

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra ochrany rostlin



**Studium hostitelského okruhu vlnovníka hrušňového a
přenosu viru kroužkovitosti jeřábu**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Michaela Marenčáková

Vedoucí práce: Ing. Lenka Grimová, Ph.D.

© 2014 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Studium hostitelského okruhu vlnovníka hrušňového a přenosu viru kroužkovitosti jeřábu" jsem vypracovala 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 autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 11. 4. 2014

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala zejména vedoucí mé diplomové práce Ing. Lence Grimové, Ph.D. za trpělivé a odborné vedení, poskytnuté rady a připomínky. Dále mé poděkování patří prof. Ing. Pavlu Ryšánkovi, CSc. a RNDr. Janu Kabíčkovi, CSc. za ochotnou pomoc a velmi praktické rady při práci s roztoči.

Studium hostitelského okruhu vlnovníka hrušňového a přenosu viru kroužkovitosti jeřábu

Souhrn

Přítomnost viru kroužkovitosti jeřábu (*European mountain ash ringspot-associated virus* - EMARaV) na volně rostoucích rostlinách jeřábu ptačího byla do dnešního dne potvrzena nejen v České republice, ale i v řadě zemí severní Evropy. Jelikož jsou informace o biologických vlastnostech EMARaV velmi strohé, byla předmětem předkládané diplomové práce studie hostitelského okruhu tohoto fytopatogena a studie jeho možného přenosu pomocí vektora vlnovníka hrušňového (*Eriophyes pyri*, syn. *Phytoptus pyri*).

První část práce, zaměřená na hostitelský okruh EMARaV, volně navázala na pokus založený na katedře ochrany rostlin již v roce 2011. Jako biologický materiál bylo použito celkem 17 rostlinných druhů z podčeledi *Maloideae*, které byly naočkovány rostlinným materiálem získaným z přirozeně rostoucího jeřábu ptačího infikovaného EMARaV. Po dvou letech byla v rámci této diplomové práce provedena na naočkovaných rostlinách detekce EMARaV pomocí molekulárně genetických metod. Z rostlinných vzorků byla izolována celková RNA pomocí částečně modifikované „silika“ metody dle Rott a Jelkmann (2001) s přidáním fenolu a chloroformu. Tato extrakční metoda byla na základě předchozího testování pěti různých izolačních technik vybrána jako nejvhodnější pro izolaci nukleové kyseliny z dřevin. Vzorky byly následně podrobeny reverzní transkripci a polymerázové řetězové reakci (RT-PCR). Výsledky detekce potvrdily rozšíření hostitelského okruhu EMARaV o dalších 17 druhů rostlin z čeledi *Rosaceae* (*Sorbus* spp., *Amelanchier* spp., *Aronia* spp., *Pyrus* spp., *Malus* spp., *Crataegus* spp. a *Sorbaronia* spp.).

V rámci testů zaměřených na studii přenosu EMARaV pomocí vektoru byli z hálek virem napadených listů jeřábu ptačího (*Sorbus aucuparia*) a zdravé jabloně (*Malus* spp.) odebíráni roztoči a následně přenášeni na zdravé listy stromů jeřábů s předpokladem, že se na novém hostiteli adaptují a virus získaný z předchozího zdroje potravy na něj přenesou. Jelikož byl přenos roztočů na rostliny nám z neznámých důvodů opakovaně neúspěšný, přenos virového patogena nebyl potvrzen.

Klíčová slova: virus kroužkovitosti jeřábu, jeřáb ptačí, přenos viru, vlnovník hrušňový.

Host range of *Phytoptus pyri* and transmission of the *European mountain ash ringspot-associated virus*

Summary

To date, the presence of *European mountain ash ringspot-associated virus* (EMARaV) on European mountain ash has been confirmed not only in the Czech Republic, but also in several countries of Northern Europe. Since there is not much information about the biological properties of EMARaV, the subject of this thesis was the study of the host range of this phytopathogen and the study of its possible transmission by *Eriophyes pyri*.

The first part of my work focused on the host range of EMARaV loosely follows a previous experiment carried out at the Department of Crop Protection in 2011. A total of 17 plant species from the *Maloideae* subfamily were inoculated with plant material gathered from wild mountain ash infected with EMARaV. After two years, as part of this thesis, EMARaV detection was carried out on the inoculated plants using molecular genetic methods. Complete RNA was isolated from the specimens using partially modified 'silica' method by Rott and Jelkmann (2001) with added fenol and chloroform. This extraction method was selected as the most appropriate for isolating nucleic acid from woody plants on the basis of previous testing of five techniques. The samples were then subjected to reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The results confirmed the widening of the host range by 17 plant species from the *Rosaceae* family (*Sorbus* spp., *Amelanchier* spp., *Aronia* spp., *Pyrus* spp., *Malus* spp., *Crataegus* spp. and *Sorbaronia* spp.).

Mites were gathered from infected leaves of mountain ash (*Sorbus aucuparia*) and healthy apple trees (*Malus* spp.) as part of the tests focused on studying the transmission of EMARaV by vector. The mites were then transmitted on healthy leaves of mountain ash with the assumption that they will adapt to the new host and transmit the virus derived from the previous source of food. As the transfer of mites onto plants was, for unknown reasons, unsuccessful, the transmission of the virus pathogen was not confirmed.

Keywords: *European mountain ash ringspot-associated virus*, European mountain ash, virus transmission, *Eriophyes pyri*.

OBSAH

1	Úvod	8
2	Vědecká hypotéza a cíle práce	9
3	Literární rešerše.....	10
3.1	Rostlinné viry.....	10
3.1.1	Morfologie a struktura	10
3.1.2	Klasifikace a názvosloví	11
3.1.3	Hostitelský okruh	11
3.1.4	Symptomy	11
3.1.5	Životní cyklus	12
3.1.6	Diagnostické metody rostlinných virů	17
3.1.7	Význam rostlinných virů	22
3.2	Virus kroužkovitosti jeřábu	23
3.2.1	Jeřáb ptačí (<i>Sorbus aucuparia</i>)	24
3.2.2	Symptomy spojované s přítomností EMARaV	24
3.2.3	Přenos EMARaV	25
3.2.4	Detekce EMARaV	26
3.3	Vektoři virů z čeledi vlnovníkovití (<i>Eriophyidae</i>).....	27
3.3.1	Čeleď Vlnovníkovití - <i>Eriophyidae</i>	27
3.3.2	Přenos rostlinných virů roztoči	28
3.3.3	Vybrané rostlinné viry přenášené roztoči	30
4	Materiál a metody	33
4.1	Hostitelský okruh EMARaV	33
4.2	Detekce EMARaV pomocí RT-PCR.....	33
4.2.1	Optimalizace diagnostické metody RT-PCR pro detekci EMARaV	33
4.2.2	Vlastní detekce EMARaV	41
4.3	Studie symptomů EMARaV	42
4.4	Přenos vlnovníka hrušňového (<i>Eriophyes pyri</i>) na rostliny	43
4.4.1	Zdroj a odběr roztočů.....	43
4.4.2	Přenos roztočů na zdravé listy	44
4.4.3	Příprava preparátu vlnovníka hrušňového pro elektronovou mikroskopii	44
5	Výsledky.....	45
5.1	Hostitelský okruh	45
5.1.1	Symptomy EMARaV	50
5.2	Vyhodnocení izolačních metod RNA	53
5.2.1	Stanovení čistoty a koncentrace RNA	53
5.2.2	Stanovení integrity celkové RNA	54
5.3	Přenos vlnovníka hrušňového	55

5.3.1	Přenos roztočů na zdravé listy	55
5.3.2	Elektronová mikroskopie vlnovníka hrušňového (<i>Eriophyes pyri</i>).....	56
6	Diskuse	57
6.1	Hostitelský okruh EMARaV	57
6.2	Metody izolace RNA	59
6.3	Vlnovník hrušňový jako potenciální vektor EMARaV	60
6.4	Přenos vlnovníka hrušňového (<i>Eriophyes pyri</i>, syn. <i>Phytoptus pyri</i>).....	61
7	Závěr	62
8	Seznam použité literatury	63
9	Seznam použitých zkratek	72

1 Úvod

Jeřáb ptačí (*Sorbus aucuparia*) z čeledi *Rosaceae* tvoří v našich podmínkách běžnou součást lesních ekosystémů. Hojněji se vyskytuje v chladnějších oblastech s vyššími srážkami. Patří mezi nenáročné, rychle rostoucí dřeviny s intenzivním rozvojem kořenové soustavy, dokáže růst i na těžce degradované půdě a velmi dobře snáší znečištěné ovzduší. Z těchto důvodů je velmi často využíván pro rychlé zalesnění větších ploch, nebo v oblastech, které jsou ohrožovány erozí či kontaminací (např. podél komunikací). Pro své dekorativní červené plody je rovněž součástí kompozic mnoha okrasných zahrad a parků. Jeřáb je ve volné přírodě rovněž nezbytnou dřevinou pro mnoho druhů ptáků, kteří se živí jeho plody. Používá se i jako podnož pro další druhy jeřábů.

Zdravotní stav mnoha stromů jeřábů především v alejích a parcích je v poslední době alarmující. Tyto problémy jsou zřejmě způsobeny komplexem hub napadajících bázi kmene stromu, obecně však je tento problém málo prozkoumaný. Velmi často můžeme také na listech jeřábu pozorovat specifické virové symptomy v podobě kroužkovitosti, skvrnitosti či obecné mozaiky, velmi pravděpodobně vyvolané virem kroužkovitosti jeřábu (*European mountain ash ringspot-associated virus* – EMARaV), tedy zástupcem nedávno vzniklého rodu *Emaravirus*. Tento rostlinný virus napadá jeřáb ptačí v mnoha zemích (Finsko, Německo, Česká republika, Polsko, Rusko atd.). Do nedávné doby byl jako jediný známý hostitel tohoto patogena popsán jeřáb ptačí. Na základě diplomové práce Michala Konradyho zpracované v roce 2013 na katedře ochrany rostlin ČZU, byla hostitelská skupina EMARaV rozšířena o několik nových zástupců z podčeledi *Maloideae*, avšak řada možných hostitelských druhů z čeledi *Rosaceae* zůstala neprokázána. Přenos EMARaV v přírodě nebyl do dnešní doby zcela objasněn. Předpokládaným vektorem původce onemocnění kroužkovitosti jeřábu je roztoč vlnovník hrušňový (*Phytoptus pyri*, syn. *Eriophyes pyri*) z čeledi vlnovníkovití (*Eriophyidae*), jehož hálky bývají na infikovaných listech výše uvedeným virem často přítomné.

Jelikož jsou informace o biologických vlastnostech EMARaV pro rostlinolékařskou praxi zcela nedostačující, byla předmětem předkládané diplomové práce podrobná studie hostitelského okruhu tohoto fytopatogena a studie jeho možného přenosu pomocí vektoru vlnovníka hrušňového.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Vědeckou hypotézou předkládané diplomové práce byl předpoklad, že virus kroužkovitosti jeřábu (*European mountain ash ringspot-associated virus* - EMARaV) má široký hostitelský okruh. Druhou hypotézou byla domněnka, že EMARaV je přenášen vlnovníkem hrušňovým (*Eriophyes pyri*, syn. *Phytoptus pyri*), tedy rozotočem, který je schopen napadat a množit se i na dalších družích podčeledi *Maloideae*.

Hlavním cílem diplomové práce bylo tedy prokázat, že hostitelský okruh EMARaV není omezen pouze na jeřáb ptačí (*Sorbus aucuparia*), ale zahrnuje i další druhy rostlin z čeledi *Rosaceae*. Druhým, neméně významným cílem, bylo prokázání přenosu EMARaV pomocí vektoru vlnovníka hrušňového na zdravé rostliny z podčeledi *Maloideae*.

3 Literární rešerše

3.1 Rostlinné viry

Rostlinné viry jsou klasifikovány jako jednoduché nebuněčné organismy. Jejich existence je závislá na hostitelské buňce. Bez hostitele viry nejsou schopny vlastního metabolismu, dráždivosti ani autoreprodukce. Prostřednictvím hostitelské buňky je vir schopen rozmnožování, získává schopnost dědičného předávání znaků, schopnost vývoje a evoluce (Rosypal, 1994). Viry jsou tedy řazeny mezi obligátní parazity, kteří jsou schopni reprodukce pouze ve vhodném intracelulárním prostředí, ve kterém je jejich množení závislé na systémech hostitele dodávajících energii (Brčák, 1971).

3.1.1 Morfologie a struktura

Částice rostlinných virů se svou stavbou zásadně liší od jednobuněčných organismů (Brčák, 1971). Skládají se z řetězce jedné či více molekul nukleové kyseliny. Tento řetězec je zpravidla uzavřen v ochranném proteinovém či vzácněji ještě lipoproteinovém plášti (Matthews, 1991).

Na základě druhu jejich nukleové kyseliny, která je nositelkou jejich genetické informace, rozlišujeme viry obsahující deoxyribonukleovou kyselinu (DNA) či ribonukleovou kyselinu (RNA). Nukleové kyseliny mohou být dvouvláknenné (double-stranded, ds) nebo jednovláknenné (single-stranded, ss) v podobě lineární či kruhové molekuly (Špak, 2007). Základem většiny rostlinných virů je jednovláknenná ribonukleová kyselina (ssRNA). Nukleová kyselina virů vždy kóduje nejméně jeden, ve většině případů i více proteinů, které mají různé funkce (obalový protein, RNA či DNA polymeráza, proteáza, tzv. movement protein či helper factor) (Kazda *et al.*, 2011).

Samotná virová částice se nazývá virion a jeho proteinová složka je označována jako kapsida, jež je morfologicky rozlišitelná jednotkami tzv. kapsomerami (Brčák, 1971). Virion se může vyskytovat i mimo hostitelskou buňku v neživém prostředí a jeho schopností je infekce nové buňky. Úkolem kapsidy je ochrana nukleové kyseliny a spolu s ní dohromady tvoří tzv. nukleokapsid. Pokud není kapsida kryta dalším vnějším obalem, určuje tvar virionu (Berger, 1996). Nejběžnější tvary virových částic jsou tyčinkovité (s rozměry 18 x 60 – 500 nm), vláknité (12 x 500 – 2000 nm) a izometrické (28 nm). Vyskytovat se mohou i viriony

zcela jiných tvarů, jako jsou například viriony geminivirů, jejichž částice je složena z dvou částí nebo viriony rhabdovirů s částicemi kulovitého tvaru (Kazda *et al.*, 2011).

3.1.2 Klasifikace a názvosloví

Mezinárodní komise pro taxonomii virů (ICTV) uveřejnila r. 1979 klasifikaci virů, vycházející zejména z charakteristik virových částic (způsob přenosu, tvar částic, sérologické vlastnosti, vlastnosti nukleové kyseliny atd.) (Kůdela *et al.*, 1989). Taxonomie virů se ovšem stále rozvíjí a to zejména s rozvojem molekulárních metod, díky nimž je v současné době možné určit jejich vzájemnou příbuznost (Kazda *et al.*, 2011).

