světlem (Astier *et al.* 2001).

3.6.5.2 Real-time PCR

Metoda real-time je modifikací klasické PCR, která umožňuje kvantifikaci určitého úseku nukleové kyseliny v různých biologických vzorcích (Bio-Rad 2022).

Při této metodě jsou amplifikované produkty značeny pomocí k danému úseku DNA specifických fluorescenčních sond. Samotná detekce probíhá v průběhu samotné reakce specialně vybaveném termocykleru, s optickým detekčním modulem pro měření fluorescenčního signálu, generovaného během každého zesilovacího cyklu (Mackay *et al.* 2002). Zpočátku fluorescence zůstává na nedetekovatelné úrovni. S postupným exponenciálním nárůstem amplifikačního produktu dochází také k exponenciálnímu nárůstu fluorescenčního signálu. V určitém cyklu by měl signál dosáhnout úrovně detekovatelné fluorometrem. Číslo cyklu, při kterém k tomu dochází, se nazývá kvantifikační cyklus neboli C_q . Pokud došlo k změření C_q hodnoty ve fázi exponenciálního nárůstu amplifikačního produktu, lze ho použít ke přesnému výpočtu počátečního množství templátových vláken (Vidic *et al.* 2023).

4 Materiál a metody

4.1 Metodický postup pro odběr vzorků

4.1.1 Biologický materiál

Jako výchozí biologický materiál pro potřeby testování byly použity vzorky odebrané z rostlin cukrové řepy (*Beta vulgaris var. altissima*), máslové dýně (*Cucurbita moschata*), okurky (*Cucumis sativus*) a tykve velkoplodé (*Cucurbita maxima*). Standardní vzorek pak představoval biologický materiál v podobě minimálně dvou listů odebraných z různých částí rostliny.

4.1.2 Odběr vzorků

Odběry vzorků tykvovité zeleniny proběhly 13. 9. 2022, odběry vzorků cukrové řepy probíhaly 24. 10. 2022 a 25. 10. 2022.

Při odběru vzorků tykvovité zeleniny byly vybírány především rostliny vykazující typické symptomy virových chorob.

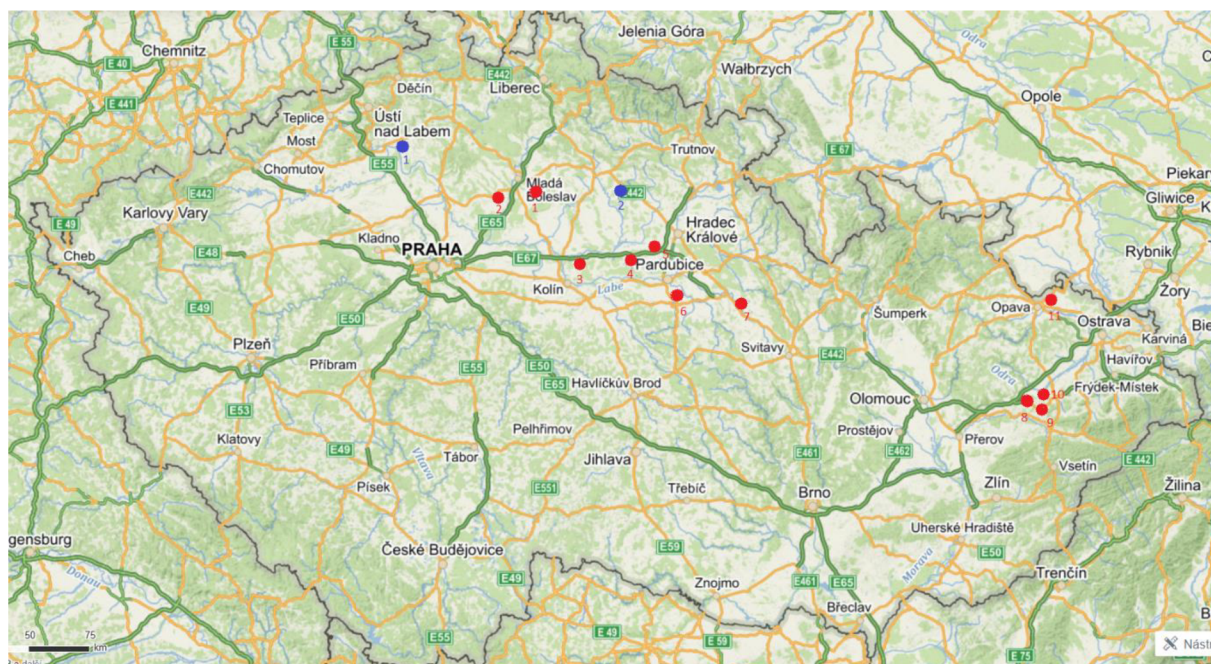
Při odběru vzorků cukrové řepy byly taktéž vybírány příznakové rostliny, z vybrané rostliny byl následně odebrán jak mladší list ze srdéčka rostlin, tak okrajový plně vyvinutý starší list.

Odebraný vzorek byl následně umístěn do igelitového sáčku a opatřen pořadovým číslem a názvem lokality. Vzorky se skladovaly při teplotách do 4 °C do doby, než byly použity pro testování. Délka doby uskladnění nepřesahovala jeden týden, z důvodu rizika rozvoje plísní a degradace rostlinného materiálu. V případě nutnosti uchování materiálu po delší dobu, než je jeden týden, byly vzorky uskladněny v mrazáku při teplotě - 24 °C nebo - 80 °C.

4.1.3 Lokality odběru

Vzorky cukrové řepy byly odebírány v několika různých oblastech v rámci České republiky, kde se komerčně pěstuje cukrová řepa. Jednalo se o kraje, Středočeský, Královehradecký, Pardubický, Olomoucký a Moravskoslezský, konkrétně lokality Pěčice, Chotětov, Němčice, Chyšův, Osičky, Chrudim, Vysoké Mýto, Běloutín, Blahutovice, Jeseník nad Odrou a Opava. Pokus byl zaměřen na mapování výskytu BYV, BMV a BChV na jednotlivých lokalitách.

Vzorky tykvovité zeleniny byly odebírány na soukromé farmě v Polepech na Litoměřicku a v obci Sobčice u Hořic. Odběr probíhal na pěti různých honech. Pokus byl zaměřen na mapování výskytu CABYV, CMV, SqMV, WMV a ZYMV na jednotlivých lokalitách.



Mapa 1. lokality odběru rostlinného materialu pro účely testování.

Červené tečky značí místa odběru vzorků cukrové řepy.

- 1: Pěčice (komerční pole, lokalita 1)
- 2: Chotětov (komerční pole, lokalita 2, 6 a 7)
- 3: Němčice (komerční pole, lokalita 3, 4 a 5)
- 4: Chyšt (komerční pole, lokalita 8)
- 5: Osičky (komerční pole, lokalita 9)
- 6: Chrudim (komerční pole, lokalita 10)
- 7: Vysoké Mýto (komerční pole, lokalita 11)
- 8: Běloutín (komerční pole, lokalita 13)
- 9: Blahutovice (komerční pole, lokalita 14)
- 10: Jeseník nad Odrou (komerční pole lokalita 15)
- 11: Opava (komerční pole lokalita 12, 16, 17, 18 a 19)

Modrá tečka značí místo odběru tykvovité zeleniny.

- 1: Polepy, Litoměřice (komerční pole, hon č. 1,2,3,4)
- 2: Sobčice (komerční pole, hon č. 5)

4.2 Detekce virů pomocí sérologické metody DAS a TAS ELISA

4.2.1 Protilátky

Sérologické testy byly provedeny pomocí technik DAS a TAS ELISA (Clark & Adams, 1977; Clark & Joseph Bar, 1984). Polyklonální protilátky byly komerčně připraveny firmami Loewe Biochemica a DSMZ. Pro detekci Polerovirů byli použity kity s variantou TAS ELISA, u BYV, WMV, ZYMV, CMV a SqMV byly použity kity s variantou DAS ELISA.