Názvy virů a virových chorob většinou vycházejí z příznaků viditelných na nadzemních částech rostliny a obvykle nemívají nic společného s jeho původem. Příkladem je virus mozaiky okurky (*Cucumber mosaic virus* – CMV), který napadá rostliny okurky, ale v přírodě se udržuje na jiných rostlinách, v nichž přezimuje. Mezinárodní názvosloví využívá převážně anglických názvů virů (Kůdela *et al.*, 1989).

3.1.3 Hostitelský okruh

Je známo, že hostiteli rostlinných virů mohou být řasy, lišejníky, kaprad'orosty, nahosemenné i krytosemenné rostliny (Matthews, 1981). Viry krytosemenných rostlin lze rozdělit podle jejich hostitelského okruhu na monofágy, oligofágy a polyfágy. V souvislosti s hostitelským spektrem jsou rostliny rozdělovány na virofilní (např. *Chenopodiaceae*) a virofobní (např. *Helianthemum chanaecistus*). Mnohé z nich mají význam jako indikátorové rostliny (Kůdela *et al.*, 1989).

3.1.4 Symptomy

V průběhu století bylo popsáno mnoho virových onemocnění rostlin. V závislosti na vlastnostech viru a zároveň na genetické výbavě hostitele, se mohou příznaky onemocnění různě projevovat (Khan a Dijkstra, 2006). Virová infekce se může na rostlině projevit viditelnou změnou zevně na jejich orgánech, změnou anatomickou či patofyziologickou (Kůdela *et al.*, 1989).

3.1.5 Životní cyklus

Pro viry je charakteristický obligátní endoparazitismus v rostlinných buňkách a pletivech. Určité viry mají své specifické fyzikální a chemické vlastnosti, kterými se odlišují od jiných druhů virů. Viriony daného viru však mohou podléhat změnám, jež jsou řízeny nejrůznějšími genetickými mechanismy, které podmiňují rozsah variability příslušného viru. Nejčastěji dochází ke změnám virulence (patogenitě), která se projevuje ve schopnosti infikovat rostliny téhož hostitelského druhu, ale odlišného genotypu rezistence, nebo ve schopnosti vyvolávat jiný projev příznaků napadení (Kúdela *et al.*, 1989).

3.1.5.1 Infekční fáze rostlinných virů

Virové částice se dostávají do rostlinného organismu pasivně. Často dochází k proniknutí viru do rostliny přes poranění, prostřednictvím přenašečů, pylem, semeny nebo rouby (Neergaard, 1979). Pro vznik infekce musí být v inokulu částice se všemi úseky nukleové kyseliny (Kazda *et al.*, 2011).

Virové částice velmi často pronikají do systému rostliny a mohou se replikovat v jejich různých částech. Při systémové infekci může být vir zastoupen v rostlině v přibližně stejné koncentraci. Další možnost systémové infekce nastává, když je virus kumulován v určitém orgánu rostliny, kde se intenzivně replikuje a v ostatních částech rostliny je zastoupen pouze v nízké koncentraci (Neergaard, 1979).

Po navázání parazitického vztahu mezi virem a hostitelem dochází ke kolonizaci hostitelského pletiva patogenem (Fröhlich *et al.*, 1979), které lze rozdělit na lokální a systémovou kolonizaci (Kúdela *et al.*, 1989). Lokální kolonizace je prostorově omezená kolonizace hostitelského pletiva, která se většinou projevuje pouze lokálním poškozením v podobě nekrotických či chlorotických skvrnitostí. Léze se mohou rozrůstat po celém listu, který pak odpadne a virus se již dále nešíří. U systémové kolonizace se virus šíří po celé rostlině, ale symptomy onemocnění se nemusí projevit na všech částech rostliny (Tarr, 1972). Při systémové kolonizaci se virus šíří většinou floémem (Matthews, 1981).

3.1.5.2 Replikace rostlinných virů

Virové částice po vstupu do buňky využívají buněčného aparátu k expresi svých genů, k replikaci svých genomů a k vlastnímu zabalení do nově vytvořených ochranných obalů. Samotná reprodukce viru může být pro buňky letální. Může docházet k lézi buněk a k následnému uvolnění virového potomstva, které pak napadá okolní buňky (Alberts, 2006).

Proces replikace lze rozdělit do těchto fází:

- vazba virionu na povrch buňky
- penetrace do buňky
- dekapsidace – uvolnění nukleové kyseliny z kapsidu do buňky
- replikace virové nukleové kyseliny
- syntéza strukturálních a nestrukturálních proteinů
- skládání částic, zrání virionů
- uvolnění virionů z buňky

(Berger, 1996).

Podstata vzniku nemoci závisí ve spotřebě substrátu a energetického poolu hostitelské buňky na tvorbu virové RNA. Opakovaný cyklus replikace viru vede k postupnému vyhladovění buňky. Nové virové částice mohou zůstat a akumulovat se v buněčných organelách, vakuolách nebo v cytoplazmě. Pohyb virových částic v hostiteli může být na krátké vzdálenosti z buňky do buňky prostřednictvím plazmodezmů či na dlouhé vzdálenosti floémem a xylémem (Manion, 1981).

3.1.5.3 Přenos a šíření rostlinných virů

Rostlinné viry jsou přenášeny pasivně. Šíří se reprodukčním materiálem např.: semeny, řízků, sadbovým materiálem, očkem, pylem apod. Dále je možný přenos přes živočišné a houbové vektory. Mykochorie je známa například u druhu *Olpidium brassicae*, kde virus přežívá ve sporangíích, ze kterých se následně uvolňují infikované zoospory. Tímto způsobem se přenáší např. virus žilkovistosti salátu (*Lettuce big vein virus* - LBVV) (Kúdela *et al.*, 1989). Zoochorie, přenos živočišnými vektory, je velmi častým způsobem šíření. Vektory mohou být hád'átka nebo členovci (zejména *Homoptera*) (Brčák 1971; Harris a Maramorosch, 1981; Stakman a Harrar, 1967; Tarr, 1972).

Mechanický přenos rostlinných virů

Mechanický přenos představuje introdukci viru do zdravé rostliny mechanickými prostředky, například skrz zranění rostliny, které může být způsobeno záměrně mechanickou inokulací, nebo přirozeně vzniklým poraněním v přírodě (Khan a Dijkstra, 2006). Jakmile se virus dostane do buňky, rostlina se stává infekční. Tento typ přenosu je přirozený u některých virů jako jsou virus tabákové mozaiky (*Tobacco mosaic virus* - TMV) a X virus bramboru (*Potato virus X* - PVX), které jsou velmi stabilní a v rostlině se vyskytují ve vysokých koncentracích (Hull, 2009).

Experimentální mechanický přenos je vhodnou a běžně využívanou metodou k určování diagnóz chorob, šíření a detekci virů a studiích vztahů mezi rostlinou a virem. Některé viry však mechanicky přenést nelze (Khan a Dijkstra, 2006).

Přenos rostlinných virů přes pylové zrno a semeno

V současné době je známo více než 100 virů přenosných semenem. Tento způsob přenosu umožňuje efektivní strategii pro přežití zejména těch virů, jež mají omezený hostitelský okruh a jsou zástupci neperzistentního přenosu přes hmyzí vektory. Přenos semenem, i přes jeho nízkou frekvenci, může být rozhodující pro šíření virů a jejich epidemiologický dopad (Khan a Dijkstra, 2006). Přenos viru semenem se stává významným zejména v případě, když byla rostlina infikována před květem. Rostliny, které vyrůstají z infikovaných semen, mají velký význam jako zdroj primárního inokula (Musil *et al.*, 1981). Četnost tohoto typu šíření je proměnlivá a pohybuje se od 0 do 100 % v závislosti na genetické výbavě hostitele i viru a je ovlivňována environmentálními faktory (Khan a Dijkstra, 2006). Viry mohou přetrvávat v semeni po velmi dlouhou dobu, může tedy nastat situace, kdy se infikované semeno dostane do nových vzdálených oblastí v důsledku komerční distribuce (Hull, 2009). Příkladem virů přenosných osivem je virus kroužkovitosti tabáku (*Tobacco ringspot virus* - TRSV) a virus čárkovitosti ječmene (*Barley stripe mosaic virus* - BSMV) (Khan a Dijkstra, 2006).

Některé viry jsou přenosné z rostliny na rostlinu prostřednictvím pylu (Hull, 2009). Tento typ přenosu vyžaduje schopnost viru infikovat meristematické pletivo rostliny. Pylová infekce zdravé mateřské rostliny, která poskytuje infekční semeno, se může podílet na zprostředkování přenosu viru semenem. Samosprašné infikované rostliny poskytují vyšší procento infikovaných semen, nežli pouze jedna gameta z infekční rostliny (Khan a Dijkstra, 2006).

Přenos rostlinných virů vegetativním množení rostlin

Vegetativní množení rostlin je důležitou zahradnickou praktikou, která je ovšem rovněž velmi efektivní metodou k přenosu a šíření virů. Ekonomicky významné viry jsou šířeny systematicky prostřednictvím většiny vegetativních částí rostlin. Systematicky infikovaná rostlina se obvykle stává infekční po celou dobu své životnosti. Tím pádem veškeré vegetativní části rostlin jako jsou hlízy, cibule, bulvy, šlahouny a řízků, použité pro množení rostlin mohou být infikovány.

Formou vegetativního množení je v podstatě i roubování. Část z jedné rostliny neboli roub vyrůstá a zakořeňuje se na rostlině druhé. Z takto založeného organického spojení se stává samostatná rostlina (Hull, 2009). Spojení rostlin je úspěšné pouze v případě, jsou-li k sobě rostlinná pletiva kompatibilní, a proto by měly pocházet obě části roubované rostliny ze stejného či příbuzného druhu (Khan a Dijkstra, 2006). V případě, že je roub či základ rostliny, na níž je roubováno systematicky infikován virem, může dojít k virové infekci celé roubované rostliny, jsou-li obě části k viru náchylné (Hull, 2009). Roubování je využíváno k přenosu virů v případech, kdy ostatní metody přenosu selhávají. Je nejstarší metodou přenosu infekčních agens z nemocných rostlin na rostliny zdravé (Khan a Dijkstra, 2006).

Přenos rostlinných virů vektorovými organizmy

Díky pevnosti rostlinných buněčných stěn se většina rostlinných virů do buňky nedostane bez pomoci vektorových organismů. Pouze některé viry se mohou do buňky dostat mechanicky skrz poranění. Různé způsoby přenosu přes vektorové organismy jsou rozlišovány na základě biologických vlastností a anatomie vektorů, vnější struktury virů, vlastností bílkovinného obalu virů a jejich genomů.

V přírodě jsou viry šířeny nejčastěji specifickými vektory. Nejstaršími známými vektory jsou zástupci z čeledi křískovití (*Cicadellidae*). Mezi převládající a nejčastější vektory virů patří zejména mšice. Dalšími vektory mohou být i někteří roztoči a hád'átka. Členovci přenášející rostlinné viry patří především do čeledí *Aleyrodidae* (molice), *Aphididae* (mšice), *Cicadellidae* (křískovití), *Fulgoridae* (svítilkovití) a *Pseudococcidae* (červci), které náleží do řádu *homoptera* (stejnokřídlí). Je zaznamenáno, že mezi vektory rostlinných virů patří rovněž devět druhů třásněnek z čeledi *Thripidae*. Výše zmínění vektorů, penetrují prostřednictvím svých styletů do rostlinných pletiv a sáním přijímají svou potravu. Viry jsou také přenášeny více než 60 druhy brouků z čeledí *Chrysomelidae*, *Coccinellidae*, *Curculionidae* a *Meloidae* z řádu *Coleoptera* (Khan a Dijkstra, 2006).

Existují dvě základní interakce mezi virem a vektorem. První interakce je perzistentní (vir koluje v těle vektora trávícím traktem) a druhá je neperzistentní (vir se nedostává do těla vektora, je jen na jeho povrchu). Jsou známy celkem tři fáze cyklu samotného přenosu viru vektorem. První, akviziční fáze zahrnuje příjem potravy z infikované rostliny a současně dostatečnou akvizici rostlinného viru vektorem. Po příjmu dostatečného množství viru, vektor není schopen po nějakou dobu vir přenést, jedná se tedy o fázi latentní. Časový úsek, po který je vektor schopen přenosu viru na zdravé hostitele, je poslední fází cyklu.

Neperzistentní (necirkulativní) přenos je uskutečňován zejména prostřednictvím mšic. Tímto způsobem jsou přenášeny například viry z rodů *Aflamovirus*, *Caulimovirus*, *Closterovirus*, *Cucumovirus*, *Fabavirus*, *Macluravirus* a *Potyvirus* (Hull, 2009). Viry přenášené necirkulativní cestou jsou z rostlin velmi rychle přijímány, obvykle během několika sekund. K akvizici viru zde dochází pouhou penetrací stiletu mšice do pletiva, aniž by mšice sála. Tento typ přenosu má tedy v podstatě mechanický charakter (Brčák, 1971). U neperzistentních virů je latentní fáze přenosu skoro nepatrná, nebo zcela chybí (Hull, 2009). Řadíme sem většinu virů přenosných mšicemi, například virus mozaiky okurky (*Cucumber mosaic virus* - TMV), Y – virus bramboru (*Potato virus Y* - PVY) a další (Fritzsche *et al.*, 1972).

Perzistentní přenos je většinou zprostředkováván jedním či několika druhy mšic (Hull, 2009). Perzistence je doba, kdy je virus uschován ve vektoru po nabývacím sání. Virus pak prochází celým trávícím traktem vektoru, než je schopen další infekce. Po průchodu trávícím ústrojím se dostává do hemolymfy, s níž pak přechází do slinných žláz. Slinným sekretem vektoru je pak virus přenášen na další hostitele. Celý proces je ovlivňován řadou biotických a abiotických faktorů (Brčák, 1971). Inkubační doba je termín označující dobu, během které virus prochází tělem vektora. Některé cirkulativní viry se během této doby v těle vektora i množí (propagativní viry) (Kúdela *et al.*, 1989). Cirkulativní viry musí být vektory přijímány po delší dobu, aby došlo k dostatečné akvizici. Minimální akviziční doba by měla být nejméně 5 minut, ale obvykle je potřeba až několik hodin. Následující latentní fáze trvá alespoň 12 hodin a doba potřebná k úspěšné inokulaci nového hostitele je zhruba 10 – 30 minut. Mšice jsou pak schopné virus přenášet ještě po několik dní. Mezi propagativní viry jsou řazeny například čeledi rostlinných virů *Reoviridae* a *Rhabdoviridae*. Někteří zástupci z rodů *Marafivirus* a *Tenuivirus* jsou replikováni v jejich vektorech z čeledi křískovití (Hull, 2009). Konkrétním příkladem perzistentního viru je např. virus svinutky bramboru (*Potato leafroll virus* – PLRV), kde je vektorem *Myzus persicae* (Kúdela *et al.*, 1989).

Existují rovněž viry semiperzistentní, které tvoří přechod mezi viry perzistentními a neperzistentními. V těle vektora přečkávají po dobu několika dní. Pro úspěšný přenos těchto virů je příznivější relativně delší akviziční doba sání. Patří sem například virus žloutenky řepy (*Beet yellows virus* - BYV) (Brčák, 1971).

Přenos rostlinných virů roztoči

Několik ekonomicky významných virových onemocnění je přenášeno fytofágními roztoči (Khan a Dijkstra, 2006). V rámci jejich řádu jsou významnými vektory rostlinných patogenů pouze roztoči z čeledi vlnovníkovití (*Eriophyidae*) (Oldfield a Proeseler, 1996). Daná problematika je podrobněji projednávána v kapitole 3.3.2.

3.1.5.4 Zdroje infekce a přežívání rostlinných virů

U některých virů může být primárním či sekundárním zdrojem virových částic půda, avšak o samostatném přežívání virových částic volně v půdě se zatím ví velmi málo. Běžně tedy přežívají ve vazbě s biotickým materiálem. V rostlinném materiálu viry přečkávají v kořenech, v sadbovém materiálu, hlízách, cibulích či oddencích. Rostlinné viry se širokým hostitelským okruhem často přezimují ve víceletých nebo vytrvalých rostlinách. Rovněž mohou přežívat ve sporách hub, vajíčkách hmyzu či v cystách háďátek (Matthews, 1981).

3.1.6 Diagnostické metody rostlinných virů

Diagnostické metody rostlinných virů jsou založeny na hodnocení symptomů onemocnění, biologických testech, elektronové mikroskopii, studii virové nukleové kyseliny a sérologických testech. Ke správnému určení diagnózy je třeba vybrat nejvhodnější metodu (Špak, 2007).

3.1.5.1 Symptomatologická diagnóza

Virovou infekci lze na rostlině pozorovat podle jejích specifických příznaků na rostlinných orgánech a podle anatomických, histologických, patofyziologických a cytologických změn (Brčák, 1983). Symptomatická metoda tedy určuje příčinu poškození rostliny na základě viditelných symptomů. Patří mezi základní metodu, která je vhodným

prvním krokem takřka ve všech případech diagnostiky (Kazda *et al.*, 2011). Její předností je možnost rychlého určení virózních rostlin v kultuře a využití k negativnímu výběru infikovaných rostlin. Patří mezi metody kvalitativní, nerozlišuje tedy směsné či latentní infekce. Její výhodou je rychlost a nízké náklady. Nevýhodou metody je subjektivnost hodnocení a nezbytné dlouholeté zkušenosti. Rovněž nedokáže jednoznačně určit původce onemocnění (Špak, 2007).

3.1.5.2 Biologické metody

Mezi biologické testy patří mechanická inokulace očkováním, roubování či přenos virů vektory na rostliny citlivé k virové infekci (Špak, 2007).

Některé citlivé rostlinné druhy (tabák, fazole) projevují charakteristické symptomy po infekci různými rostlinnými viry. Stanovení hostitelského okruhu rostlinných virů napomáhá identifikovat ty druhy rostlin, které mohou být použity pro detekci těchto patogenních mikroorganismů. Některé rostlinné druhy reagují na viry hypersenzitivně v místě inokulace patogena. Tyto lokální léze testovaných rostlin mohou být tedy nápomocné k detekci přítomnosti rostlinného viru, zejména v případě latentní infekce (Khan a Dijkstra, 2006). Do dnešní doby bylo nalezeno velké množství vhodných citlivých indikátorových rostlin z rodů *Nicotiana*, *Solanum*, *Chenopodium*, *Cucumis*, *Phaseolus*, *Vicia* a *Brassica*. Určité rostlinné druhy jako jsou např. *Chenopodium amaranticolor*, *Chenopodium quinoa* a *Nicotiana benthamiana* reagují se značně širokým spektrem rostlinných virů.

Biologické metody jsou z dosud využívaných analýz časově nejnáročnější (Hull, 2009). Během testování je nutné rostliny prostorově izolovat a chránit proti houbovým chorobám a škůdcům. Rovněž je důležité udržovat optimální podmínky ve skleníku (teplota a vzdušná vlhkost) k dosažení úspěšného přenosu a tvorbě příznaků. Tato metoda vyžaduje poměrně vysoké náklady (Špak, 2007).

3.1.5.3 Elektronová mikroskopie

Znalost rozměrů, tvaru a povrchových vlastností virových částic je základním předpokladem pro identifikaci virů. Tyto informace lze získat pomocí elektronové mikroskopie a to velmi rychle a spolehlivě. V závislosti na velikosti a morfologii, může být virus předběžně zařazen do konkrétní taxonomické skupiny (Hull, 2009).

Histologické změny, které jsou vyvolávané virovým patogenem, lze pozorovat i optickým mikroskopem. V rostlinné virologii se však k diagnostickým záměrům využívá výhradně transmisní elektronová mikroskopie, při které je preparát zobrazen svazkem emitovaných elektronů na síťce vložené do mikroskopu. Metoda elektronové mikroskopie má řadu nevýhod, zejména v oblasti vysokých nákladů na přístrojové vybavení a odborné kvalifikaci personálu, ovšem z hlediska možnosti pozorování velikosti a tvaru virionů, je metodou nepostradatelnou (Špak, 2007).

3.1.5.4 Sérologické metody

Princip sérologické metody je založen na specifické reakci a vzájemném působení dvou typů bílkovin – mezi antigenem (protein virového patogena) a protilátkou (specifický protein pro daný antigen), která se v těle živočichů vytváří (Hull, 2009). Protilátky jsou glykoproteiny známé jako imunoglobuliny, které se nachází v krevním séru. Imunoglobulin G (IgG) je nejběžnějším typem protilátek. Antigeny, které se dostanou do těla živočicha, jsou schopny vyvolat imunitní odpověď organismu a jsou specificky rozpoznány protilátkami, které se během imunitní reakce vytvořily (Khan a Dijkstra, 2006).

Hlavní diagnostickou metodou byly do poloviny 70. let sérologické testy na základě precipitace virového antigenu s protilátkou (Jermoljev a Pozděna 1972). Zpočátku byly tyto techniky využívány v podobě precipitačního testu a později v podobě testů difúze v agaru v mnoha modifikacích (Ouchterlony, 1958).

Nejrozšířenější a nejčastější metodou je v současné době imunoenzymatické stanovení – ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) (Hull, 2009). Využívá stanovení pouze takových látek, které jsou specifické pro virové patogeny (Kazda *et al.*, 2011). Principem metody je označení imunoglobulinů enzymy, které vytvářejí zabarvení. Intenzita zabarvení je následně změřena spektrofotometricky (Astier *et al.*, 2007). K testování se využívají mikrotitrační destičky (Špak, 2007). Nejběžněji je dnes ELISA využívána v modifikaci DAS – ELISA, tzv. dvojité sendvičové metoda (Double Antibody Sandwich) (Clark a Adams, 1977), kde je antigen umístěn v jamce mezi dvěma vrstvami specifických protilátek. Navázáním antigenu na protilátku se vytváří první vazba. K vytvoření druhé vazby je využito protilátky s enzymem. Po určité době dochází k zabarvení jamek, ve kterých došlo ke specifickým reakcím (Astier *et al.*, 2007).

ELISA vyžaduje laboratoř pouze se základním přístrojovým vybavením, je velmi rychlá, spolehlivá a umožňuje kvalitativní i kvantitativní stanovení virového patogena. Další výhodou této metody, kromě její vysoké citlivosti je zejména její objektivnost plynoucí z měření absorbance na fotometru (Špak, 2007; Kazda *et al.*, 2011).

3.1.5.5 Metody detekce nukleové kyseliny

S rozvojem molekulární biologie v 80. letech se začala rozšiřovat i molekulární detekce nukleových kyselin. Metoda nachází uplatnění zejména tam, kde se dosud nepodařilo připravit specifické protilátky, nebo kde není dostatečná citlivost sérologických metod. Nejčastěji jsou využívány u virů drobného ovoce a ovocných dřevin. V praktické diagnostice se využívá metod izolace dvouvláknové ribonukleové kyseliny (dsRNA), molekulární hybridizace a polymerázové řetězové reakce (Špak, 2007).

Molekulární hybridizace

Metoda molekulární hybridizace je založena na schopnosti jednovláknové nukleové kyseliny vázat se na jiné vlákno s komplementární sekvencí nukleotidů. Pro detekci rostlinných virů je nejčastěji využíváno dot-blot hybridizace. Princip metody spočívá v imobilizaci virové nukleové kyseliny na nitrocelulóзовou nebo nylonovou membránu a její detekce úsekem komplementární nukleové kyseliny, která se nazývá sonda a je radioaktivně či neradioaktivně značená. Délka sondy je obvykle 400 – 600 bází nukleotidů (Hull, 1986). U sond, jež jsou značeny radioaktivně, jsou do sekvence sondy zabudovány nukleotidy, které obsahují některý z radioaktivních izotopů. Běžně je využíván např. izotop ^{32}P , ^{33}P nebo ^{35}S . Signálem sondy je radioaktivní záření (Šmarda *et al.*, 2008). Jeho nevýhodami jsou krátký poločas rozpadu izotopu a málokdy vybavená laboratoř pro práci s radioaktivními izotopy. Z těchto důvodů je běžnější značení sond neradioaktivně (Špak, 2007). Během značení sond neradioaktivním způsobem jsou do sekvence sondy začleněny chemicky modifikované nukleotidy, které nesou reportérskou molekulu, jež umožňuje přímou či nepřímou detekci sondy. V současné době je nejběžněji využíváno značení digoxigeninem (Šmarda *et al.*, 2008). Citlivost metody je srovnatelná nebo vyšší v porovnání s ELISOU (Špak, 2007).

Polymerázová řetězová reakce PCR

Metoda PCR byla zavedena v roce 1985 Kary B. Mullisem a představovala v diagnostice a molekulární biologii významný kvalitativní skok (Šmarda *et al.*, 2008). Princip metody spočívá v amplifikaci určitých úseků DNA v *in vitro* podmínkách (Henson a French 1993). PCR se skládá ze tří základních kroků:

- Denaturace cílové DNA (RNA) do podoby jednovláčenné.
- Připojení (annealing) dvou synteticky připravených primerů (oligonukleotidy krátkých úseků DNA) k cílové molekule DNA (RNA).
- Syntéza úseku DNA, který je vymezen primery pomocí termostabilní DNA polymerázy (Špak, 2007). Termostabilní polymerázy jsou izolovány z termofilních mikroorganismů, např. *Taq* DNA polymeráza z *Thermus aquaticus* (Šmarda *et al.*, 2008).

Reakce probíhají v zařízení nazývaném termocykler, ve kterém se automaticky mění teplota v naprogramovaných časových intervalech. Při amplifikaci určitého genu je přesnost a úspěšnost PCR závislá na návrhu obou primerů (Šmarda *et al.*, 2008), které se párují s cílovou DNA a určují konce sekvence, která má být namnožena. Primery o délkách 18 – 30 nukleotidů jsou navrhovány na základě znalosti nukleové kyseliny patogenů, prostřednictvím speciálních počítačových programů. Na internetu je možné vyhledat mezinárodní databázi (EMBL), kde lze nalézt sekvence nukleotidů jednotlivých virů (Špak, 2007).

Výsledkem PCR jsou tedy mnohonásobně zmnožené vybrané úseky DNA, které se nazývají amplikony (Šmarda *et al.*, 2008).

V porovnání s testem ELISA je citlivost metody PCR řádově vyšší. Výjimečná citlivost této metody teoreticky umožňuje detekci jedné virové cílové molekuly v rostlinné šťávě a rovněž detekci viroidů a fytoplazem. Uplatnění metody PCR je využíváno v případech, kdy nelze využít testu ELISA z důvodu neznámých protilátek k diagnostikovanému viru (Špak, 2007).

Zpětná polymerázová řetězová reakce RT–PCR

Metoda RT–PCR je určena k namnožení molekul RNA, která sama o sobě nemůže sloužit jako templát pro PCR. Z toho důvodu je třeba izolovanou RNA nejdříve převést pomocí retrovirové zpětné transkriptázy (např. zpětná transkriptáza viru M – MuLV) do

podoby cDNA, ve které již může být amplifikována PCR se dvěma specifickými primery standardním postupem (Šmarda *et al.*, 2008).

3.1.7 Význam rostlinných virů

Rostlinné viry patří mezi rozšířené a ekonomicky důležité rostlinné patogeny. Téměř v každé pěstované plodině parazituje alespoň jeden vir. Předmětem studií rostlinné virologie se staly především kulturní plodiny, z důvodů vznikajících finančních ztrát na výnosech. Hostitelem těchto virů mohou být v mnoha případech také planě rostoucí rostliny.

Rostlinné viry sice přímo neohrožují lidské zdraví, ale mají pro nás významný nepřímý vliv, vzhledem ke škodám, jež způsobují pěstovaným kulturním plodinám, tedy našemu zdroji potravy (Hull, 2009). Ve světovém měřítku způsobují virózy zhruba 15 % veškerých ztrát způsobených patogeny (Kazda *et al.*, 2011). Rostlinné viry setrvávají jako jedni z hlavních biotických činitelů, které značně omezují rostlinnou produkci a to i navzdory významným pokrokům v oblasti molekulární rostlinné virologie a genetického inženýrství. Navíc v důsledku globalizace ekonomie a nové světové obchodní směrnice, které odrazují od aplikací přísných rostlinných karanténních opatření, je očekáváno zrychlení mezinárodního šíření rostlinných virů (Khan a Dijkstra, 2006).

Nicméně je třeba mít na paměti, že diagnóza rostlinných onemocnění nejvíce závisí na biologických vztazích mezi rostlinnými patogeny, jejich hostiteli a okolním prostředím. Dostatečné školení rostlinolékařů v základních agronomických vědách je nezbytnou podmínkou pro efektivní management v rostlinolékařství a udržení trvalého systému rostlinné výroby (Khan a Dijkstra, 2006).

V důsledku celosvětově významným virovým onemocněním v rostlinné produkci se stala rostlinná virologie jedním z hlavních předmětů výzkumu. V případě virových patogenů je velmi obtížné určit obecné zhodnocení ekonomických ztrát, jež způsobují, v porovnání s houbovými a bakteriálními patogeny, kde jsou dohadované ztráty velmi dobře zdokumentovány, vzhledem k jejich konkrétním druhům a jejich seznam je snadno k dostání. V dosud sepsaném seznamu se ztrátami, způsobenými virovými infekcemi, jsou často uváděny obecné kategorie jako jsou např.: „virová onemocnění“, „všichni ostatní“ či „různá onemocnění“. Viroví patogeni jsou zodpovědní za mnohem větší ekonomické ztráty, než je všeobecně známo. Tento nedostatek uznání rostlinných virů jako důležitých patogenů, je způsoben několika různými faktory, zejména však jejich záludnou povahou. Virové infekce jsou často méně nápadné, než infekce způsobené jinými patogeny a trvají mnohem déle. Toto

tvrzení platí zejména pro trvalé plodiny a rostliny, jež jsou vegetativně rozmnožovány. Další překážkou znemožňující stanovení globálního odhadu výnosových ztrát, jsou nedostačující informace. Většina údajů totiž pochází z malých srovnávacích zkoušek. To je způsobeno především proměnlivými ztrátami u konkrétního viru, v konkrétní plodině z roku na rok, různími se oblastmi a klimatickými podmínkami, v použití nejednotných metodik k vyhodnocování výnosových ztrát, rozdíly v identifikaci etiologie virových onemocnění a mnoha dalšími faktory.