4.2.2 DAS ELISA

- 1) Povrch jamek mikrotitračních destiček byl nejprve potažen potahovacím pufrem se specifickou protilátkou proti určitému antigenu. Protilátky byly ředěny potahovacím pufrem dle instrukcí výrobce. Do každé jamky bylo pipetováno 100 µl naředěné protilátky.
- 2) Destičky byly inkubovány dvě až čtyři hodiny při 37 °C.
- 3) Po inkubaci protilátek byly jamky třikrát promyty promývacím pufrem pomocí stříčky.
- 4) Vzorky testovaných rostlin byly homogenizovány s extrakčním pufrem v třecí misce s tloučkem. Homogenát byl slit do zkumavky a byl uchován na ledu do jeho použití. Pozitivní kontroly byly zakoupeny od výrobce protilátek. Jako negativní kontroly byly používány zdravé rostliny stejného druhu jako byl ten testovaný, vypěstované ve skleníku. Kontroly byly připraveny podobně jako testované vzorky.
- 5) Do jednotlivých jamek bylo dávkováno 100 µl homogenátu ze vzorků rostlin a příslušných kontrol.
- 6) Mikrotitrační destičky byly umístěny do lednice přes noc při teplotě 4 °C.
- 7) Ráno pak byl z destiček odsát homogenát pomocí vodní vývěvy, aby nedošlo při jeho vylévání ke kontaminaci sousedních jamek. Jamky byly třikrát promyty promývacím pufrem pro odstranění nenačkaných složek. Pufr byl při promývání do jamek pipetován a odsáván stejně jako při odstraňování extraktu.
- 8) Dále bylo do jamek přidáno 100 µl konjugátu naředěného příslušným pufrem.
- 9) Destičky byly dále inkubovány dvě hodiny při 37 °C.
- 10) Poté byly destičky čtyřikrát promyty promývacím pufrem a do jamek bylo napipetováno 100 µl substrátového pufru se substrátem. Následovala inkubace vzorků při laboratorní teplotě bez přístupu světla.
- 11) Podle rychlosti reakce byla následně absorbance měřena za 60-120 minut pomocí spektrofotometru Sunrise při 405 nm. Poté byly desky umístěny do lednice a absorbance byla měřena ještě následující den. Míra zabarvení vzorku byla přímo úměrná koncentraci enzymu vázaného na antigeny.

4.2.3 TAS ELISA

- 1) Povrch jamek mikrotitračních destiček byl nejprve potažen potahovacím pufrům se specifickou polyklonální protilátkou, proti danému viru. Roztok IgG byl ředěn potahovacím pufrům dle instrukcí výrobce. Do každé jamky bylo pipetováno 100 μ l naředěné protilátky.
- 2) Destičky byly inkubovány dvě až čtyři hodiny při 37 °C.
- 3) Po inkubaci protilátek byly jamky třikrát promyty promývacím pufrům pomocí stříčky. U některých virů byl v této fázi do jamek pipetován extrakční pufr s 2 % odtučněného mléka kvůli blokování nespecifických vazeb a následovala inkubace 30 minut při 37 °C.
- 4) Vzorky testovaných rostlin byly homogenizovány s extrakčním pufrům v třecí misce s tloučkem. Homogenát byl slit do zkumavky a byl uchován na ledu do jeho použití. Pozitivní kontroly byly zakoupeny od výrobce protilátek. Jako negativní kontroly byly používány zdravé rostliny stejného druhu jako byl ten testovaný, vypěstované ve skleníku. Kontroly byly připraveny podobně jako testované vzorky.
- 5) Do jednotlivých jamek bylo dávkováno 100 μ l homogenátu ze vzorků rostlin a příslušných kontrol.
- 6) Mikrotitrační destičky byly umístěny do lednice přes noc při teplotě 4 °C.
- 7) Ráno pak byl z destiček odsát homogenát pomocí vodní vývěvy, aby nedošlo při jeho vylévání ke kontaminaci sousedních jamek. Jamky byly třikrát promyty promývacím pufrům pro odstranění nenavázaných složek. Pufr byl při promývání do jamek pipetován a odsáván stejně jako při odstraňování extraktu.
- 8) Dále bylo do jamek přidáno 100 μ l myších monoklonálních protilátek proti viru naředěných v konjugačním pufru ...
- 9) Vzorky byly následně inkubovány při 37 °C dvě hodiny.
- 10) Po inkubaci monoklonálních protilátek byly jamky čtyřikrát promyty promývacím pufrům. Dále bylo přidáno 100 μ l extrakčního pufru s králičí polyklonální protilátkou proti myším IgG konjugovanou s alkalickou fosfatázou.
- 11) Destičky byly dále inkubovány dvě hodiny při 37 °C.
- 12) Poté byly destičky čtyřikrát promyty promývacím pufrům a do jamek bylo napipetováno 100 μ l substrátového pufru se substrátem. Následovala inkubace vzorků při laboratorní teplotě bez přístupu světla.
- 13) Podle rychlosti reakce byla následně absorbance měřena za 60-120 minut pomocí spektrofotometru Sunrise při 405 nm. Poté byly desky umístěny do lednice a absorbance byla měřena ještě následující den. Míra zabarvení vzorku byla přímo úměrná koncentraci enzymu vázaného na antigeny.

4.2.3.1 Složení použitých pufrů

- **Phosphate buffered saline (PBS)x10:** 80 g NaCl; 2 g KH₂PO₄; 11,5 g Na₂HPO₄; 2 g KCl; (2 g NaN₃) doplníme sterilní ddH₂O do 1 000 ml. Skladujeme v tmavé láhvi při 4 °C, pH roztoku je upraveno na 7,2.
- **Extrakční pufr:** 2% PVP (w/V); 0,2% BSA (w/V); 0,5 ml Tween 20 rozpustíme v 1 000 ml 1× PBS pufru. Skladujeme při 4 °C jeden den.
- **Promývací pufr (PBS + Tween 20):** 0,5 ml Tween 20 rozpustíme v 1 000 ml 1× PBS. Skladujeme při 4 °C.
- **Potahovací pufr:** 1,59 g Na₂CO₃; 2,93 g NaHCO₃; (0,2 g NaN₃) rozpustíme v 1 000 ml sterilní ddH₂O. Skladujeme při 4 °C, pH pufru je 9,6.
- **Substrátový pufr:** 9,7 ml diethnolamin, 0,095 g MgCl₂ rozpustíme v 1000 ml sterilní ddH₂O. Skladován v tmavé láhvi při 4 °C.

4.3 Detekce virů pomocí metody RT-PCR

Detekce patogena byla realizována pomocí metod izolace celkové RNA pomocí Spectrum™ Plant Total RNA Kit (Sigma-Aldrich), Two-Step RT-PCR a konečné vizualizace výsledků na agarózové elektroforéze.

4.3.1 Izolace celkové RNA pomocí Spectrum™ Plant Total RNA Kit (Sigma-Aldrich)

- 1) Ke 100 mg biologického materiálu bylo po homogenizaci pomocí třecích misek a tekutého dusíku přidáno 500 µl Lysis solution, ke kterému byl těsně před použitím přidán 2-merkaptoetanol v poměru 1:100.
- 2) Vzorek byl převeden do 2 ml zkumavky a byl inkubován 5 min při 56 °C. Poté byla směs centrifugována (15 000 G, 3 min).
- 3) Vodní fáze byla převedena do nové mikrozkušavky s filtrační kolonkou (Filtration Column) a centrifugována (15 000 G, 1 min).
- 4) Poté byla kolonka ze zkumavky odstraněna a k lyzátu bylo připipetováno 500 µl Binding Solution. Po promíchání pomocí pipety byl homogenát převeden do mikrozkušavky s kolonkou Binding Column a centrifugován (15 000 G, 1 min).
- 5) Vodní fáze byla odstraněna a ke vzorku bylo přidáno 500 µl Wash Solution 1, následovala centrifugace (15 000 G, 1 min).
- 6) Vodní fáze byla odstraněna a ke vzorku bylo přidáno 500 µl Wash Solution 2 a následovala centrifugace (15 000 G, 1 min). Tento krok byl jednou zopakován.
- 7) Vodní fáze byla odlita a následovala centrifugace „na sucho“ (15 000 G, 1 min).

8) Kolonka byla přenesena do nové mikrozkušavky a RNA byla eluována v 50 μ l Elution Solution. Nejprve proběhla inkubace 1 min při laboratorní teplotě a následovala centrifugace (15 000 G, 1 min).

9) Vzorek byl uskladněn v mrazicím boxu (-28 °C) či ihned použit pro další analýzy. Uvedený postup byl doporučen výrobcem (Sigma Aldrich), složení roztoků není uvedeno.

4.3.2 Stanovení koncentrace a čistoty celkové RNA

Množství a kvalita celkové RNA byla určena spektrofotometricky (NanoDrop 2000 ThermoScientific, USA) při vlnové délce 260 nm, respektive 280 nm ($A_{260} = 1$ je koncentrace 40 μ g/ml celkové RNA; kvalita RNA je poměr A_{260}/A_{280} , doporučená hodnota se pohybuje v intervalu 1,6 - 2,0).

4.3.3 Reverzní transkripce

1) Syntéza cDNA probíhala v reakčním objemu 50 μ l. Nejprve byl připraven premix o objemu 30 μ l obsahující:

- X μ l sterilní ddH₂O
- 0,5 μ l náhodných primerů (zásobní roztok 1 μ g/ μ l; finální koncentrace 0,5 μ g; Roche)
- přibližně 750 ng celkové RNA

2) Vzorek byl 5 min inkubován v 65 °C a poté nechán 5 min na ledu.

3) K premixu bylo následně přidáno:

- 10 μ l 5 \times First Strand Buffer (finální koncentrace 1 \times ; Invitrogen)
- 4,8 μ l sterilní ddH₂O
- 2,5 μ l každého dNTP (zásobní roztok 10 mM; finální koncentrace 0,5 mM; Fermentas)
- 2,0 μ l DTT (zásobní roztok 0,1 mM; finální koncentrace 4mM; Invitrogen)
- 0,7 μ l Mu-MLV reverzní transkriptázy (zásobní roztok 200 U/ μ l; finální koncentrace 40 U/ μ l; Fermentas).