Navzdory všem těmto omezením byly sestaveny různé sbírky s údaji o výnosových ztrátách. Nově vznikající komplikace s virovými patogeny v rostlinné produkci souvisí a jsou podporovány změnami v agronomické praxi, globálního trhu a klimatickými změnami (Anderson *et al.*, 2004).

3.2 Virus kroužkovitosti jeřábu

Virus kroužkovitosti jeřábu (*European mountain ash ringspot-associated virus*, EMARaV) je rostlinný vir, vyskytující se v mnoha částech Evropy. Jediným dosud známým hostitelem patogena je jeřáb ptačí (Cooper, 1993; Kegler, 1960). Taxonomicky je tento vir zařazen do nedávno zavedeného rodu *Emaravirus* (ICTV, 2014). Analýza genomické sekvence demonstruje, že je EMARaV spřízněný s čeledí *Bunyaviridae* a rodem *Tenuivirus* (Benthack *et al.*, 2005; Mielke a Muehlbach, 2007). Ještě bližší fylogenetický vztah byl však objeven v souvislosti se třemi rostlinnými viry *Pigeonpea sterility mosaic virus* (PPSMV), *Maize red stripe virus* (MRSV) a *Fig mosaic virus* (FMV) (Elbeaino *et al.*, 2009; Mielke a Muehlbach, 2007; Walia *et al.*, 2009).

Patogen EMARaV je na základě mnoha provedených studií spojován s původcem onemocnění kroužkovitosti jeřábu (*European mountain ash ringspot disease* – EMARSD), které bylo v Evropě po několik let pozorováno a určení původce EMARSD bylo dlouhodobě diskutováno. Proběhlé studie, zaměřené na určení původce tohoto onemocnění dokazují, že se skutečně jedná o virového patogena, jednak na základě typických příznaků pro virové infekce, a rovněž na základě výsledků testování přenosu patogena, elektronové mikroskopie a dále provedených detekcí, na základě molekulárních diagnóz (Führling a Büttner, 1995; Mielke a Muehlbach, 2007; Kallinen *et al.*, 2009).

3.2.1 Jeřáb ptačí (*Sorbus aucuparia*)

Jeřáb ptačí (*Sorbus aucuparia*) patří mezi důležité pionýrské dřeviny. Je jedním z nejskromnějších rostlinných druhů, který roste i na těžce degradované půdě (Aas a Holdenrieder, 1992; Weihs, 1995). Jeřáb má vysokou ekologickou hodnotu vzhledem k jeho rychlému růstu a intenzivnímu rozvoji kořenové soustavy. Často je vysazován v oblastech ohrožených erozí či kontaminací (Aas a Holdenrieder, 1992; Emmer *et al.*, 1998). Vyskytuje se v různých lesních ekosystémech, ve veřejných i soukromých zahradách společně s ostatními druhy stromů a keřů a v lesích zejména v okolí dubů (Cooper, 1993; Kegler, 1960; Polák *et al.*, 1990; Polák a Zieglerová, 1996; Schmelzer, 1977). Díky jeho dekorativním červeným plodům je často vysazován podél cest a ve veřejných prostorech (Kegler, 1960; Ebrahim-Nesbat a Izadpanah, 1992; Polák a Zieglerová, 1996).

Jeřáby jsou opylovány hmyzem a jejich semena jsou nejčastěji rozšiřována ptáky (Raspé *et al.*, 2000). Přirozeně se vyskytuje v Evropě, zejména volně v přírodě v chladnějších oblastech s poměrně hojnými srážkami. Běžně se vyskytující jeřáby ve Finsku, poukazují na kontinuální geografické rozložení, zatímco ve střední a jižní části Evropy se jeřáby vyskytují hlavně v horských oblastech, kde je klima příznivější (Raspé a Jacquemart, 1998).

3.2.2 Symptomy spojované s přítomností EMARaV

Od roku 1960 byl v Evropě monitorován vysoký podíl jeřábů ptačích vykazujících vážné příznaky spojované s virovým onemocněním (Cooper, 1993; Kegler, 1960; Polák *et al.*, 1990; Polák a Zieglerová, 1996; Schmelzer, 1977). Charakteristickými symptomy byly chlorotické kroužkovité skvrny a chlorotické mramorování na listech. Napadené stromy měly často redukovaný růst a během let postupně chřadly (Führling a Büttner, 1995).

Příznaky onemocnění kroužkovitosti jeřábu byly poprvé popsány ve Finsku. Symptomy byly ilustrovány na fotografii a charakterizovány jako nažloutlé šedo – zelené hranaté léze viditelné na svrchní straně listu. Listy mohly být zcela pokryty příznaky a na některých stromech se mohly objevit i nekrotické léze. Byly zaznamenány i rozsáhlejší nekrózy na okrajích a špičkách listů (Jamalainen, 1957). Podobné příznaky na jeřábech byly zaznamenány roku 1956 na Štrbském plese ve Vysokých Tatrách na Slovensku (Králiková, 1961) a rovněž ve východním Německu (Kegler, 1960). V mnoha dalších zemích jako jsou Velká Británie, Polsko, Česká republika, Švédsko, Rakousko a Rusko, byly tyto charakteristické příznaky rovněž monitorovány (Mielke a Muehlbach, 2007; Kallinen *et al.*,

2009; Valkonen a Rännäli, 2010; Grimová *et al.*, 2011; Robel *et al.*, 2013; von Bargen *et al.*, 2013).

Jeřáby infikované EMARaV mohou být druhotně napadány dalšími rostlinnými patogeny, jako jsou bakterie a houby (rzi), což může mít za následek rychlejší úhyn stromu (Garret *et al.*, 1985; Werner *et al.*, 1997).

3.2.3 Přenos EMARaV

Přírozené šíření EMARaV v přírodě nebylo stále zcela objasněno. Infikovaný lesní porost je potenciálním rezervoárem viru pro další hostitele (Nienhaus a Castello, 1989), a proto je zvláště důležitá identifikace prostředků přírozeného šíření zahrnující i možné vektory. Bylo zjištěno, že původce onemocnění viru kroužkovitosti jeřábu, který je charakteristický příznaky mramorování a kroužkovitostí na listech, je přenosný očkováním a roubováním (Führling a Büttner, 1995). Záznamy o prvních úspěšných přenosech původce onemocnění kroužkovitosti jeřábu přes infikovaná očka na zdravý jeřáb pocházejí z přelomu 60. a 70. let ze Slovenska (Králiková, 1961) a Německa (Kegler, 1960). Symptomy se na očkovaném jeřábu objevily rok po očkování (Kegler, 1960). Pokusy o mechanický přenos viru byly neúspěšné. Přenos a šíření viru semeny či pylem pozorováno nebylo, stejně tak zatím nebyl zcela identifikován domnělý vektor EMARaV (Benthack *et al.*, 2005; Mielke a Muehlbach, 2007). Uskutečněn byl i pokus o přenos původce onemocnění EMARSD z infikovaného stromu prostřednictvím rostlinné šťávy z listu na indikátorového bylinného hostitele, který se ovšem nezdařil (Cooper, 1979).

Bylo zjištěno, že virus kroužkovitosti jeřábu má blízký fylogenetický vztah s rostlinnými viry PPSMV, MRSV a FMV (Elbeaino *et al.*, 2009; Mielke a Muehlbach, 2007; Walia *et al.*, 2009). Všechny tyto viry jsou přenášeny roztoči z čeledi vlnovníkovití (Flock a Wallace, 1955; Kulkarni *et al.*, 2002; Seifers *et al.*, 1997), kteří jsou rovněž známými vektory virů z rodů *Rymovirus*, *Tritimovirus* a *Allexivirus* (Martelli *et al.*, 2007; Slykhuis, 1980). Zástupce z čeledi *Eriophyidae*, vlnovník hrušňový (*Phytoptus pyri*, syn. *Eriophyes pyri*) napadá velký počet rostlin z čeledi *Rosaceae*, mezi které patří i ekonomicky významné ovocné stromy jako jsou hrušně a jabloně, ale rovněž i jeřáb ptačí. Vlnovníci, kteří jsou vektory virů PPSMV, MRSV a FMV žijí volně, kdežto vlnovník hrušňový žije v hálkách na spodní straně listů jeřábů, které jsou velmi často rovněž napadeni infekcí EMARaV. Z tohoto důvodu se předpokládá, že by vlnovník hrušňový mohl být potenciálním vektorem viru kroužkovitosti jeřábu. V roce 2009 byl v Německu uskutečněn pokus zaměřený na přítomnost

EMARaV v potenciálním vektoru *Eriophyes pyri*. EMARaV byl v tělech *E. pyri*, získaných z nemocných rostlin pomocí imunofluorescentní mikroskopie a RT-PCR detekován (Mielke *et al.*, 2010).

3.2.4 Detekce EMARaV

Rostlinné viry napadající stromy či dřevnaté plodiny jsou velmi často obtížně detekovány z důvodu jejich nízké a často nevyrovnané koncentrace v rostlinných tkáních (Garret *et al.*, 1985; Werner *et al.*, 1997). Kromě toho je analýza potenciálních hostitelských rostlin zkomplikována přítomností sekundárních metabolitů, jako jsou taniny a polysacharidy (Clark *et al.*, 1976; Newbury a Possingham, 1977; Singh *et al.*, 2002). Díky vývoji diagnostických metod jsou nyní k dispozici specifické detekce viru kroužkovitosti jeřábu. S využitím vhodné protilátky je možné využít pro specifickou imunodetekci EMARaV v infikovaných rostlinách Western blot analýzy (Mielke *et al.*, 2008). V současné době je ovšem nejčastěji využívanou diagnostickou metodou pro detekci EMARaV RT-PCR, která je vysoce citlivá. V běžné praxi nahrazuje imunodetekční metody. Pomocí této techniky je virus rozpoznatelný nejen v listech jeřábů, ale i ve vegetativních pupenech a v lýku stromů. Zdroj rostlinných vzorků je tedy k dispozici během celého roku (Mielke *et al.*, 2008).

3.3 Vektoři virů z čeledi vlnovníkovití (*Eriophyidae*)

3.3.1 Čeleď Vlnovníkovití - *Eriophyidae*

Taxonomické zařazení čeledi vlnovníkovití je následující:

Říše: živočichové (*Animalia*)

Kmen: členovci (*Arthropoda*)

Podkmen: klepíkatci (*Chelicerata*)

Třída: pavoukovci (*Arachnida*)

Řád: roztoči (*Acarina*)

Vlnovníkovití jsou velmi drobní roztoči červovitěho vzhledu (Šefrová, 2006). Průměrná délka těla dospělců je 200 μm v rozsahu od 80 přibližně do 500 μm (Lindquist *et al.*, 1996). Mají bodcovité chelicery, postrádají oči, cévní soustavu, vzdušnice a vylučovací ústrojí. Většinou mají během roku více generací a samičky mohou být někdy morfologicky odlišné. Během vegetačního období jsou aktivní samičky primární (protogynní), které nejsou schopné přezimovat, stejně jako samečci. Sekundární (deutogynní) samičky přezimují nejčastěji v pupenech.

Vlnovníci patří jednoznačně mezi fytofágní organizmy. Žijí na povrchu rostlin, zejména na listech a pupenech. Reakcí rostliny na dráždění buněk pokožky je deformace, či tvorba chloupkovitých útvarů - erineí. Bujení pletiv vyvolávají hálkotvorné druhy. Pletivo je obrůstá a chrání před vnějšími vlivy (Šefrová, 2006). Škody způsobené vlnovníky spočívají zejména v tvorbě hálek na listech, pupenech či květech, nebo tvorbě puchýřů a strupů. Tito roztoči většinou nebývají příčinou vážného onemocnění a nezpůsobují rostlině nadměrný stres. Jde především o estetickou nevzhlednost rostliny (Davis a Beddes, 2011).

Někteří vlnovníci patří mezi obligátní rostlinné parazity, kteří se živí na různých rostlinných orgánech a vyvolávají na rostlině příznaky, které se dají snadno zaměnit s příznaky jiného původu jako je virové onemocnění, poškození způsobené nevyrovnanou výživou, či fyziologickou poruchou. Někteří zástupci těchto roztočů mohou přenášet viry, způsobující ekonomicky významné škody na výnosech pěstovaných plodin (Oldfield a Proeseler 1996). Stanovení hustoty populace vlnovníků a souvisejících výnosových ztrát je velmi obtížné vzhledem k jejich drobným rozměrům a skrytému způsobu života (v pupenech, hálkách, puchýřích či erineích) (Royalty a Perring 1996). Vlnovníci mohou být šířeni pasivně, vzdušným proudem, deštěm a také člověkem (Leeuwen *et al.*, 2009).

Identifikace jednotlivých druhů na základě jejich morfologie je obvykle velmi obtížná nebo nemožná. Roztoče lze identifikovat podle jejich hostitelské rostliny nebo dle vzhledu napadeného rostlinného pletiva. Vlnovníkovití se vyskytují především na trvalých rostlinách (Mellott a Krantz, 2003).

Roztoči z čeledi vlnovníkovití se podle literatury dále člení na vlnovníky způsobující puchýře, hálky, rzivost či škody na pupenech. Puppení roztoči napadají pletivo pupenů. Mohou způsobovat částečné nebo úplné zastavení vývinu pupene, nebo zapříčinit jeho abnormální zvětšení. Do této skupiny je řazen např. vlnovník rybízový (*Cecidophyopsis ribis*) Hálkotvorní vlnovníci vytvářejí z pletiva napadených listů hálku, která je uzavřená a uvnitř dochází k abnormálnímu růstu chloupkovitých útvarů, které zajišťují ochrannou spleť pro obyvatele hálky. Zástupci vlnovníků způsobujících puchýře zamořují a osídlují listový mezofyl, čímž dochází k vnitřním deformacím listu, které se zevně projevují jako puchýře. Důležitým zástupcem této skupiny roztočů je vlnovník hrušňový (*Eriophyes pyri*, syn. *Phytoptus pyri*), kterému je rovněž připisována rzivost a deformace ovocných plodů. (Mellott a Krantz, 2003). Způsobuje puchýřkovité zduřeniny na listech a po jejich zaschnutí saje na nových mladých listech (Šefrová, 2006). Hlavním hostitelským okruhem vlnovníka hrušňového je hrušeň, napadá však i jabloně, kdouloně, muchovníky, skalníky a mišpule (Ryšánek, 2012). Poškození roztoči, kteří způsobují rzivost, se projevuje bronzovatením, hnědnutím či zestříbřením povrchu napadených listů. Druhotným následkem je svinování a rolování okrajů listů. Vlnovníci této skupiny obvykle přežívají na spodní straně listu, ale mohou se žít i na její vrchní straně. K významným zástupcům patří *Aculus cornutus*, *Aculus schlechtendali* a *Epitrimerus pyri*. Tito roztoči mohou při silném napadení způsobit až předčasný opad listů (Mellott a Krantz, 2003).

3.3.2 Přenos rostlinných virů roztoči

Zástupci rostlinných virů z rodů *Rymovirus*, *Tritimovirus*, *Allexivirus* a v neposlední řadě *Emaravirus* jsou v přírodě přenášeni pomocí vektorů z čeledi vlnovníkovití (*Eriophyidae*) (Slykhuis, 1980; Martelli *et al.*, 2007; Mielke a Mühlbach, 2012). Roztoči z této čeledi jsou v literatuře popsáni jako jediní možní přenašeči virových patogenů (Oldfield a Proeseler, 1996).

Viry přenášené roztoči jsou rozděleny celkem do tří skupin. První skupina virů infikuje jednoděložné rostliny. Tyto viry s dlouhými vláknitými částicemi jsou známy indukci cylindrických, neboli větrníkovitých inkluzí a jsou řazeny do rodu *Rymovirus*, čeledi

Potyviridae. Druhá skupina virů sestává z klosterovirových dlouhých vláknitých částic. Kvazisférické částice třetí skupiny virů jsou vázány dvojitou membránovou částicí (double membrane particle - DMP) a dosahují průměru od 100 do 200 nm (Khan a Dijkstra, 2006).

Vztah mezi vektorem a přenášeným patogenem je vysoce specifický. V rámci jednoho přenášeného rostlinného patogena není znám žádný další přenašeč z jiného taxonu, či jiný druh roztoče z čeledi *Eriophyidae*. Existují však důkazy, že *Aceria tulipae* a *Abacarus hystrix* jsou schopni přenášet více než jednoho patogena. Vektoři širokolistých rostlinných patogenů vždy přenáší jen jednoho z jejich zástupců a každý patogen dřevnatých rostlin je přenášen pouze jedním druhem roztoče z čeledi *Eriophyidae*. Ekologické vztahy mezi vektory *Eriophyidae*, patogeny, které přenáší a jejich hostiteli jsou velmi blízké a dlouho trvající. Ovšem u většiny těchto roztočů a jimi přenášených patogenů, jsou tyto vztahy stále nedostatečně probádány.

V porovnání s důležitými hmyzími vektory (mšice, křískovití), jejichž dlouhý stylet dokáže proniknout do buněk floému a xylému, jsou vlnovníkovití roztoči svými relativně krátkými chelicerálními stylety schopni penetrovat pouze do epidermálních buněk rostlin (Oldfield a Proeseler, 1996).

Pravděpodobně nejlépe prostudovaný virus přenášený roztoči, je virus proužkovitosti pšenice (*Wheat streak mosaic virus* - WSMV). Tento vir, stejně jako někteří další zástupci z čeledi *Rymovirus*, je šířen roztočem *Aceria tosichella* (Khan a Dijkstra, 2006). WSMV je přenášen oběma nymfálními stádii a dospělcem. Není však přenosný ovariálně. Aby mohl dospělec vir přenášet, musí ho získat ještě během svého nymfálního stádia (Slykhuis, 1955; del Rosario a Sill, 1965). Orlob (1966) ve své práci však uvádí úspěšný přenos viru dospělci, kteří byli schopni virus získat bez jejich předešlé infekce v nymfálním stádiu. Ve své studii autor dále poukazuje na velmi nízkou efektivitu přenosu mezi roztoči, kteří měli přístup k infikované rostlině pouze po dobu 15 minut. Po 16 hodinovém přístupu roztočů na napadené rostlině, se inokulovala zhruba jejich polovina. Stejně tak, jen několik málo inokulovaných roztočů dokázalo přenést virus na zdravou rostlinu během jejich 15 minutového přístupu, kdežto po 16 hodinovém přístupu roztočů na hostiteli byl virus přenesen zhruba jejich polovinou (Orlob, 1966). Jednorázově infikovaný roztoč je schopen virus přenášet nejméně po dobu sedmi dní (Slykhuis, 1955; del Rosario a Sill, 1965; Orlob, 1966).

Kromě WSMV jsou roztoči z čeledi *Eriophyidae* vektory mnoha dalších virů jako jsou například *Black currant reversion virus* (BRV), *Fig mosaic virus* (FMV), *Rose rosette virus* (RRV) nebo *Pigeon pea sterility mosaic virus* (PPSMV), které budou podrobněji popsány v kapitole 3.3.3 (Oldfield a Proeseler, 1996).

3.3.3 Vybrané rostlinné viry přenášené roztoči

3.3.3.1 *Wheat streak mosaic virus* (virus proužkovitosti pšenice - WSMV)

Virus proužkovitosti pšenice je řazen do čeledi *Potyviridae* a rodu *Tritimovirus* (ICTV, 2014). Patří mezi hlavní patogeny pšenice seté (*Triticum aestivum*) v zemědělských regionech v Americe, severní Africe, Asii a v Evropě. Další obilniny jako jsou ječmen, oves, proso a žito jsou rovněž náchylné k infekci, ale v porovnání s pšenicí jsou ekonomické škody na těchto obilninách minimální. Při silném napadení pšenice může způsobovat nedostatečný růst, sterilní klasy nebo předčasný úhyn rostliny způsobující dramatické snížení výnosů (Staples a Allington, 1956; Atkinson a Grant, 1967; Sanchez-Sanchez *et al.*, 2001; Lanoiselet *et al.*, 2008). Vektor přenášející WSMV je roztoč z čeledi vlnovníkovití (*Eriophyidae*) *Aceria tosichella* a patří mezi nejdůležitější druhy *Aceria* na obilí (Amrine a Stasny, 1994; Frost a Ridland, 1996). Charakteristické symptomy na obilí, jež způsobuje *Aceria tosichella* jsou zkroucené a stočené listy. Příznaky typické pro WSMV jsou světlé zeleno-žluté pruhy, doprovázené chlorózami, krněním rostliny a sevrklými zrny (Styer a Nault, 1996).

Ochranná opatření jsou v současné době založena pouze na dodržování správné agrotechnické praxe, zejména k zamezení šíření roztočů přerušením zeleného mostu, likvidací či zapravením výdrolu obilnin do půdy. Využívány jsou modely prognózy výskytu a na jejich základu jsou vyvíjeny cílené strategie ochrany (Koubová, 2011).

3.3.3.2 *Pigeonpea sterility mosaic virus* (PPSMV)

Pigeonpea sterility mosaic virus spadá do skupiny virů, které zatím nejsou taxonomicky zařazeny (ICTV, 2014) a napadá kajan indický (*Cajanus cajan*). Virové onemocnění PPSMV bylo poprvé zaznamenáno v roce 1931 ve státě Bihar v Indii (Ghanekar *et al.*, 1992) a je endemické ve všech státech v Indii, Bangladéši, Nepálu a Barmě, kde je *Cajanus* pěstován. Mezi typické příznaky virové infekce patří mozaiky na listech či nerozkvétající květy, které se stávají sterilními. Výnosové ztráty mohou být až 90% (Kannaiyan *et al.*, 1984). PPSMV je přenosný roubováním a roztočem *Aceria cajani* z čeledi *Eriophyidae* (Ghanekar *et al.*, 1992; Seth, 1962), který má velmi úzký a specifický hostitelský okruh. Vztahuje se především na *Cajanus cajan* a jeho volně rostoucí příbuzné druhy (*Cajanus scarabaeoides* a *C. cajaniifolius*) (Oldfield *et al.*, 1981).

Ochrana proti šíření PPSMV je spíše preventivního charakteru. Důležitý je výběr zdravého rostlinného materiálu, odstraňování a likvidace infikovaných rostlin v trvalých porostech kajanů, které jsou zdroji PPSMV a využití akaricidních postřiků proti roztočům (Agropedia, 2009). Předmětem výzkumu jsou rezistentní druhy *Cajanus scarabaeoides* k PPSMV a jejich využití ve šlechtitelském programu (Kulkarni *et al.*, 2003).

3.3.3.3 *Fig mosaic virus* (virus mozaiky fíku - FMV)

Fig mosaic virus je řazen do rodu *Emaravirus* (ICTV, 2014). Poprvé bylo virové onemocnění FMV zaznamenáno v roce 1930 v Kalifornii (Condit a Horne, 1933). Bylo zjištěno, že k infekci FMV je citlivých mnoho kultivarů fíků (Serrano *et al.*, 2004). Příznaky postižených stromů se projevují na listech v podobě chlorotických a mozaikových skvrn. Rovněž se může objevit mramorování, kroužkovitost nebo deformace listů (Walia *et al.*, 2009; Condit a Horne, 1933; Martelli *et al.*, 1993; Castellano *et al.*, 2007). Postiženy mohou být i plody, které jsou menší a na jejich povrchu se tvoří mozaiky (Acikgöz a Döken, 2003). *Fig mosaic virus* je přenášen roztočem *Aceria ficus* a vegetativním množením rostlin (Falk a Salem, 2005; Castellano *et al.*, 2007). Roztoči napadají plody, listy, pupeny a mladé zelené větvičky a způsobují tak na rostlinách chlorózy, zkroucení listů, rzivost, předčasný opad listů, zduření pupenů či redukovaný růst (Ebeling a Pence, 1950). Výše zmíněné příznaky po napadení fíku roztoči mohou být mylně zaměněny s některými příznaky po virové infekci rostliny FMV.

Ochranná opatření jsou zaměřena na redukci přenašečů FMV. Populace *A. ficus* je redukována akaricidními prostředky (Oldfield a Proeseler, 1996). Obecně je doporučováno použití zdravého rostlinného materiálu (Falk a Salem, 2005; Castellano *et al.*, 2007).

3.3.3.4 *Rose rosette virus* (RRV)

Rose rosette virus rovněž náleží do nepopsané čeledi virů do rodu *Emaravirus*, stejně jako FMV (ICTV, 2014). Poprvé byl popsán v roce 1940 (Connors, 1941) v Severní Americe. Virové onemocnění, které je alternativně označováno jako „čarodějnické koště“, bylo monitorováno ve středních a východních státech USA na mnoha kultivarech, stejně jako na široké škále volně rostoucích druhů růží. Charakteristické příznaky virové infekce jsou popsány rychlým prodloužením stonku, které je doprovázeno lámáním stonkové části pod

pupenem. Dochází ke svrašťování listů a jejich deformacím, červenání výhonků či k tvorbě nadbytku trnů. Rostlina získává metlovitý vzhled (Crowe, 1983). Vysoce náchylným druhem k RRV je *Rosa multiflora*, která je považována za zdroj infekce u růžovitých kultivarů (Epstein *et al.*, 1997). Bylo zjištěno, že RRV je přenosný očkováním, roubováním a také byl zaznamenán úspěšný mechanický přenos (Doudrick, 1984). Potvrzen je i přenos vektorem *Phyllocoptes fructiphylus* z čeledi *Eriophyidae* (Amrine *et al.*, 1990).

Ochranným opatřením je odstraňování a likvidace nemocných rostlin nebo využití chemických přípravků proti samotným roztočům (Hong *et al.*, 2012). Zvažuje se o potencionálním využití RRV jako biologické ochrany proti škodlivému invaznímu druhu *Rosa multiflora* v USA (Amrine a Hindal, 1988).

3.3.3.5 *Blackcurrant reversion virus* (virus zvratu černého rybízu – BRV)

Virus způsobující zvrát černého rybízu je řazen do čeledi *Secoviridae*, podčeledi *Comovirinae* a rodu *Nepovirus*. BRV a jeho vektor vlnovník rybízový (*Cecidophyopsis ribis*) byl zkoumán a rozpoznáván po dobu nejméně 100 let. Zpočátku bylo poškození roztoči, které se projevovalo zduřením pupenů a zkroucením listů zaměňováno se symptomy zvratu černého rybízu. Později byly příznaky virózy rozeznány a bylo prokázáno, že vlnovníci přenášejí samotného původce onemocnění. Symptom charakteristický pro poškození vlnovníky je zvětšení a změna podoby pupene z kuželového tvaru na kulovitý. Nejnápadnější symptomy virové infekce jsou viditelné na listech (Jones, 2000). Listy jsou menší, často jen se třemi místo pěti laloky a mají ostré zoubkování. Listy a pupeny mají méně trichomů, tvoří se větší počet více rozvětvených slabých větví, květy mají dlouhé stopky a mohou opadávat (Šefrová, 2006).

Z ochranných opatření proti šíření virů je často využíváno chemických postřiků proti vektoru *C. ribis* (zejména v Německu), které se aplikují v jarním období na začátku květu. Většina insekticidů a akaricidů má však příliš malý vliv. Populace roztočů může být také redukována odstraněním infikovaných zduřelých pupenů v zimním období. K efektivní kontrole zvratu černého rybízu a jeho vektorů je doporučován systematický program ochranných opatření zahrnující termoterapii řízků a aplikaci pesticidů ve školkách, výběr vhodné lokality pro nové výsadby, prořezání a odstranění napadených větví a chemickou kontrolu v produkčních výsadbách (Proeseler, 1973).

4 Materiál a metody

4.1 Hostitelský okruh EMARaV

Pokus zaměřený na okruh dřevinných hostitelů EMARaV byl založen již v roce 2011 pracovníky katedry ochrany rostlin ČZU. Jako rostlinný materiál bylo použito 17 druhů rostlin z čeledi *Rosaceae*. Rostliny byly naočkovány očky pocházejícími z jeřábu ptačího infikovaného EMARaV, rostoucího ve volné přírodě v lokalitě Kozí hřbety na severozápadním okraji hlavního města Prahy. Cílem tohoto pokusu bylo objevení do dnešní doby nepopsaných hostitelských rostlin tohoto virového patogena.

V průběhu vegetativního období roku 2013 bylo provedeno testování celkem 85 naočkových stromů, jmenovitě *Sorbus torminalis*, *Sorbus aria*, *Sorbus rotundifolia*, *Sorbus intermedia I.*, *Sorbus intermedia II.*, *Sorbus × thuringiaca* cv. *Fastigiata*, *Sorbus koehneana*, *Sorbaronia* spp., *Sorbus commixta*, *Amelanchier alnifolia*, *Amelanchier spicata*, *Amelanchier ovalis*, *Amelanchier Lamarkii*, *Malus* spp., *Pyrus* spp., *Crataegus laevigata* a *Aronia* spp.

K ověření přítomnosti EMARaV v rostlinném materiálu byly použity molekulárně genetické analýzy, konkrétně izolace celkové RNA, reverzní transkripce (RT) a polymerázová řetězová reakce (PCR) s konečnou vizualizací produktů pomocí agarózové elektroforézy. V průběhu vegetačního období bylo testování 3krát zopakováno. První testování probíhalo na jaře, druhé v létě a třetí na podzim. Konečné výsledky byly následně porovnány s výslednou analýzou z předchozího roku 2012.