4) Mikrozkušavka byla ponechána ve 37 °C po dobu 55 min a poté byla 15 min inkubována v 70 °C.

4.3.4 Polymerázová řetězová reakce

1) Reakce PCR byla prováděna v celkovém objemu 25 μ l obsahujícím:

- 18,05 μ l ddH₂O
- 2,5 μ l 10 \times DreamTaq buffer (finální koncentrace 1 \times ; Fermentas)

- 0,25 µl každého dNTP (zásobní roztok 10 µM; finální koncentrace 0,1 mM; Fermentas)
- 0,5 µl reverzního primeru (Tabulka 1)
- 0,5 µl forwardového primeru (Tabulka 1)
- 0,2 µl DreamTaq polymerázy (zásobní roztok 5 U/µl; finální koncentrace 1 U/µl, Fermentas).
- 3 µl cDNA vzorku

2) Pro PCR byl použit termocykler MJ Research PTC 200. Podmínky během amplifikace byly následující: 94 °C 2 min; 35 cyklů: denaturace 94 °C 15 s, aneling X °C 30 s (Tabulka 1), extenze 72 °C 1 min, konečná extenze 72 °C 7 min.

4.3.4.1 Použité primery

Virus	Rod	Název primeru	Sekvence primery 5'-3'	Velikost produktu	Ta (°C)	Autoři
beet mild yellowing virus	<i>Polerovirus</i>	MpxBM+ MpxBM-	ATGCAATTCAGCTTAAAACAAACA GCTTTCAGCACACCATACTG	450 bp	50	Hauser et al., 2000
beet chlorosis virus	<i>Polerovirus</i>	MpxBC+ MpxBC-	ATGAACTTTGAGATTTGCTTC TGA CAG CTT TTT CTG AAG AG	350 bp	50	Hauser et al., 2000

Tabulka 1. Přehled použitých primerů při testování rostlinného materiálu pomocí metody RT-PCR.

4.3.5 Elektroforetická separace nukleových kyselin

Konečná vizualizace výsledků byla provedena pomocí horizontální agarózové elektroforézy (HE 33 Mini Submarine Unit, Basic, Amersham Biosciences nebo MultiSUB Midi, Cleaver Scientific Ltd).

1) K přípravě 1% agarózového gelu bylo naváženo 1 g agarózy, která byla kvantitativně převedena do baňky, kde byla smíchána spolu s 1× TBE pufrém na konečný objem 100 ml. Následně byla baňka zahřívána v mikrovlnné troubě po dobu asi 3 min, což způsobilo rozpuštění agarózy. Roztok byl poté ochlazen proudem studené vody na zhruba 60 °C. Po ochlazení bylo přidáno 50 µl ethidium bromidu (konečná koncentrace 0,5 µg/ml) a roztok byl promíchán. Gel byl nalit do předem připravené formy s hřebínkem tak, aby nevznikly bubliny a nechal se zatuhnout.

2) Pro následné pipetování DNA vzorků do gelu byl ztuhlý gel umístěn do elektroforézní vaničky tak, aby byl celý ponořený v 1× TBE pufru. Po vytažení hřebínku v gelu vznikly mezery, do kterých bylo následně napipetováno 10 µl PCR produktu smíchaného s 2 µl barviva DNA Loading Dye (Fermentas). Do první a poslední mezery byly vždy napipetovány 2 µl hmotnostního standardu Low-Range DNA Ladder (Fermentas).

3) Následná elektroforetická separace nukleových kyselin probíhala za konstantního stejnosměrného napětí 90–120 V po dobu 45 min.

4) Vizualizace DNA fragmentů po skončení elektroforézy probíhala pod UV transilátorem při vlnové délce 260 nm. Pomocí hmotnostního standardu Low-Range DNA Ladder (Fermentas) byla určena velikost fragmentů nukleové kyseliny.

4.3.5.1 Složení použitých pufrů

- **10× TBE (pH 8,0):** 890 mM Tris-HCl; 890 mM kyselina boritá; 20 mM EDTA. Sterilizujeme pomocí autoklávu. Skladujeme při laboratorní teplotě.

5 Výsledky

5.1 Detekce virových patogenů u cukrové řepy

V rámci detekce rostlinných virů infikující cukrovou řepu bylo otestováno 67 rostlin, odebraných ze 14 lokalit. Odběrová místa jsou tradiční oblasti pěstování cukrové řepy. Jednalo se o kraje, Středočeský, Královehradecký, Pardubický, Olomoucký a Moravskoslezský, a konkrétně o lokality Pěčice, Chotětov, Němčice a Opava.

Vzorky byly analyzovány pomocí sérologické metody DAS a TAS ELISA na přítomnost virových zástupců rodu *Polerovirus* a na přítomnost viru žloutnutí řepy (beet yellows virus, BYV). U 5 ze zmíněných 14 lokalit byly testované vzorky z rostlin dále rozděleny na mladší a starší listy. Cílem tohoto experimentu bylo odhalit distribuci viru v samotné rostlině.

Část náhodně vybraných vzorků byla následně otestována metodou RT-PCR, za účelem ověření výsledků z ELISA testování a dále za účelem konkrétní druhové determinace zástupců rodu *Polerovirus*.

5.1.1 Detekce virových patogenů u cukrové řepy pomocí metody ELISA

Výsledky získané na základě diagnostických testů DAS a TAS ELISA odhalily, že u testovaných rostlin jsou přítomni zástupci rodu *Polerovirus* u 31,34 % testovaných rostlin a BYV u 19,4 % rostlin. Z celkových 67 testovaných rostlin bylo 28 pozitivních, podíl pozitivních vzorků tedy celkově činil 41,79 %.

Č. vzorku	Zástupci rodu <i>Polerovirus</i>	BYV
Pěčice lokalita 1		
1		
2		
Chotětov lokalita 2		
3		
4		
Němčice lokalita 3		
5		
6		
Němčice lokalita 4		
7		
8		

Tabulka 2. Přehled výsledků testování přítomnosti zástupců rodu *Polerovirus* a BYV. Označení modrou barvou = pozitivní vzorek (absorbance <1), označení žlutou barvou = pozitivní vzorek (absorbance 1-2), označení červenou barvou – pozitivní vzorek (absorbance >2).

Č. vzorku	Zástupci rodu <i>Polerovirus</i>	BYV
Němčice lokalita 5		
9		
10		
Chotětov lokalita 6		
11		
12		
13		
14		
15		
Chotětov lokalita 7		
16		
Chyšť lokalita 8		
17		
18		
19		
20		
21		
22		
23		
Osičky lokalita 9		
24		
Chrudim lokalita 10		
25		
26		
Vysoké Mýto lokalita 11		
27		
28		
29		
30		
31		
32		
33		
34		
35		

Tabulka 3. Přehled výsledků testování přítomnosti zástupců rodu *Polerovirus* a BYV. Označení modrou barvou = pozitivní vzorek (absorbance <1), označení žlutou barvou = pozitivní vzorek (absorbance 1-2), označení červenou barvou – pozitivní vzorek (absorbance >2).

Č. vzorku	Zástupci rodu <i>Polerovirus</i>	BYV
Opava lokalita 12		
36		
37		
38		
39		
40		
41		
42		
Bělotín lokalita 13		
43		
44		
45		
46		
47		
48		
49		
Blahutovice lokalita 14		
50 starší		
50 mladší		
51 starší		
51 mladší		
52 starší		
52 mladší		
53 starší		
53 mladší		
Jeseník nad Odrou lokalita 15		
54 starší		
54 mladší		
55 starší		
55 mladší		
56 starší		
56 mladší		
57 starší		
57 mladší		
58 starší		
58 mladší		
59 starší		
59 mladší		
60 starší		

Tabulka 4. Přehled výsledků testování přítomnosti zástupců rodu *Polerovirus* a BYV. Vzorky 50–67 rozděleny na mladší a starší list. Označení modrou barvou = pozitivní vzorek (absorbance <1), označení žlutou barvou = pozitivní vzorek (absorbance 1-2), označení červenou barvou – pozitivní vzorek (absorbance >2).

Č. vzorku	Zástupci rodu <i>Polerovirus</i>	BYV
Jeseník nad Odrou lokalita 15		
60 mladší		
61 starší		
61 mladší		
62 starší		
62 mladší		
63 starší		
63 mladší		
Opava lokalita 16		
64 starší		
64 mladší		
Opava lokalita 17		
65 starší		
65 mladší		
Opava lokalita 18		
66 starší		
66 mladší		
Opava lokalita 19		
67 starší		
67 mladší		

Tabulka 5. Přehled výsledků testování přítomnosti zástupců rodu *Polerovirus* a BYV. Vzorky 50–67 rozděleny na mladší a starší list. Označení modrou barvou = pozitivní vzorek (absorbance <1), označení žlutou barvou = pozitivní vzorek (absorbance 1-2), označení červenou barvou – pozitivní vzorek (absorbance >2).