4.2 Detekce EMARaV pomocí RT-PCR

4.2.1 Optimalizace diagnostické metody RT-PCR pro detekci EMARaV

4.2.1.1 Izolace celkové RNA

Před samotným testováním jednotlivých rostlin bylo nejprve porovnáno pět, v dnešní době často využívaných metod izolace celkové RNA za účelem optimalizace detekce patogena. Jednotlivé techniky byly následující: izolace „silika“ metodou dle Rott a Jelkmann (2001), dále dvě její modifikace s využitím metabisulfátu sodného a fenol-chloroformu,

dalšími metodami byly izolace celkové RNA pomocí *TriPure Isolation Reagent* od firmy Roche a fenol-chloroformová izolační metoda dle Sambrook a Russel (2001).

Celkem bylo všemi metodami otestováno 60 rostlinných vzorků. V každé sérii bylo po dvanácti vzorcích. Jednalo se o tyto botanické druhy: *Crataegus* spp., *Malus* spp., *Sorbus* spp. a *Aronia* spp. Podrobné protokoly jednotlivých technik jsou uvedeny v následujících kapitolách.

Izolace „silika“ metodou dle Rott a Jelkmann (2001)

1. 100 mg čerstvého či zamrazeného biologického materiálu bylo rozdrobeno pomocí oscilačního mlýna Retsch MM 400. Rostlinný materiál spolu s třemi drtícími koulemi (o průměru 3 mm) byl spolu se 100 µl grinding pufru převeden do 2 ml zkumavky, která byla následně umístěna do mlýna a po dobu 1,5 min byla třepána rychlostí 30 kmitů za sekundu. Poté bylo do mikrozukavky přidáno dalších 900 µl grinding pufru a vzorek byl po dobu 30 s třepán stejnou rychlostí.
2. Po rozdrobení rostlinného materiálu oscilačním mlýnem následovala centrifugace (6000 x RPM, 3 min, 4 °C).
3. 500 µl supernatantu bylo převedeno do nové mikrozukavky a spolu se 100 µl 10% N-lauronyl-sarkosinu a s 5 µl 2-merkaptóetanolu byl vzorek inkubován 10 min při teplotě 70 °C. V průběhu inkubace byla mikrozukavka každé 3 min promíchána na dotykové třepačce.
4. Následovala inkubace na ledu 5 min a centrifugace (13 000 x RPM, 10 min, 4 °C).
5. Do nové mikrozukavky bylo převedeno 300 µl supernatantu a ke vzorku přidáno 150 µl chlazeného absolutního etanolu, 300 µl roztoku jodidu sodného a 30 µl silika suspenze.
6. Následovala inkubace při laboratorní teplotě 10 min, vzorek byl po celou dobu promícháván na třepačce v horizontální poloze (600 RPM).
7. Po centrifugaci (6 000 x RPM, 1 min, 4 °C) byl supernatant odlit a peleta (pevná fáze) byla promyta 500 µl promývacího pufru, tento krok byl jednou opakován.
8. Po odstranění supernatantu byla mikrozukavka ponechána při laboratorní teplotě na pracovní desce cca 10 min sušit. Peleta byla resuspendována ve 150 µl sterilní ddH₂O, následovala inkubace 4 min při 70 °C a centrifugace (13 000 x RPM, 3 min, 4 °C).
9. 120 µl supernatantu bylo převedeno do nové mikrozukavky a vzorek byl uskladněn v mrazicím boxu (-24 °C) či byl ihned použit pro další analýzy.

Složení a příprava roztoků a pufrů:

- Grinding pufr (pH 5,6). 4 M guanidin thiokyanát; 0,2 M octan sodný; 1 M octan draselný; 25 mM EDTA; 2,5% PVP (w/V). Uchováváme při 4 °C.
- Jodid sodný. 0,75 g Na₂SO₃; 6 M NaI. Příprava: 0,75 g Na₂SO₃ rozpustíme ve 40 ml sterilní ddH₂O a přidáme 36 g NaI. Uchováváme v tmavé lahvi při 4 °C.
- Promývací pufr (pH 7,5). 10 mM Tris – HCl; 0,5 mM EDTA; 50 mM NaCl. Sterilizujeme pomocí autoklávu. Poté přidáme absolutní etanol (50 % objemu). Uchováváme při 4 °C.
- Silika suspenze (pH 2,0). 30 g silika částic. Příprava: ve 250 ml sterilní ddH₂O rozpustíme 30 g silika částic, směs promícháme a necháme do druhého dne sedimentovat. Následující den odstraníme horní fázi (cca 235 ml), zbylou část roztoku doplníme vodou do 250 ml, roztok promícháme a necháme 5 hodin sedimentovat. Odpipetujeme 220 ml horní fáze, zbylý roztok důkladně homogenizujeme. Sterilizujeme pomocí autoklávu, uchováváme v tmavé lahvi při 4 °C.

Izolace celkové RNA „silika“ metodou dle Rott a Jelkmann (2001) modifikace I.

1. 100 mg čerstvého či zamrazeného biologického materiálu bylo rozdrceno pomocí oscilačního mlýna Retsch MM 400. Rostlinný materiál spolu s třemi drtícími koulemi (o průměru 3 mm) byl spolu se 100 µl grinding pufru (do kterého byl těsně před použitím přidán 2% metabisulfát sodný) převeden do 2 ml zkumavky, která byla následně umístěna do mlýna a po dobu 1,5 min byla třepána rychlostí 30 kmitů za sekundu. Poté bylo do mikrozkušavky přidáno dalších 900 µl grinding pufru (s 2% metabisulfátem sodným) a vzorek byl po dobu 30 s třepán stejnou rychlostí.
2. Po centrifugaci (6 000 x RPM, 3 min, 4 °C) bylo převedeno do nové mikrozkušavky 500 µl supernatantu (vodní fáze) a spolu se 100 µl 10% N – lauronyl – sarkosinu byl vzorek inkubován 10 min při teplotě 70 °C, v průběhu inkubace byla mikrozkušavka každé 3 min promíchána na dotykové třepačce.
3. Následovala inkubace na ledu 5 min a centrifugace (13 000 x RPM, 10 min, 4 °C).
4. Do nové mikrozkušavky bylo převedeno 300 µl supernatantu a ke vzorku přidáno 150 µl chlazeného absolutního etanolu, 300 µl roztoku jodidu sodného a 30 µl silika suspenze.

5. Následovala inkubace při laboratorní teplotě 10 min, vzorek byl po celou dobu promícháván na třepačce v horizontální poloze (600 RPM).
6. Po centrifugaci (6 000 x RPM, 1 min, 4 °C) byl supernatant odlit a peleta (pevná fáze) byla promyta 500 µl promývacího pufru, tento krok byl jednou opakován.
7. Po odstranění supernatantu byla mikrozkušavka ponechána při laboratorní teplotě na pracovní desce cca 10 min sušit. Peleta byla resuspendována ve 150 µl sterilní ddH₂O, následovala inkubace 4 min při 70 °C a centrifugace (13 000 x RPM, 3 min, 4 °C).
8. 120 µl supernatantu bylo převedeno do nové mikrozkušavky a vzorek byl uskladněn v mrazicím boxu (-24 °C) či byl ihned použit pro další analýzy.

Složení použitých roztoků a pufrů se shoduje s kapitolou 4.2.2.

Izolace „silika“ metodou dle Rott a Jelkmann (2001) modifikace II. fenol – chloroform

1. 100 mg čerstvého či zamrazeného biologického materiálu bylo rozdrobeno pomocí oscilačního mlýna Retsch MM 400. Rostlinný materiál spolu s třemi drtícími koulemi (o průměru 3 mm) a se 100 µl grinding pufru (do kterého byl těsně před použitím přidán 2% metabisulfát sodný) byl převeden do 2 ml zkumavky, která byla následně umístěna do mlýna a po dobu 1,5 min byla třepána rychlostí 30 kmitů za sekundu. Poté bylo do mikrozkušavky přidáno dalších 900 µl grinding pufru (s 2% metabisulfátem sodným) a vzorek byl po dobu 30 s třepán stejnou rychlostí.
2. Po centrifugaci (6 000 RPM, 3 min, 4 °C) bylo převedeno do nové mikrozkušavky 500 µl supernatantu (vodní fáze) a spolu se 100 µl 10% N – lauronyl – sarkosinu byl vzorek inkubován 10 min při teplotě 70 °C, v průběhu inkubace byla mikrozkušavka každé 3 min promíchána na dotykové třepačce.
3. Následovala inkubace na ledu 5 min a centrifugace (13 000 x RPM, 10 min, 4 °C).
4. Do nové mikrozkušavky bylo převedeno 400 µl supernatantu a ke vzorku přidáno 200 µl kyselého fenolu (pH 4) a 200 µl chloroform-izoamylalkohol (24:1)
5. Následovala inkubace při laboratorní teplotě, kdy byl vzorek po dobu 2 min horizontálně mírně promícháván na třepačce a poté se nechal 5 min stát. Po inkubaci následovala centrifugace (13 000 x RPM, 10 min, 4 °C).
6. Do nové mikrozkušavky bylo převedeno 300 µl supernatantu a ke vzorku přidáno 150 µl chlazeného absolutního etanolu, 300 µl roztoku jodidu sodného a 30 µl silika suspenze.

7. Následovala inkubace při laboratorní teplotě 10 min, vzorek byl po celou dobu promícháván na třepačce v horizontální poloze (600 RPM).
8. Po centrifugaci (6 000 x RPM, 1 min, 4 °C) byl supernatant odlit a peleta (pevná fáze) byla promyta 500 µl promývacího pufru, tento krok byl jednou opakován.
9. Po odstranění supernatantu byla mikrozkušavka ponechána při laboratorní teplotě na pracovní desce cca 10 min sušit. Peleta byla resuspendována ve 150 µl sterilní ddH₂O, následovala inkubace 4 min při 70 °C a centrifugace (13 000 x RPM, 3 min, 4 °C).
10. 120 µl supernatantu bylo převedeno do nové mikrozkušavky a vzorek byl uskladněn v mrazicím boxu (-28 °C) či byl ihned použit pro další analýzy.

Složení použitých roztoků a pufrů se shoduje s kapitolou 4.2.2.

Izolace celkové RNA pomocí *TriPure Isolation Reagent* (Roche)

1. 100 mg čerstvého či zamrazeného biologického materiálu bylo rozdrobeno pomocí oscilačního mlýna Retsch MM 400. Rostlinný materiál spolu s třemi drtícími koulemi (o průměru 3 mm) byl převeden spolu se 100 µl *TriPure Isolation Reagent* do 2 ml zkumavky, která byla následně umístěna do mlýna a po dobu 1,5 min byla třepána rychlostí 30 kmitů za sekundu. Poté bylo do mikrozkušavky přidáno dalších 900 µl *TriPure Isolation Reagent* a vzorek byl po dobu 30 s třepán stejnou rychlostí.
2. Vzorek byl po dobu 5 min inkubován při laboratorní teplotě a poté k němu bylo převedeno 200 µl chloroformu.
3. Roztok byl krátce promíchán na vortexu a ponechán 3 min při laboratorní teplotě.
4. Následovala centrifugace (12 000 x g, 15 min), poté byl supernatant převeden do nové mikrozkušavky a k vodní fázi bylo přidáno 500 µl izopropanolu.
5. Mikrozkušavka byla po mírném promíchání inkubována při laboratorní teplotě po dobu 10 min a následovala centrifugace (12 000 x g, 10 min).
6. Po odstranění vodní fáze byla peleta promyta 1000 µl 75% ledového etanolu.
7. Po centrifugaci (12 000 x g, 5 min) byla odstraněna vodní fáze a mikrozkušavka byla inkubována při laboratorní teplotě po dobu 8 min.
8. Peleta byla resuspendována v 80 µl sterilní ddH₂O a poté inkubována 10 min v 55 °C.
9. Vzorek byl uskladněn v mrazicím boxu (-24 °C) či ihned zpracován pro další analýzy.

Uvedený postup je doporučen samotným výrobcem (Roche).

Fenol–chloroformová izolační metoda dle Sambrook a Russel (2001)

1. 100 mg čerstvého či zamrazeného biologického materiálu bylo rozdrobeno pomocí oscilačního mlýna Retsch MM 400. Rostlinný materiál spolu s třemi drtícími koulemi (o průměru 3 mm) byl převeden spolu se 100 µl extrakčního pufru do 2 ml zkumavky, která byla následně umístěna do mlýna a po dobu 1,5 min byla třepána rychlostí 30 kmitů za sekundu. Poté bylo do mikrozukavky přidáno dalších 900 µl extrakčního pufru a vzorek byl po dobu 30 s třepán stejnou rychlostí.
2. Ke vzorku bylo napipetováno stejné množství směsi fenol (pH 4,3) : chloroform-isoamylalkohol (24:1).
3. Vzorek byl po dobu 10 min třepán a následně centrifugován (7 000 x g; 10 min; 4° C). Do nové mikrozukavky byla převedena vodní fáze a celý krok byl dvakrát zopakován (2. a 3. krok).
4. Supernatant byl převeden do nové mikrozukavky. Ke vzorku bylo poté napipetováno stejné množství chloroform-isoamylalkoholu.
5. Vzorek byl třepán po dobu 10 min a centrifugován (7 000 x g; 10 min; 4° C).
6. Po odebrání supernatantu byla ke vzorku přidána 1/10 objemu supernatantu octanu sodného (3M) a dvojnásobné množství 100% etanolu.
7. Vzorek byl ponechán nejméně 1 hod při -20 °C (precipitace RNA), nebo byl 3x zmražen v tekutém dusíku.
8. Vzorek byl následně centrifugován (10 000 x g; 10 min; 4°C), poté byl odstraněn supernatant a peleta byla promyta 200 µl 70% etanolem.
9. Vzorek byl znovu centrifugován (10 000 x g; 10 min; 4°C), následovně byl odstraněn supernatant a vzorek byl ponechán 10 min při laboratorní teplotě sušit.
10. Ke každému vzorku bylo napipetováno 100 µl sterilní ddH₂O. Takto připravený vzorek celkové RNA byl ihned použit pro další analýzy nebo uskladněn v mrazicím boxu (-24°C).

Složení použitých pufrů:

- Extrakční pufr pro izolaci RNA (pH 7,0). 50 mM Tris; 100 mM NaCl; 20 mM EDTA; 1% SDS. Skladujeme při 4 °C.

4.2.1.2 Stanovení koncentrace a čistoty vyizolované RNA

U vyizolované RNA byla spektrofotometricky změřena její čistota a koncentrace pomocí spektrofotometru Nanodrop 2000 (ThermoScientific, USA) při vlnové délce 260 nm a 280 nm.

4.2.1.3 Stanovení integrity celkové RNA

K vyhodnocení integrity RNA bylo využito semi-denaturační elektroforetické separace RNA na horizontální agarózové elektroforéze (MultiSUB Midi, Cleaver Scientific Ltd).

Agaróza byla rozpuštěna v 1 x TBE pufru v mikrovlnné troubě. Po přelití do elektroforetické cely se nechal gel ztuhnout při laboratorní teplotě. Vzorky celkové RNA byly smíchány s nanášecím barvivem 2 x *RNA Loading Dye* (Fermentas), poté byly 10 min inkubovány při teplotě 70°C a následně rychle zchlazeny na ledu (3 min). Připravené vzorky byly naneseny do gelu a po dobu jedné hodiny probíhala separace celkové RNA při konstantním stejnosměrném napětí 4 – 6 V/cm. Nukleové kyseliny byly vizualizovány na UV-transiluminátoru při vlnové délce 260 nm. K vizualizaci RNA molekul byl využit etidium bromid v koncentraci 0,5 µg/ml. Fragmenty byly následně porovnávány s hmotnostním standardem *RiboRulerTM High Range RNA Ladder* (Fermentas). Elektroforeogramy byly zdokumentovány automatickým analytickým a dokumentačním Bio-Imaging systémem InGenius (Syngene).

4.2.1.4 Metoda RT-PCR

Reverzní transkripce

1. Syntéza cDNA probíhala v reakčních objemech 50 µl. Nejprve byl připraven premix o objemu 30 µl obsahující:
 - X µl sterilní ddH₂O
 - 0,5 µl náhodných primerů (zásobní roztok 1 µg / µl; Roche)
 - přibližně 750 µg celkové RNA
2. Vzorek byl 5 min inkubován ve 100 °C a poté ponechán 2 min na ledu.

3. K premixu bylo následně přidáno:
- 10 µl 5x First Strand pufru (Invitrogen)
 - 4,8 µl sterilní ddH₂O
 - 2,5 µl každého dNTP (zásobní roztok 10 mM; Fermentas)
 - 2,0 µl DTT (zásobní roztok 0,1 mM; Invitrogen)
 - 0,7 µl Mu – MLV reverzní transkriptázy (zásobní roztok 200 U / µl; Invitrogen)
4. Mikrozkušavka byla ponechána ve 42 °C po dobu 55 min, poté byla 10 min inkubována v 70 °C.

Polymerázová řetězová reakce

Získaná komplementární DNA byla využita v následující polymerázové řetězové reakci.

1. Reakce PCR byla prováděna v objemu 25 µl obsahujícím:

- 16,05 µl sterilní ddH₂O
- 2,5 µl 10x Dream Taq pufru (Fermentas)
- 2 µl MgCl₂ (zásobní roztok 25 mM; Fermentas)
- 0,25 µl dNTP mix (zásobní roztok 10 mM; Fermentas)
- 0,5 µl reverzního primeru NAD5as 5'- CTCCAGTCACCAACATTGGCATAA - 3' (Menzel *et al.*, 2002) (zásobní roztok 10 µM)
- 0,5 µl forwardového primeru NAD5s 5' - GATGCTTCTTGGGGCTTCTTGTT - 3' (Menzel *et al.*, 2002) (zásobní roztok 10 µM)
- 0,2 µl Dream Taq polymerázy (zásobní roztok 5 U / µl; Fermentas)
- 3 µl cDNA vzorku

2. Pro PCR byl použit termocykler MJ Research PTC 200. Použité primery NAD5as a NAD5s amplifikovaly fragment rostliné mRNA (Menzel *et al.*, 2002). Podmínky během amplifikace byly následující: 94 °C 2 min.; 30 cyklů: 94°C 45 s, 54°C 45 s, 72°C 45 s; 72 °C 7 min. Velikost PCR fragmentu byla 181 bp.

4.2.1.5 Elektroforetická separace nukleových kyselin

Posledním krokem detekce byla elektroforetická separace nukleových kyselin prostřednictvím horizontální agarózové elektroforézy a poté následovala vizualizace výsledků provedené analýzy.

1. Příprava 1% agarózového gelu.

Požadované množství agarózy (1g) bylo převedeno do baňky s 1 x TBE pufru. Díky ohřevu v mikrovlnné troubě došlo k rozpuštění agarózy. Po ochlazení roztoku proudem studené vody byl přidán ethidium bromid (0,5 μ l / 1 ml). Takto připravený gel byl následně převeden do připravené elektroforetické cely s hřebínky a nechal se ztuhnout.

2. Nanášení vzorků DNA do gelu.

Vzorky DNA byly smíchány s 2 μ l barviva DNA Loading Dye (Fermentas) a poté postupně napipetovány po vyjmutí hřebínku do vzniklých mezer v gelu. Do první a poslední jamky v gelu byly vždy napipetovány 2 μ l Low-Range DNA Ladder (Fermentas).

3. Elektroforetická separace a vizualizace.

Elektroforéza probíhala při konstantním stejnosměrném napětí 4 – 6 V/cm po dobu 45 min. Po skončení elektroforetické separace následovala vizualizace DNA fragmentů prostřednictvím UV transilumátoru při vlnové délce 260 nm. Pomocí hmotnostního standardu Low-Range DNA Ladder (Fermentas) byla určena velikost fragmentů nukleové kyseliny. Elektroforeogramy byly zdokumentovány automatickým analytickým a dokumentačním Bio-Imaging systémem InGenius (Syngene).

Složení použitých pufrů:

10 x TBE (pH 8,0) – 890 mM Tris, 890 mM kyselina boritá; 20 mM EDTA. Sterilizace pomocí autoklávu. Skladování při laboratorní teplotě.

4.2.2 Vlastní detekce EMARaV

Na základě výsledné koncentrace celkové RNA, její čistoty a integrity byla následně vybrána nejspolehlivější izolační technika, tedy „silika“ metodou dle Rott a Jelkmann (2001) modifikace II. Fenol-chloroform, která byla využívána po celou dobu testování (podrobný protokol izolační techniky je popsán v kapitole 4.2.1.1). K detekci patogena byla použita

metoda RT-PCR s konečnou vizualizací pomocí agarózové elektroforézy. Použité primery pro detekci EMARaV jsou uvedeny v tabulce 1. Všechny postupy jsou podrobně popsány v kapitolách 4.2.1.4 a 4.2.1.5.

Pro jednotlivé testování bylo odebíráno vždy minimálně pět listů z celé koruny stromů. Listy se znatelnými symptomy byly odebírány přednostně. Rostlinný materiál byl buď okamžitě zpracován, nebo uchován v mrazicím boxu při teplotě -24°C.

4.3 Studie symptomů EMARaV

Přítomnost a charakter symptomů na EMARaV pozitivních taxonech byly sledovány od jara 2013 do podzimu téhož roku.

Aby bylo možné alespoň částečně vyloučit možnou záměnu symptomů se symptomy vyvolanými jinými původci virových onemocnění, které by mohly být na jednotlivých rostlinách přítomny, bylo provedeno kontrolní testování všech 85 sledovaných jedinců molekulárně genetickými metodami (RT-PCR) na přítomnost následujících virů: viru žlábkovitosti kmene jabloně (*Apple stem grooving virus* - ASGV), viru mělké vrásčitosti kmene jabloně (*Apple stem pitting virus* - ASPV), viru chlorotické skvrnitosti jabloně (*Apple chlorotic leaf spot virus* - ACLSV), viru svinutky třešně (*Cherry leaf roll virus* - CLRV) a viru mozaiky jabloně (*Apple mosaic virus* - ApMV). Izolace RNA z rostlinného materiálu byla provedena metodou dle Rott a Jelkmann (2001) v modifikaci fenol – chloroform, která je podrobně posána v kapitole 4.2.1.1. Následné kontrolní testování bylo realizováno metodou RT-PCR. Reverzní transkripce je detailně popsána v kapitole 4.2.1.4. Detekce jednotlivých virových zástupců byla ověřena dle protokolů, jež jsou uvedeny v tabulce 1. Výsledná vizualizace PCR produktů byla provedena dle protokolu v kapitole 4.2.1.5.

Tabulka 1. Použité primery, programy a velikosti fragmentů produktů PCR.

EMARaV	
Primery	EMARaV3 FP/EMARaV3 RV (Mielke <i>et al.</i> , 2008)
Program	94 °C 2 min.; 30 cyklů: 94°C 45 s, 54°C 45 s, 72°C 45 s; 72 °C 7 min; 8 °C
Velikost fragmentu	204 bp
ASGV	
Primery	ASGVUs/ASGV2as (James, 1999)
Program	94 °C 2 min.; 35 cyklů: 94°C 45 s, 66°C 45 s, 72°C 45 s; 72°C 7 min; 8 °C
Velikost fragmentu	499 bp
ASPV	
Primery	ASPCs/ASPas (Jelkmann a Keim-Konrad, 1997)
Program	94 °C 2 min.; 35 cyklů: 94°C 45 s, 60°C 45 s, 72°C 45 s; 72 °C 7 min; 8 °C
Velikost fragmentu	264 bp
ACLSV	
Primery	ACLSV1F/ACLSV1R (Watpade <i>et al.</i> , 2012)
Program	94 °C 2 min.; 35 cyklů: 94°C 45 s, 57°C 45 s, 72°C 45 s; 72 °C 7 min; 8°C
Velikost fragmentu	432 bp
CLRV	
Primery	CLRV1/CLRV2 (Kumari, 2009)
Program	94° 2 min.; 35 cyklů: 94 °C 45 s, 55°C 45 s, 72 °C 45 s; 72 °C 7 min; 8 °C
Velikost fragmentu	283 bp
ApMV	
Primery	108N7/108N8 (Petrzik a Lenz, 2002)
Program	94° 2 min.; 35 cyklů: 94 °C 45 s, 58°C 45 s, 72 °C 45 s; 72 °C 7 min; 8 °C
Velikost fragmentu	464 bp

4.4 Přenos vlnovníka hrušňového (*Eriophyes pyri*) na rostliny

4.4.1 Zdroj a odběr roztočů

Vlnovníci byli získáváni z napadených listů jeřábu ptačího (*Sorbus aucuparia*) a jabloní (*Malus* spp.) ze školního areálu ČZU v Suchdole v průběhu letního období roku 2013. Odebírány byly listy s hálkami různého stáří, které byly pak okamžitě využity k přenosu roztočů.

4.4.2 Přenos roztočů na zdravé listy

Vzhledem k velmi drobným rozměrům vlnovníků byl přenos uskutečňován pod binokulární lupou. Hálky na listech byly pomocí preparační jehly velmi opatrně roztrženy, aby nedošlo k mechanickému poškození roztočů. Nalezení vlnovníci byli jednotlivě pomocí jehly přenášení do drobného uzavíratelného víčka s možností připnutí na nový zdravý list. Do každého víčka bylo přeneseno 20 jedinců. Na spodní stranu listu byly vždy připnuty 3 víčka s vlnovníky a jedno víčko na svrchní stranu. Takto připravené listy pak byly ponechány v Petriho misce s vodou při laboratorní teplotě. Po dobu tří dnů bylo pod binokulární lupou sledováno, zda se vlnovníci na novém listu adaptovali. Přenos roztočů byl 12 x zopakován stejným postupem.

Obrázek 1. Uzavíratelné připínací víčko s odebranými roztoči.



4.4.3 Příprava preparátu vlnovníka hrušňového pro elektronovou mikroskopii

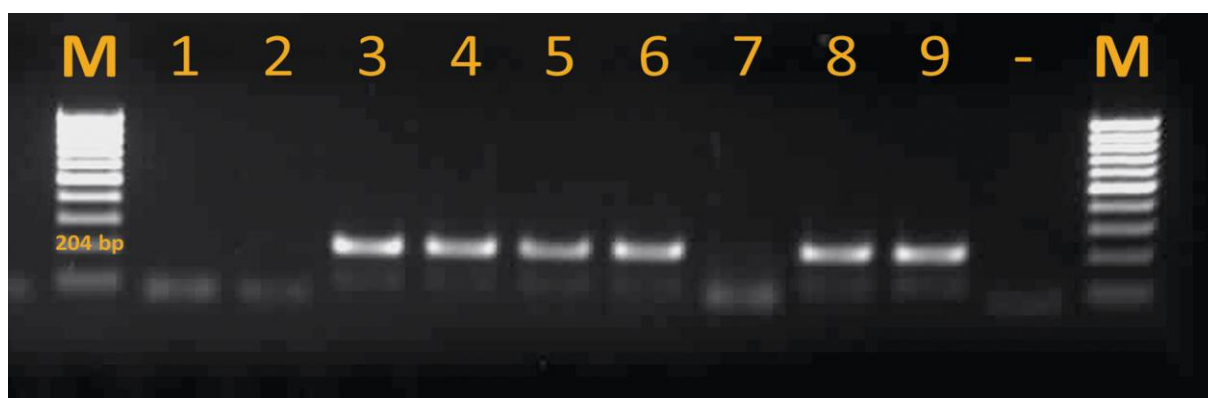
Vlnovníci byli pro elektronovou mikroskopii přenášení pomocí preparační jehly pod binokulární lupou stejným způsobem jako při jejich přenosu na listovou plochu. Před samotným přenosem byl v kádince připraven roztok (25% glutaraldehyd + fosfátový pufr 0,02 M v poměru 1:9), do kterého byly ponořeny 2 speciálně upravené mikrozkušavky s mikrosíťovaným dnem. Do každé mikrozkušavky bylo přeneseno 50 jedinců. Takto byli ponecháni po dobu 4 hodin při laboratorní teplotě. Mikrozkušavky s roztoči byly po uplynuté době 3x propláchnuty po 15 min v pufru. Následně byly vzorky proplachovány 3x v etanolu vždy po 30 min ve vztupné etanolové řadě (1. 30% etanol, 2. 50% etanol a 3. 70% etanol). Takto připravené vzorky byly na přírodovědecké fakultě Karlovy univerzity dále zpracovány do konečného preparátu RNDr. Miroslavem Hylišem, PhD. Výsledné fotografie z elektronové mikroskopie zhotovil prof. Ing. Pavel Ryšánek, CSc. na katedře ochrany rostlin ČZU.

5 Výsledky

5.1 Hostitelský okruh

Výsledky analýzy metody RT-PCR potvrdily u všech testovaných druhů (*S. torminalis*, *S. aria*, *S. rotundifolia*, *S. intermedia I.*, *S. intermedia II.*, *S. × thuringiaca* cv. *Fastigiata*, *S. koehneana*, *Sorbaronia* spp., *S. commixta*, *A. spicata*, *A. ovalis*, *A. Lamarkii*, *A. alnifolia*, *Malus* spp., *Pyrus* spp., *C. laevigata*, *Aronia* spp.) přítomnost viru kroužkovitosti jeřábu, což znamená, že výše jmenované rostliny jsou hostiteli virového patogena EMARaV a rozšiřují tak jeho doposud nedostatečně prozkoumaný hostitelský okruh (ukázka elektroforeogramu na obr. 2).

Z 85 otestovaných stromků bylo celkem 73 vzorků pozitivních na přítomnost EMARaV, což činí 86 % rostlin infikovaných a 14 % rostlin zdravých. U druhu *Aronia* spp. byly pozitivní všechny testované vzorky. Pozitivní výsledky na přítomnost patogena u ostatních testovaných druhů silně převažují nad negativními.