Výsledky testování u vzorků 50-67 rozdělených na starší a mladší odebrané listy ukázaly, že 50 % rostlin bylo pozitivních na oba z odebraných vzorků z jedné rostliny testované na zástupce rodu *Polerovirus*. Dále u 22,22 % rostlin byl zachycen pouze pozitivní vzorek pocházející z mladších listů. Naopak pozitivní vzorek pouze u starších listů nebyl zachycen žádný.

U BYV bylo zjištěno 11,11 % rostlin pozitivních na oba odebrané vzorky z jedné rostliny. Dále u 16,66 % rostlin byl zachycen pouze pozitivní vzorek pocházející z mladších listů. Pozitivní vzorek pouze u starších listů byl zachycen pouze jeden, podíl pozitivních vzorků zde tedy činil 5,55 %.

Ze zmíněných výsledků vyplývá, že při detekci virových patogenů pomocí metody ELISA vykazovaly největší pozitivitu mladší listy řepy a jsou tedy vhodnější pro odběr vzorků a následnou detekci než listy starší, které nejspíše v řadě případů vykazují koncentraci virových částic, kterou daný ELISA test nebyl schopen zachytit.

5.1.2 Detekce virových patogenů u cukrové řepy pomocí metody RT-PCR

Dále byla u 18 vzorků provedena detekce pomocí metody RT-PCR. Cílem bylo ověření výsledků z ELISA testování a dále konkrétní druhová determinace zástupců rodu *Polevirus*, která u sérologické metody není v rámci rodu možná.



Obrázek 1. Detekce BChV metodou RT-PCR. Elektroforeogram RT-PCR produktů po separaci na agarózovém gelu. Použité primery: A: MpxBC+/MpxBC- (Hauser *et al.*, 2000), velikost produktu 350 bp. M: hmotnostní standard *Mass ruler low range* (Fermentas); N: ddH₂O; A1-A4: vzorky z listů řepy pozitivní na přítomnost BChV.

Č. vzorku	BChV	BMVYV
Blahutovice lokalita 14		
50		
51		
52		
53		
Jeseník nad Odrou lokalita 15		
54		
55		
56		
57		
58		
59		
60		
61		
62		
63		
Opava lokalita 16		
64		
Opava lokalita 17		
65		
Opava lokalita 18		
66		
Opava lokalita 19		
67		

Tabulka 6. Přehled výsledků testování vzorků cukrové řepy metodou RT-PCR na přítomnost BChV a BMVYV, označení červenou barvou – pozitivní vzorek.

Z výsledků metody RT-PCR vyplývá, že u vybraných testovaných vzorků se jednalo ve všech případech o infekci BChV, virus BMVYV nebyl ani u jednoho ze vzorků detekován.

Dále byla pomocí RT-PCR ověřena správnost výsledků ELISA testů. U vzorků 50-67, jež byly všechny vyhodnocené metodou ELISA jako pozitivní, byly také vyhodnoceny jako pozitivní pomocí metody RT-PCR.

5.2 Detekce virových patogenů u tykvovité zeleniny

V rámci detekce rostlinných patogenů bylo otestováno 152 vzorků různých druhů tykvovité zeleniny. Vzorky byly analyzovány pomocí sérologické metody DAS a TAS ELISA na přítomnost CABYV, CMV, SqMV, WMV a ZYMV.

5.2.1 Detekce virových patogenů u tykvovité zeleniny pomocí metody ELISA

Výsledky získané na základě diagnostických sérologických testů odhalily, že z celkových 152 testovaných rostlin bylo 147 pozitivních aspoň na jeden z testovaných virů, podíl pozitivních vzorků tedy celkově činil 96,71 %. V testovaném rostlinném materiálu nebyl přítomný CABYV ani SqMV. V naprosté většině vzorků nebyl dále přítomný CMV, který byl zaznamenán jen u 6 vzorků z celkových 152 otestovaných vzorcích, podíl pozitivních vzorků tedy činil 3,95 %. Naproti tomu u WMV a ZYMV byla infekce zaznamenána ve velkém rozsahu. U WMV bylo z celkového počtu testovaných vzorů zaznamenáno 87,50 % vzorků pozitivních a u ZYMV bylo zaznamenáno 88,81 % pozitivních vzorků.

Hon č. 1 (modré Hokkaido)					
Č. vzorku	WMV	ZYMV	CMV	CABYV	SqMV
1	žlutá	žlutá	žlutá		
2					
3	žlutá	žlutá			
4	žlutá	modrá			
5	žlutá	modrá			
6	modrá	žlutá			
7	modrá	červená			
8	modrá	žlutá			
9	modrá	žlutá			
10	žlutá	modrá	žlutá		

Tabulka 7. Přehled výsledků testování vzorků tykví metodou TAS a DAS ELISA hon č.1. Označení modrou barvou = pozitivní vzorek (absorbance <1), označení žlutou barvou = pozitivní vzorek (absorbance 1-2), označení červenou barvou – pozitivní vzorek (absorbance >2).

Hon č. 2 (Hokkaido, řezané)					
Č. vzorku	WMV	ZYMV	CMV	CABYV	SqMV
11	blue	red			
12	blue	red			
13	blue	red			
14	blue	white			
15	yellow	red			
16	red	white			
17	red	blue			
18	blue	blue			
19	blue	red			
20	yellow	red			
21	yellow	blue			
22	yellow	red			
23	red	blue	yellow		
24	red	red			
25	yellow	yellow			
26	blue	red			
27	blue	blue			
28	red	blue			
29	white	red			
30	red	yellow			
31	blue	red			
32	red	red			
33	yellow	blue			
34	red	white			
35	blue	red			
36	blue	red			
37	blue	yellow			
38	blue	red			
39	white	red			
40	white	red			
41	yellow	yellow			
42	red	red			
43	blue	red			
44	blue	yellow			
45	blue	red			
46	yellow	yellow	yellow		
47	red	blue			
48	yellow	yellow			
49	blue	blue			
50	yellow	blue			
51	yellow	blue			
52	blue	red			
53	red	red			
54	white	red			
55	yellow	red			
56	red	blue			

Tabulka 8. Přehled výsledků testování vzorků tykví metodou TAS a DAS ELISA hon č.2. Označení modrou barvou = pozitivní vzorek (absorbance <1), označení žlutou barvou = pozitivní vzorek (absorbance 1-2), označení červenou barvou – pozitivní vzorek (absorbance >2).

Hon č. 3 (Máslová dýně)					
Č. vzorku	WMV	ZYMV	CMV	CABYV	SqMV
57					
58					
59					
60					
61					
62					
63					
64					
65					
66					
67					

Tabulka 9. Přehled výsledků testování vzorků tykví metodou TAS a DAS ELISA hon č.3. Označení modrou barvou = pozitivní vzorek (absorbance <1), označení žlutou barvou = pozitivní vzorek (absorbance1-2), označení červenou barvou – pozitivní vzorek (absorbance >2).

Hon č. 4 (Hokkaido, trhané)					
Č. vzorku	WMV	ZYMV	CMV	CABYV	SqMV
68					
69					
70					
71					
72					
73					
74					
75					
76					
77					
78					
79					
80					
81					
82					
83					
84					
85					
86					
87					
88					
89					

Tabulka 10. Přehled výsledků testování vzorků tykví metodou TAS a DAS ELISA hon č.4. Označení modrou barvou = pozitivní vzorek (absorbance <1), označení žlutou barvou = pozitivní vzorek (absorbance1-2), označení červenou barvou – pozitivní vzorek (absorbance >2).

Hon č. 4 (Hokkaido, trhané)					
Č. vzorku	WMV	ZYMV	CMV	CABYV	SqMV
90					
91					
92					
93					
94					
95					
96					
97					
98					
99					
100					
101					
102					
103					
104					
105					
107					
108					
109					
110					
111					
112					

Tabulka 11. Přehled výsledků testování vzorků tykví metodou TAS a DAS ELISA hon č.4. Označení modrou barvou = pozitivní vzorek (absorbance <1), označení žlutou barvou = pozitivní vzorek (absorbance 1-2), označení červenou barvou – pozitivní vzorek (absorbance >2).

Hon č. 5					
Č. vzorku	WMV	ZYMV	CMV	CABYV	SqMV
113	červená	žlutá			
114	modrá	modrá			
115	červená	modrá			
116	modrá	žlutá			
117	červená	žlutá			
118	modrá	modrá			
119	modrá	červená			
120	červená	žlutá			
121	červená	modrá			
122	červená	červená			
123	bílá	červená			
124	červená	žlutá			
125	modrá	žlutá			
126	žlutá	modrá			
127	modrá	červená			
128	červená	červená			
129	modrá	žlutá			
130	modrá	žlutá			
131	červená	modrá			
132	žlutá	žlutá			
133	modrá	žlutá			
134	žlutá	žlutá			
135	žlutá	modrá			
136	modrá	žlutá			
137	červená	modrá			
138	žlutá	žlutá			
139	modrá				
140	červená	červená			
141	modrá				
142	modrá	žlutá			
143	modrá	žlutá			
144	modrá	modrá			
145	modrá	žlutá			
146	modrá	modrá			
147	žlutá	žlutá			
148	modrá	červená			
149	modrá	modrá			
150	modrá	žlutá			
151	žlutá	modrá			
152	žlutá	červená			

Tabulka 12. Přehled výsledků testování vzorků tykví metodou TAS a DAS ELISA hon č.5. Označení modrou barvou = pozitivní vzorek (absorbance <1), označení žlutou barvou = pozitivní vzorek (absorbance 1-2), označení červenou barvou – pozitivní vzorek (absorbance >2).

Tyto výsledky byly dále porovnány s výsledky testování tykvovitě zeleniny na katedře ochrany rostlin ČZU z roku 2019 a s výsledky, jež byly zpracovány v rámci mé bakalářské práce v roce 2020 (Kraus 2021). Srovnání bylo zaměřeno na četnosti výskytu směsných infekcí u jednotlivých párů virů. Statistické šetření bylo provedeno pomocí jednofaktorové analýzy rozptylu.

Č. vzorku	CABYV	CMV	SqMV	WMV	ZYMV
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					
13					
14					
15					
16					
17					
18					
19					
20					
21					
22					
23					
24					
25					
26					
27					
28					
29					
30					
31					

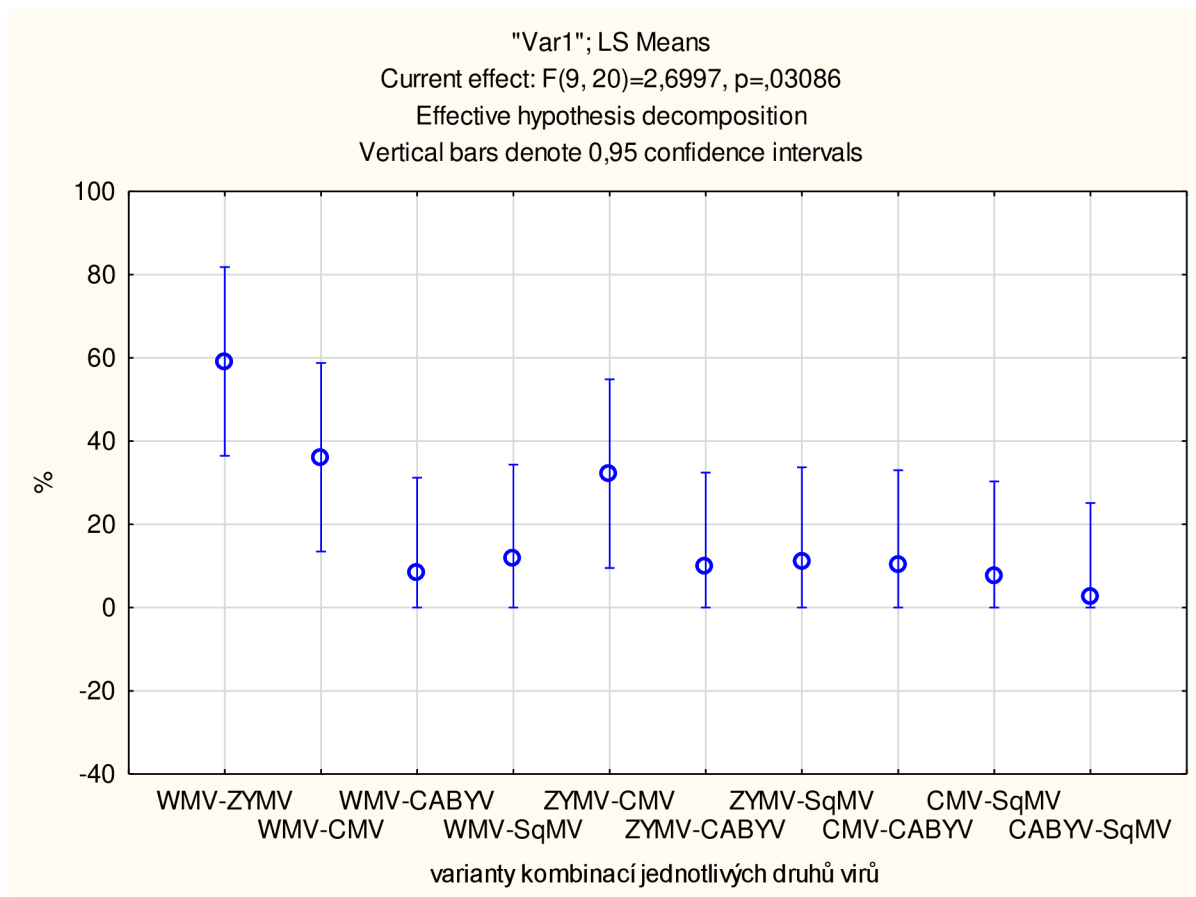
Tabulka 13. Výsledky testování tykvovitě zeleniny na přítomnost CABYV, CMV, SqMV, WMV a ZYMV. (Data poskytnuta katedrou ochrany rostliny ČZU v roce 2019). Označení žlutou barvou = pozitivní vzorek (absorbance <1), označení zelenou barvou = pozitivní vzorek (absorbance 1-2), označení červenou barvou – pozitivní vzorek (absorbance >2).

Č. vzorku	CABYV	CMV	SqMV	WMV	ZYMV
32		Red		Yellow	
33		Yellow		Yellow	
34		Green	Yellow	Yellow	
35		Red		Yellow	Red
36		Red			Red
37		Yellow			
38	Red	Green		Green	Red
39		Green			Red
40		Green			
41		Green		Green	
42		Red		Green	
43		Green			
44		Green		Green	
45		Green		Yellow	
46		Green			Red
47		Green		Yellow	
48		Red			Red
49		Red		Yellow	
50		Green			
51		Red		Yellow	
52		Green		Yellow	
53		Red		Red	
54	Yellow	Red		Green	
55		Red		Green	

Tabulka 14. Výsledky testování tykvovité zeleniny na přítomnost CABYV, CMV, SqMV, WMV a ZYMV. (Data poskytnuta katedrou ochrany rostliny ČZU v roce 2019). Označení žlutou barvou = pozitivní vzorek (absorbance <1), označení zelenou barvou = pozitivní vzorek (absorbance 1-2), označení červenou barvou – pozitivní vzorek (absorbance >2).

Č. vzorku	CABYV	CMV	SqMV	WMV	ZYMV
1				Blue	
2		Yellow		Red	
3		Yellow		Yellow	
4				Red	
5				Yellow	
6		Yellow		Red	
7				Red	Yellow
8		Blue	Yellow	Blue	Red
9		Yellow		Yellow	
10				Red	Yellow
11				Red	
12				Red	
13		Yellow		Yellow	
14		Yellow		Yellow	Yellow
15				Red	
16				Red	
17				Yellow	Blue
18	Yellow				
19		Yellow			Red
20				Red	Blue
21				Yellow	Red
22		Yellow		Yellow	Yellow
23				Yellow	Yellow
24				Blue	Yellow
25		Yellow		Yellow	
26			Yellow	Blue	
27				Blue	
28		Yellow		Red	Yellow
29		Red			
30		Yellow			
31			Yellow	Red	Red
32	Yellow	Yellow	Yellow	Red	Red
33		Blue		Red	Red
34			Yellow	Red	Yellow
35			Yellow	Blue	Red
36					Red
37		Blue	Yellow	Red	Blue
38		Yellow	Yellow	Yellow	Blue
39				Blue	
40				Blue	Blue
41		Yellow	Yellow	Yellow	Red
42				Blue	Blue
43			Yellow	Yellow	Blue

Tabulka 15. Výsledky testování tykvovité zeleniny na přítomnost CABYV, CMV, SqMV, WMV a ZYMV (Data převzata ze bakalářské práce z roku 2021; Kraus 2021). Označení modrou barvou = pozitivní vzorek (absorbance <1), označení žlutou barvou = pozitivní vzorek (absorbance 1-2), označení červenou barvou – pozitivní vzorek (absorbance >2).



Graf 1. Průměrný procentní výskyt směsné infekce jednotlivých kombinací virů WMV, ZYMV, CMV, CABYV a SqMV, 95 % hodnot ze skupin se vyskytuje v daných intervalech.

Už z pouhého pozorování vyplývá, že většina intervalů nevykazuje významnou diferenci, největší diferenci můžeme pozorovat mezi intervaly výskytu WMV-ZYMV a CABYV-SqMV, kdy u kombinace WMV-ZYMV byla zjištěna nejvyšší míra společného výskytu, a naopak u kombinace CABYV-SqMV nejnižší míra společného výskytu. Jelikož výsledná p – hodnota daného F testu je menší než 0,05 rozptyly sledovaných skupin nejsou stejné. Další je nutné provést detailní vyhodnocení výsledků, pro které byl proveden Fisherův LSD test.

LSD test; variable Var2 (Spreadsheet2)											
Probabilities for Post Hoc Tests											
Error: Between MS = 420,10, df = 20,000											
Cell No.	Var1	WMV-ZYMV 62,977	WMV-CMV 37,037	WMV-CABYV 11,307	WMV-SqM V 14,120	ZYMV-CM V 34,480	ZYMV-CABY V 14,197	ZYMV-SqM V 16,883	CMV-CAB YV 11,210	CMV-SqM V 10,773	CABYV-Sq MV 7,6400
WMV-ZYMV	1		0,136816	0,005807	0,008479	0,104098	0,008566	0,012231	0,005732	0,005402	0,003523
WMV-CMV	2	0,136816		0,139848	0,186066	0,880109	0,187479	0,242553	0,138445	0,132254	0,094292
WMV-CABYV	3	0,005807	0,139848		0,868186	0,181398	0,864631	0,742429	0,995448	0,974892	0,828794
WMV-SqMV	4	0,008479	0,186066	0,868186		0,237921	0,996390	0,870506	0,863704	0,843518	0,702692
ZYMV-CMV	5	0,104098	0,880109	0,181398	0,237921		0,239632	0,305580	0,179664	0,171996	0,124433
ZYMV-CABYV	6	0,008566	0,187479	0,864631	0,996390	0,239632		0,874066	0,860152	0,839984	0,699358
ZYMV-SqMV	7	0,012231	0,242553	0,742429	0,870506	0,305580	0,874066		0,738139	0,718871	0,586844
CMV-CABYV	8	0,005732	0,138445	0,995448	0,863704	0,179664	0,860152	0,738139		0,979442	0,833235
CMV-SqMV	9	0,005402	0,132254	0,974892	0,843518	0,171996	0,839984	0,718871	0,979442		0,853367
CABYV-SqMV	10	0,003523	0,094292	0,828794	0,702692	0,124433	0,699358	0,586844	0,833235	0,853367	

Tabulka 16. Fisherův LSD výsledný přehled p – hodnot.

Fisherův LSD test ukázal, že existuje statisticky významný rozdíl v průměrném společném výskytu WMV-ZYMV oproti průměrnému společnému výskytu WMV-CABYV, WMV-SqMV, ZYMV-CABYV, ZYMV-SqMV, CMV-CABYV, CMV-SqMV a CABYV-SqMV.

6 Diskuze

6.1 Stav porostů cukrové řepy na území České republiky

Virus žloutenky řepy (beet yellows virus, BYV), virus mírného žloutnutí řepy (beet mild yellowing virus, BMYV) a virus chlorózy řepy (beet chlorosis virus, BChV) způsobují na cukrové řepě tzv. chorobu virového žloutnutí. Tato choroba v současné době nepůsobí ekonomické škody. Před zavedením insekticidního moření osiva látkami ze skupiny neonikotinoidů byl běžný jejich každoroční výskyt spojený jednou za pět až sedm let s epidemickým výskytem na většině porostů, který působil výrazné ztráty na produkci cukrové řepy. V dalších letech díky využívání zmíněného moření byl výskyt a ztráty způsobené virovými žloutenkami minimální. V roce 2018 však Evropská komise uvedla v platnost zákaz moření osiv polních plodin insekticidními látkami z této skupiny. V České republice, a i některých dalších členských zemích Evropské unie byla doposud každoročně udělována výjimka na používání látky thiamethoxam pro účely moření osiva cukrové řepy. 19. 1. 2023 Evropský soudní dvůr rozhodl o neoprávněnosti těchto výjimek. Pro rok 2023 má již Česká republika výjimku na moření neonikotinoidy schválenou, v dalších letech však bude moření touto látkou zakázáno i u nás (Chochola 2021). Námi provedený monitoring v rámci České republiky na polích, kde byla komerčně pěstována cukrová řepa, potvrdil pomocí metody DAS a TAS ELISA výskyt některých virů způsobující chorobu virového žloutnutí řepy. U testovaných rostlin byli přítomni zástupci z rodu *Polevirus* u 31,34 % testovaných rostlin a BYV u 19,4 % rostlin. U části testovaných vzorků byla dále pomocí metody RT-PCR potvrzena přítomnost BChV, naopak přítomnost BMYV nebyla zaznamenána.

Ačkoliv byly odběry vzorů zaměřeny na jedince vykazující typické symptomy této choroby, byl podíl pozitivních vzorků aspoň na jeden z testovaných virů pouze 41,79 %. Samotný relativně nízký podíl pozitivních vzorků nějak „příznakových“ rostlin lze zejména vysvětlit náročnou identifikací této choroby na základě symptomatologie v polních podmínkách. Forma projevu symptomů je závislá na celé řadě faktorů, zejména na kmenu viru, na odolnosti odrůdy hostitelské rostliny a na podmínkách prostředí (Astier *et al.* 2001). Zejména také fyziologické žloutnutí listů působené nedostatkem některých z prvků může být zaměněno se symptomy virových žloutenek. Muže se jednat o symptomy nedostatku dusíku, které se projevují nejprve na starších listech, kde se nedostatek nejprve projevuje světle zeleným zbarvením listů, které postupně žloutnou a mohou i odumírat. Dále se může jednat o symptomy nedostatku hořčíku nebo draslíku, které mezi sebou můžeme snadno zaměnit. U obou živin se začíná chloróza objevovat na starších listech, nejčastěji se projevuje jako žloutnutí mezi listovou žilnatinou. K projevu příznaků dochází od okraje listů, které postupně přechází v nekrózu (Bittner 2018). Nesmíme také opomíjet efekt samotného moření látkou thiamethoxam, jež poskytovala porostům řepy, u kterých byly prováděny odběry vzorků, účinnou ochranu proti vektorům přenášejícím zmíněné viry. Rostliny byly chráněny v raných fázích vývoje, kdy jsou rostliny k virové infekci nejzranitelnější. U případné pozdější virové infekce, po odeznění účinku moření, se již symptomy mohly projevit jen v malém rozsahu nebo

vůbec žádné. Tomu by i odpovídala skutečnost, že při odběru vzorků nebyl počet nalezených rostlin, vykazující příznaky infekce chorobou virového žloutnutí velký.

Dle výsledků naší práce můžeme dále vyvodit závěr, že výběr vhodné části rostliny, z které je odebírán rostlinný materiál pro detekci patogenu, je zcela nezbytný. Rosypal *et al.* (2002) uvádí, že virová infekce se v rostlině nejprve šíří do míst intenzivního růstu, kam rostlina stahuje organické látky. Tato skutečnost se potvrdila u skupiny testovaných vzorků, kde byly odebrané listy rostlin rozděleny na starší a mladší a následně otestovány metodou ELISA. Z výsledků bylo zřejmé, že mladší listy rostlin řepy jsou pro odběr vzorků vhodnější než listy starší, u kterých v řadě případů byla reakce testu negativní (i když v mladších listech patogen nalezen byl). Důvodem byla zřejmě absence či nízká koncentrace virových částic, kterou nebyla schopná daná detekční technika ve starším pletivu zachytit. Tím docházelo ke vzniku falešně negativních výsledků.

6.2 Stav porostů tykvovitě zeleniny na území České republiky

Tykvovitá zelenina je hostitelem velkého množství virových patogenů. Mezi ekonomicky nejvýznamnější viry vyskytující se na zelenině této čeledi patří virus žluté mozaiky cukety (zucchini yellow mosaic virus, ZYMV), virus mozaiky okurky (cucumber mosaic virus, CMV), virus mozaiky tykve (squash mosaic virus, SqMV), virus mozaiky vodního melounu (watermelon mosaic virus, WMV) a virus žloutnutí okurky přenášený mšicemi (cucurbit aphid-borne yellow virus, CABYV). Výskyt všech zmíněných virů byl v určité míře zaznamenán i v České republice (Svoboda *et al.* 2011; Svoboda & Leisova-Svobodova 2011; Svoboda & Polák 2007). Námi provedený monitoring potvrdil výskyt virových patogenů na tykvovitě zelenině. Z celkových 152 testovaných rostlin bylo 147 rostlin pozitivních aspoň na jeden z testovaných virů, podíl pozitivních vzorků tedy celkově činil 96,71 %. Tyto rostliny se vyznačovaly výraznými symptomy napadení virovým patogenem, jako jsou listové mozaiky, chloróza listů nebo pouze výskyt chlorotických skvrn, deformace plodů a listů. Ze zmíněných virových patogenů byl v testovaném rostlinném materiálu přítomný pouze ZYMV, WMV a CMV. Oproti výsledkům testování tykvovitě zeleniny z let 2019 a 2020 nebyla v roce 2022 zaznamenána v rostlinném materiálu přítomnost CABYV a SqMV (Katedra ochrany rostliny ČZU 2019; Kraus 2021).

Svoboda & Polák (2007) dále uvádějí že žlutá mozaika cukety je nejzávažnější virovou chorobou tykvovitě zeleniny pěstované v České republice, jež způsobuje nemalé ztráty na výnosech a snižuje tržní jakost plodů boulovitostí. Námi provedený monitoring potvrdil nejvyšší výskyt ZYMV mezi námi testovanými viry u tykvovitě zeleniny. U ZYMV byl zaznamenán výskyt u 88,81 % testovaných vzorků. Dále byl také zaznamenán velmi vysoký výskyt WMV a to u 87,50 %. Oba viry se ve většině testovaných vzorků vyskytovaly ve směsné infekci, což by mohlo být způsobeno především vysokým výskytem obou virů u testovaných rostlin, naopak nízkým výskytem CMV a také absencí CABYV a SqMV.

Za účelem potvrzení častého společného výskytu těchto dvou virů bylo provedeno statistické šetření pomocí jednofaktorové analýzy rozptylů, kde byly výsledky testování

tykvovité zeleniny před předkládané v rámci této práce porovnány s výsledky testování tykvovité zeleniny na katedře ochrany rostlin ČZU z roku 2019 a výsledky, jež byly zpracovány v rámci mé bakalářské práce v roce 2020. Detailní vyhodnocení pomocí Fisherova LSD testu ukázalo statisticky významný rozdíl ve zvýšeném společném výskytu WMV-ZYMV oproti společnému výskytu WMV-CABYV, WMV-SqMV, ZYMV-CABYV, ZYMV-SqMV, CMV-CABYV, CMV-SqMV a CABYV-SqMV. Statisticky dokázaný zvýšený společný výskyt je zapříčiněn jejich fylogenetickou příbuzností, neboť oba viry patří do rodu *Potyvirus*. Oba viry sdílí řadu vlastností a zejména způsob neperzistentního přenosu a dále mezi hlavní vektory obou virů patří mšice broskvoňová (*Myzus persicae*), mšice bavlníková (*Aphis gossypii*) a kyjatka zahradní (*Macrosiphum euphorbiae*) (Castle *et al.* 1992).

7 Závěr

První část předkládané diplomové práce byla věnována monitoringu virů, které jsou původci choroby virového žloutnutí řepy. V námi provedeném monitoringu porostů cukrové řepy na území České republiky se potvrdil výskyt BYV a také přítomnost zástupců z rodu *Polerovirus*. Z nich dále byla u části testovaných vzorků potvrzena přítomnost BChV pomocí metody RT-PCR. Přítomnost BMYV nebyla v žádném vzorku nalezena. Dále se ukázalo že pro praktické testování cukrové řepy v porostech je vhodnější odebírat mladší listy, i když jsou bez příznaků, protože je u nich prokázání infekce spolehlivější.

Druhá část předkládané diplomové práce byla věnována monitoringu ekonomicky významných virů na tykvovité zelenině, kde se předpokládal velký výskyt virových chorob u monitorovaných rostlin. Z pěti testovaných virových patogenů byl v testovaném rostlinném materiálu přítomný pouze ZYMV, WMV a v menší míře i CMV. Dále byla potvrzena druhá část hypotézy o významnosti ZYMV a WMV v České republice. Oba tyto viry dosahovaly v našem monitoringu velmi vysokých výskytů, a při statistickém porovnání s dostupnými daty testování tykvovité zeleniny z let 2019 a 2020 i jejich výrazný vzájemný výskyt.

Cíl, který si kladla tato práce, lze považovat za splněný, jelikož byl uskutečněn monitoring výskytu virových chorob u tykvovité zeleniny a cukrové řepy. Celkem bylo testováno 219 rostlin pocházejících z 24 lokalit na přítomnost 8 druhů virů.

8 Literatura

8.1 Literární informační zdroje

- Agrios GN. 2005. Plant Pathology, fifth edition. Academic Press, San Diego.
- Alonso-Prados JL, Fraile A, García-Arenal F. 1997. Impact of cucumber mosaic virus and watermelon mosaic virus 2 infection on melon production in central Spain. *Journal of Plant Pathology* **79(2)**:131–134.
- Astier S, Albouy J, Maury Y, Robaglia C, Lecoq H, 2001 Principles of plant virology: genome, pathogenicity, virus ecology. Science publishers, Enfield.
- Bennett CW. 1944. Latent virus of Dodder and its effect on Sugar Beet and other plants. *Phytopathology* **34**:77-91.
- Bittner V. 2012. Poruchy ve výživě cukrovky: Škodliví činitelé cukrové řepy – abiotická poškození. *Listy cukrovarnické a řepařské* **128**:56-59.
- Bittner V, Běhal R. 2018. Škodlivé organismy cukrovky, abiotikózy, choroby, škůdci, plevele. MARIBOHILESHÖG ApS, Slavkov.
- Burchett S, Burchett S. 2017. Plant Pathology. Garland Science, Taylor & Francis Group, New York.
- Caciagli P. 2008. Encyclopedia of Virology, third edition. Academic Press, Cambridge.
- Castle SJ, Perring TM, Farrar CA, Kishaba AN. 1992. Field and Laboratory Transmission of Watermelon Mosaic Virus 2 and Zucchini Yellow Mosaic Virus by Various Aphid Species. *Phytopathology* **82**:235-240.
- Clark MF, Adams AN. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *The Journal of General Virology* **34**:475-483.
- Desbiez C, Lecoq H. 1997. Zucchini yellow mosaic virus. *Plant Pathology* **46**:809-829.
- Dolja VV. 2003 Beet yellows virus: the importance of being different. *Molecular Plant Pathology* **4(2)**:91-98.
- Froissart R, Michalakakis Y, Blanc S. 2002. Helper component-transcomplementation in the vector transmission of plant viruses. *Phytopathology* **6**:576-9
- Gal-on A. 2007. Zucchini yellow mosaic virus: insect transmission and pathogenicity — the tails of two proteins. *Molecular Plant Pathology* **8**:139-150.
- Hejný S, Slavík B. 2003. *Květena České republiky*. 2. vyd. Academia, Praha.
- Hlava B, Táborský V, Valíček P. 1998. *Tropické a subtropické zeleniny: pěstování a využití*. Brázda, Praha.
- Hull R, 2001. *Matthews' Plant Virology*. Academic Press, San Diego.
- Chochola J. 2010. *Průvodce pěstováním cukrové řepy*. Řepařský institut Semčice, Semčice.
- Chochola J. 2021. Proč bojujeme za neonikotinoidy. *Listy cukrovarnické a řepařské* **137**:5-6.
- Jarošová J, Kumar J. 2018. Metodika detekce tří obilných virů (BYDV, WDV, WSMV) pomocí Multiplex TaqMan RT-qPCR. Výzkumný ústav rostlinné výroby, Praha.
- Kazda J, 2003. *Choroby a škůdci polních plodin, ovoce a zeleniny*, 3., dopl. vyd. Zemědělec, Praha.
- Kazda J. 2014. *Škůdci polních plodin*. Profi Press, Praha.

- Khan JA, Dijkstra J. 2006. Handbook of Plant Virology. Food Products Press, Binghamton.
- Knipe DM, Howley PM, Fields BN. 2007. Fields Virology, 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Kraus D. 2021. Výskyt virů v obilninách, zelenině a cukrové řepě [BSc. Thesis]. Czech University of Life Sciences Prague, Prague.
- Laney, AG, Avanzato MV, Tzanetakis IE. 2012 High incidence of seed transmission of *Papaya ringspot virus* and *Watermelon mosaic virus*, two viruses newly identified in *Robinia pseudoacacia*. European Journal of Plant Pathology **134**:227–230.
- Lecoq H, Bourdin D, Wipf-Scheibel C, Bon M, Lot H, Lemaire O, Herrbach E, 1992. A new yellowing of cucurbits caused by luteovirus, a cucurbit aphid carried by yellow viruses. Plant Pathology **41(6)**:749-761.
- Lecoq H, Desbiez C. 2017. Cucurbit aphid-borne yellow. In Compendium of cucurbit diseases and pests, second edition, [ed. by Keinath, A.P., Wintermantel, W.M., Zitter, T.A.]. St Paul, MN, USA: American Phytopathological Society 121-122.
- Lecoq H, Fabre F, Joannon B, Wipf-Scheibel C, Chandeysson C, Schoeny A, Desbiez C. 2011. Search for factors involved in the rapid shift in Watermelon mosaic virus (WMV) populations in South-eastern France. Virus Research **159(2)**:115-123.
- Lennefors BL 2021 Virus Yellows of Sugar Beet – What's New. MariboHillesög Research AB, Švédsko.
- Lewellen RT, Wisler GC, Liu HY, Kaffka SR, Sears JL, Duffus JE. 1999. Reaction of sugar beet breeding lines and hybrids to Beet chlorosis luteovirus. Journal of Sugar Beet Research **36**:76
- Lhotský J. 2015. Úvod do studia symbiotických interakcí mikroorganismů. Nový pohled na viry a bakterie. Academia, Praha.
- Mackay LM, Arden KE, Nitsche A. 2002. Real-time PCR in virology. Nucleic Acids Research **6**:1292–1305.
- Mahy BWJ, Regenmortel MHV. 2008. Encyclopedia of Virology. third edition. Elsevier, Amsterdam.
- Müller C, Bröther H, von Barga S. *et al.* 2006. Zucchini yellow mosaic virus — incidence and sources of virus infection in field-grown cucumbers and pumpkins in the Spreewald, Germany. Journal of Plant Diseases and Protection **113**:252–258.
- Navrátil M. 2011. Základy virologie: obecná virologie. Univerzita Palackého, Olomouc.
- Nelson MR, Knuhtsen HK. 1977. Squash mosaic virus Variability: Review and Serological Comparisons of six biotypes. Phytopathology **63**:920-926.
- Palukaitis P, Roossinck MJ, Dietzgen RG, Francki RB. 1992. Advances in Virus Research. Elsevier, Amsterdam.
- Palukaitis P, Haudenschild JS. 1998. Diversity among isolates of squash mosaic virus. Journal of General Virology **79(10)**:2331-2341.
- Petříková K, Hlušek J. 2012. Zelenina: pěstování, výživa, ochrana a ekonomika. Profi Press, Praha.
- Petříková K. 2006. Zelenina: pěstování, ekonomikagro manu Profi Press, Praha.
- Prokinová E. 2014. Choroby polních plodin. Profi Press, Praha.
- Pulkrábek J, Urban J, Bečková L, Valenta J. 2007. Řepa cukrová cukrová pěstitelský rádce. Kurent, Praha.

- Regenmortel MHV, Mahy BWJ. 2010. Desk Encyclopedia of Plant and Fungal Virology. Academic Press, San Diego.
- Roland G. 1936. Researches sur la jaunisse de la betterave et quelques observations sur la mosaïque de cette plant. *Sucr. Belge* **55**:213-217.
- Rosypal S, Doškař J, Petrzik K, Růžičková V. 2002. Úvod do molekulární biologie IV. Molekulární biologie rostlinných virů. Priony, Molekulární evoluce, Vznik života, Metody molekulární biologie, Genové inženýrství. Třetí inovované vydání. Grafex, Brno.
- Smith HG, Hallsworth PB. 1990. The effects of yellowing viruses on yield of sugar beet in field trials, 1985 and 1987. *Annals of Applied Biology* **116**:503-511.
- Soudní dvůr Evropské unie. 2023. Rozsudek soudního dvora, 19. ledna 2023, Ve věci C-162/21. Lucemburk.
- Stevens M, Freeman B, Liu HY, Herrbach E, Lemaire O. 2005. Beet poleroviruses: close friends or distant relatives? *Molecular Plant Pathology* **6**:1-9.
- Svoboda J, Leisova-Svobodova L, Lecoq H. 2011. First Report of Cucurbit aphid-borne yellows virus in Squash in the Czech Republic. *Plant Disease* **95(2)**:220-220.
- Svoboda J, Leisova-Svobodova L. 2011. First Report of Squash Mosaic Virus in Ornamental Pumpkin in the Czech Republic. *Plant Disease* **95(10)**:1321-1321.
- Svoboda J, Polák J. 2007. Metodika komplexní ochrany tykvovitě zeleniny proti viru žluté mozaiky cukety – Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV). Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha.
- Svoboda J. 2011. Pathogenic viruses on cucurbitaceous vegetables and their spread in the Czech. *Acta Horticulturae* **917**:309-315
- Štamberková J. 2012 Ochrana zahradních rostlin I: symptomatologie, diagnostika, způsoby ochrany rostlin, škodliví činitelé, herbologie. Vyšší odborná škola zahradnická a Střední zahradnická škola ve spolupráci s nakl. Rebo, Mělník.
- Van Schreven DA. 1936. De vergelingsziekte bi de biet en haar oorzaak. *Meded. Inst. Suikerbiet*. **6**:1-36.
- Vidic J, *et al.* 2023. Present Knowledge in Food Safety. Elsevier, Amsterdam.
- Watson M. A. 1940. Studies on the transmission of sugar-beet yellows virus by the aphid, *Myzus persicae* (Sulz.). *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*. **128**:535–552.
- Webb RE, Scott HA. 1965. Isolation and identification of watermelon mosaic viruses I and 2. *Phytopathology* **55**:895-900.
- Wetzel V, Brault V, Varrelmann M. 2018. Production of a Beet chlorosis virus full-length cDNA clone by means of Gibson assembly and analysis of biological properties. *J Gen Virol. Journal of General Virology* **99(11)**: 1522-1527
- Wisler G, Pitrat M, Lecoq H. 1998. Cucurbit Viruses: The Classics and the Emerging. National Research Institute for Agriculture, Domaine Saint Maurice.

8.2 Elektronické informační zdroje

- Adams MJ, Antoniw JF. 2005. DPVweb: An open access internet resource on plant viruses and virus diseases. *Outlooks on Pest Management*. Available from <https://www.dpvweb.net> (accessed December 2022).
- Agranovsky AA, Koonin EV, Boyko VP, Maiss E, Frotschl R, Lunina NA, Atabekov JG. 2006. Beet yellows virus (isolate Ukrainian BYV-U) complete genome. NCBI. Available from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/X73476> (accessed December 2022).
- Agromanuál. 2022. Přípravky. Kurent.s.r.o. České Budějovice. Available from <https://www.agromanual.cz/cz/pripravky> (accessed November 2022)
- Akademie věd České republiky. 2021. Rostlinné viry reálná nebezpečí i biotechnologický potenciál rozvoje. Akademie věd České republiky. Praha. Available from <https://www.avcr.cz/export/sites/avcr.cz/cs/veda-a-vyzkum/avex/files/2021-02.pdf> (accessed November 2022).
- Beet yellows virus (beet yellows). PlantwisePlus Knowledge Bank [online]. 2022, Species Pages [cit. 2023-03-24]. ISSN 2958-4329. Dostupné z: [doi:10.1079/pwkb.species.10262](https://doi.org/10.1079/pwkb.species.10262) (accessed December 2022).
- BIO-RAD. 2022. CFX Opus Real-Time PCR Systems. Bio-Rad Laboratories. Available from <https://www.bio-rad.com/en-cz/product/cfx-opus-real-time-pcr-systems?ID=QBJBMKRT8IG9> (accessed December 2022).
- Desbiez C, Lecoq H. 2004. Watermelon mosaic virus strain WMV-Fr, complete genome. NCBI. Available from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/AY437609> (accessed December 2022).
- FAO. 2022. FAOSTAT: statistics. FAO, Rome. Available from <http://faostat.fao.org/> (accessed October 2022).
- Guilley H, Richards KE, Jonard G. 2018. Beet mild yellowing virus, complete genome. NCBI. Available from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NC_003491.1 (accessed December 2022).
- Hauser S, Stevens M, Beuve M, Lemaire O. 2018. Beet chlorosis virus, complete genome. NCBI. Available from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NC_002766.1 (accessed December 2022).
- INRAE. 2021. Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV). EPHYTIA, Bourlaux. Available from <https://ephytia.inra.fr/en/C/7701/Melon-Zucchini-yellow-mosaic-virus-ZYMV> (accessed December 2022).
- International Committee on Taxonomy of Viruses. 2021. Current ICTV Taxonomi Release. ICTV. Available from <https://ictv.global/taxonomy> (accessed December 2022).
- Lecoq H, Desbiez C, Schoeny A. 2022. Cucurbit aphid-borne yellows virus (Cucurbit aphid-borne yellows). CABI Compendium. Available from <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/10.1079/cabicompendium.110067> (accessed November 2022).
- Li R, Gao S, Berendsen S, Fei Z, Ling KS. 2015. Squash mosaic virus segment, complete sequence. NCBI. Available from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/KP223323.1> (accessed December 2022).

- Lin SS, Hou RF, Yeh SD. 2001. Zucchini yellow mosaic virus isolate TW-TN3 complete genome. NCBI. Available from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AF127929> (accessed December 2022).
- Ministerstvo zemědělství ČR. 2022. Eagri.cz, situační a výhledová zpráva zelenina. Ministerstvo zemědělství, Praha. Available from https://eagri.cz/public/web/file/715205/Zelenina_2022_web.pdf (accessed November 2022).
- Ministerstvo zemědělství ČR. 2023. Eagri.cz. Ministerstvo zemědělství, Praha. Available from <https://eagri.cz/public/web/file/717057/CzechsugarstatisticsCZ13012023.pdf> (accessed January 2023).
- Rabadan MP, Juarez GM, Gomez LP. 2023. Cucurbit aphid-borne yellows virus complete genome. NCBI. Available from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/OM948857.1> (accessed January 2023).
- Suzuki M, Yokotsuka H, Matsumoto T, Kosaka Y, Okuda S, Natsuaki T. 2011. Cucumber mosaic virus segment, complete sequence, isolate: Fuka4-4. NCBI. Available from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AB188231.1> (accessed December 2022).
- Víchová J. 2021. Choroby řepy: Virové choroby řepy. Kurent s.r.o. České Budějovice. Available from <https://www.agromanual.cz/cz/clanky/ochrana-rostlin-a-pestovani/choroby/choroby-repy-1-virove-choroby-repy-i> (accessed November 2022).
- Zitter TA, Murphy JF. 2009. Cucumber mosaic virus. The American Phytopathological Society. Available from <https://www.apsnet.org/edcenter/disandpath/viral/pdlessons/Pages/Cucumbermosaic.aspx> (accessed January 2023).