Obrázek 2. Detekce EMARaV metodou RT-PCR. Elektroforeogram RT-PCR produktů po separaci na agarózovém gelu. Použité primery EMARAV3 FP/ EMARAV3 RV, velikost PCR produktu 204 bp. M: hmotnostní standard Mass ruler low range (Fermentas); vzorky 3, 4, 5, 6, 8 a 9 pozitivní na přítomnost EMARaV, - negativní kontrola (ddH₂O).

Výsledky analýz zaměřených na studii hostitelského okruhu EMARaV z roku 2012, které byly získány v rámci diplomové práce Ing. Michala Konradyho, jsou v porovnání s našimi výsledky rozdílné. Přehled všech testovaných druhů z obou let je uveden v tabulce 2.

Tabulka 2. Přehled testovaných druhů z let 2012 a 2013.

Rostlinný druh		RT-PCR 2012	RT-PCR 2013			Symptomy spojované s EMRAaV	
			jaro	léto	podzim	2012	2013
Jeřáb břek	<i>Sorbus torminalis</i>	+	-	+	+	NE	NE
	<i>Sorbus torminalis</i>	+	-	-	+	NE	NE
	<i>Sorbus torminalis</i>	+	-	-	+	NE	NE
	<i>Sorbus torminalis</i>	+	-	-	+	NE	NE
Jeřáb muk	<i>Sorbus aria</i>	-	-	+	+	NE	NE
	<i>Sorbus aria</i>	-	-	+	+	NE	NE
Jeřáb okrouhlostý	<i>Sorbus rotundifolia</i>	+	-	+	+	ANO	ANO
	<i>Sorbus rotundifolia</i>	-	+	+	+	ANO	ANO
	<i>Sorbus rotundifolia</i>	+	-	+	+	ANO	ANO
Jeřáb prostřední I.	<i>Sorbus intermedia I.</i>	+	+	+	+	ANO	ANO
	<i>Sorbus intermedia I.</i>	-	+	+	+	ANO	ANO
	<i>Sorbus intermedia I.</i>	+	+	+	+	ANO	ANO
Jeřáb prostřední II.	<i>S. intermedia II.</i>	-	-	+	+	NE	ANO
	<i>S. intermedia II.</i>	-	+	+	+	NE	ANO
	<i>S. intermedia II.</i>	-	+	+	+	NE	ANO
	<i>S. intermedia II.</i>	-	+	+	+	NE	ANO
Jeřáb duryňský	<i>Sorbus thuringiaca</i> cv. Fastigiata	-	+	+	+	NE	ANO
	<i>Sorbus thuringiaca</i> cv. Fastigiata	-	-	-	-	NE	ANO
	<i>Sorbus thuringiaca</i> cv. Fastigiata	-	-	-	+	NE	ANO
Jeřáboplodec	<i>Sorbaronia</i> spp.	-	+	+	+	ANO	ANO
	<i>Sorbaronia</i> spp.	+	+	+	+	ANO	ANO
	<i>Sorbaronia</i> spp.	+	+	+	+	ANO	ANO
	<i>Sorbaronia</i> spp.	+	+	+	+	ANO	ANO
	<i>Sorbaronia</i> spp.	+	+	+	+	ANO	ANO
Jeřáb pomíchaný	<i>Sorbus commixta</i>	-	-	-	-	ANO	ANO
	<i>Sorbus commixta</i>	+	-	-	+	ANO	ANO
	<i>Sorbus commixta</i>	+	-	+	-	ANO	ANO
	<i>Sorbus commixta</i>	+	-	-	-	ANO	ANO

Tabulka 2. Přehled testovaných druhů z let 2012 a 2013 – pokračování.

Rostlinný druh		RT-PCR 2012	RT-PCR 2013			Symptomy spojené s EMARaV	
			jaro	léto	podzim	2012	2013
Jeřáb Koehneův	<i>Sorbus koehneana</i>	+	+	+	+	ANO	ANO
	<i>Sorbus koehneana</i>	+	+	+	+	ANO	ANO
	<i>Sorbus koehneana</i>	+	+	+	+	ANO	ANO
Muchovník oválný	<i>Amelanchier ovalis</i>	+	+	+	+	ANO	ANO
	<i>Amelanchier ovalis</i>	+	+	+	+	ANO	ANO
	<i>Amelanchier ovalis</i>	+	-	+	+	ANO	ANO
	<i>Amelanchier ovalis</i>	+	+	+	+	ANO	ANO
	<i>Amelanchier ovalis</i>	+	+	+	+	ANO	ANO
	<i>Amelanchier ovalis</i>	+	-	-	-	ANO	ANO
	<i>Amelanchier ovalis</i>	+	+	+	+	ANO	ANO
Muchovník klasnatý	<i>Amelanchier spicata</i>	-	-	-	-	ANO	ANO
	<i>Amelanchier spicata</i>	+	-	+	+	ANO	ANO
	<i>Amelanchier spicata</i>	+	-	+	+	ANO	ANO
	<i>Amelanchier spicata</i>	-	-	+	+	ANO	ANO
	<i>Amelanchier spicata</i>	+	+	+	+	ANO	ANO
Muchovník Lamarckův	<i>Amelanchier lamarckii</i>	+	+	+	+	ANO	ANO
	<i>Amelanchier lamarckii</i>	+	+	+	+	ANO	ANO
	<i>Amelanchier lamarckii</i>	+	+	+	+	ANO	ANO
	<i>Amelanchier lamarckii</i>	-	+	+	+	ANO	ANO
	<i>Amelanchier lamarckii</i>	-	+	+	+	ANO	ANO
Muchovník olšolistý	<i>Amelanchier alnifolia</i>	-	-	+	+	NE	ANO
	<i>Amelanchier alnifolia</i>	-	-	-	-	NE	ANO
	<i>Amelanchier alnifolia</i>	-	-	-	-	NE	ANO
	<i>Amelanchier alnifolia</i>	-	+	+	+	NE	ANO
	<i>Amelanchier alnifolia</i>	-	+	+	+	NE	ANO
	<i>Amelanchier alnifolia</i>	-	+	+	+	NE	ANO
	<i>Amelanchier alnifolia</i>	-	+	+	+	NE	ANO
Jabloň	<i>Malus spp.</i>	-	-	+	+	ANO	NE
	<i>Malus spp.</i>	-	-	+	+	ANO	NE
	<i>Malus spp.</i>	+	-	-	+	ANO	NE
	<i>Malus spp.</i>	-	-	+	+	ANO	NE
	<i>Malus spp.</i>	-	-	+	+	ANO	NE
	<i>Malus spp.</i>	+	-	-	-	ANO	NE
	<i>Malus spp.</i>	+	-	+	-	ANO	NE

Tabulka 2. Přehled testovaných druhů z let 2012 a 2013 – pokračování.

Rostlinný druh		RT-PCR 2012	RT-PCR 2013			Symptomy spojované s EMARaV	
			jaro	léto	podzim	2012	2013
Hrušeň	<i>Pyrus spp.</i>	-	-	+	+	NE	NE
	<i>Pyrus spp.</i>	+	-	-	+	NE	NE
	<i>Pyrus spp.</i>	-	-	+	-	NE	NE
	<i>Pyrus spp.</i>	+	-	-	+	NE	NE
	<i>Pyrus spp.</i>	-	-	-	+	NE	NE
	<i>Pyrus spp.</i>	-	-	+	+	NE	NE
Hloch obecný	<i>Crataegus laevigata</i>	-	-	-	+	NE	NE
	<i>Crataegus laevigata</i>	-	-	+	+	NE	NE
	<i>Crataegus laevigata</i>	+	-	-	+	NE	NE
	<i>Crataegus laevigata</i>	+	-	-	-	NE	NE
	<i>Crataegus laevigata</i>	+	-	-	-	NE	NE
	<i>Crataegus laevigata</i>	-	-	-	+	NE	NE
	<i>Crataegus laevigata</i>	+	-	-	-	NE	NE
Temnoplodec	<i>Aronia ssp.</i>	v roce 2012 netestováno	+	+	+	v roce 2012 netestováno	ANO
	<i>Aronia ssp.</i>		+	+	+		ANO
	<i>Aronia ssp.</i>		+	+	+		ANO
	<i>Aronia ssp.</i>		+	+	+		ANO
	<i>Aronia ssp.</i>		+	+	+		ANO
	<i>Aronia ssp.</i>		+	+	+		ANO
	<i>Aronia ssp.</i>		+	+	+		ANO
	<i>Aronia ssp.</i>		+	+	+		ANO
	<i>Aronia ssp.</i>		+	+	+		ANO
	<i>Aronia ssp.</i>		+	+	+		ANO

Rostliny, které byly v roce 2012 vyhodnoceny jako EMARaV negativní, čili nehostitelské, byly v rámci této práce prokázány jako hostitelské. Konkrétně se jedná o druhy *A. alnifolia*, *S. aria*, *S. intermedia II.* a *S. × thuringiaca* cv. Fastigiata. Přehled testovaných druhů rostlin na EMARaV v roce 2012 a 2013, s rozdílnými výsledky pozitivních rostlin, je uveden v tabulce 3.

Tabulka 3. Přehled rostlinných druhů z roku 2012 a 2013, u kterých byla prokázána infekce EMARaV a jejichž výsledky se různí.

Rostlinný druh	Celkový počet testovaných rostlin	Počet rostlin pozitivních na EMARaV v roce 2012	Počet rostlin pozitivních na EMARaV v roce 2013
<i>A. ovalis</i>	7	7	6
<i>A. spicata</i>	5	3	4
<i>A. lamarkii</i>	5	3	5
<i>A. alnifolia</i>	7	0	5
<i>Malus</i> spp.	7	3	6
<i>Pyrus</i> spp.	6	2	5
<i>S. aria</i>	2	0	2
<i>S. rotundifolia</i>	3	2	3
<i>S. intermedia I.</i>	3	2	3
<i>S. intermedia II.</i>	4	0	4
<i>S.thuringiaca</i> cv. F.	3	0	2
<i>Sorbaronia</i> spp.	5	4	5
<i>S. commixta</i>	4	3	2

5.1.1 Symptomy EMARaV

U zástupců druhů *S. aucuparia*, *S. intermedia I.*, *S. intermedia II.*, *S. koehneana*, *S. × thuringiaca* cv. *Fastigiata*, *S. rotundifolia*, *Sorbaronia* spp., *Aronia* spp., *A. spicala*, *A. ovalis* a *A. Lamarkii* byly pozorovány viditelné symptomy. Na listech rostlin byly znatelné žluté nepravidelné skvrny různých velikostí a tvarů. Bylo pozorováno, že listy *S. intermedia I.* byly výrazně deformované. Příznaky se objevovaly na konci května a nejintenzivnější byly v červnu a červenci. Jejich intenzita začala klesat od druhé poloviny vegetačního období. U některých jedinců nastal již v pozdním létě předčasný opad symptomatických listů.

Zástupci druhů *S. aria*, *S. torminalis*, *S. commixta*, *Malus* spp., *Pyrus* spp. a *C. laevigata* byly bezpříznakové, ale přítomnost EMARaV v jejich pletivu byla potvrzena pomocí RT-PCR, i když výsledný signál PCR produktů na transiluminátoru byl u těchto rostlin vždy velmi slabý.

Všechny analyzované rostlinné druhy byly rovněž otestovány na přítomnost ApMV, ACLSV, ASGV, ASPV a CLRV. Výsledky testů potvrdily výskyt ApMV u tří zástupců *C. laevigata* a jednoho zástupce *S. koehneana*. Pozitivní na přítomnost CLRV byl jeden zástupce *Aronia* spp. U zbylých testovaných rostlin se výskyt výše uvedených virů neprokázal. Lze tedy předpokládat, že pozorované symptomy byly skutečně vyvolané infekcí EMARaV.

Obrázek 3. Symptomy spojované s přítomností EMARaV na *Sorbaronia* spp.



Obrázek 4. Symptomy spojované s přítomností EMARaV na listu *Aronia* spp.



Obrázek 5. Symptomy spojované s přítomností EMARaV na listu *Sorbus intermedia* I.



Obrázek 6. Symtomy spojované s přítomností EMARaV na listu *Amelanchier spicata*.



Obrázek 7. Symtomy spojované s přítomností EMARaV na listu *Sorbus rotundifolia*.



5.2 Vyhodnocení izolačních metod RNA

5.2.1 Stanovení čistoty a koncentrace RNA

Koncentrace a čistota vyizolované RNA se u jednotlivých testovaných extrakčních metod odlišovala. Z hodnocených metod dopadla nejlépe izolace „silika“ metodou dle Rott a Jelkmann (2001) v modifikaci II. s použitím fenol-chloroformu, kde se hodnoty čistoty vyizolované RNA pohybovaly v doporučeném intervalu 1,7 - 2,0 a výsledné koncentrace vykazovala hodnoty kolem 100 ng/μl. Ačkoliv metody *TriPure Isolation Reagent* (Roche) a fenol-chloroformová izolační metoda dle Sambrook a Russel (2001) vykazovaly vysoké výtežky vyizolované celkové RNA, čistota RNA u jednotlivých vzorků byla neuspokojivá. Přehled výsledků je znázorněn v tabulce 4.

Z testovaných druhů rostlin (*Crataegus* spp., *Malus* spp., *Sorbus* spp., *Aronia* spp.) v rámci všech izolačních metod vycházela izolovaná RNA v nejčistší formě a dobré koncentraci u jabloně a nejvíce problematickou dřevinou byl jeřáb.

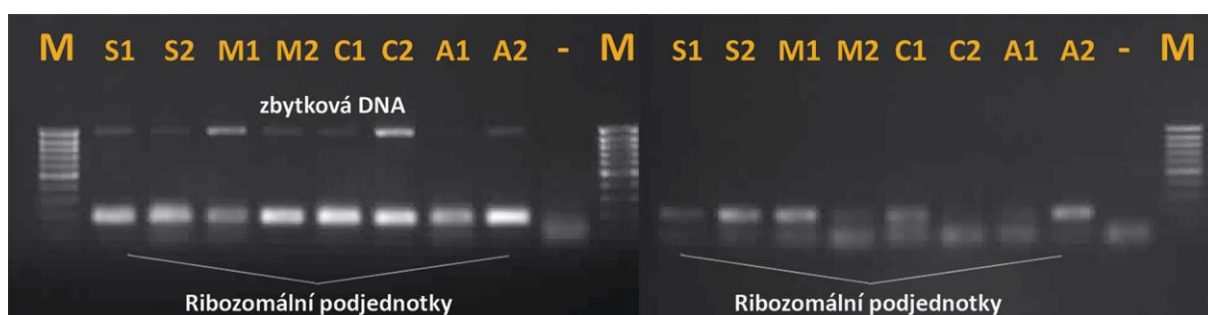
Tabulka 4. Vyhodnocení čistoty a koncentrace celkové RNA.

Typ izolační metody	Čistota RNA (1,7 - 2)	Koncentrace RNA (ng/μl)
Silika – merkaptóetanol	> 2	< 100
Silika modifikace I.	> 2	< 100
Silika modifikace II. F-Ch	1,7 - 2	60-140
TriPure Isolation Reagent	< 1,7	< 300
Fenol-chloroform	< 1,7	150-300

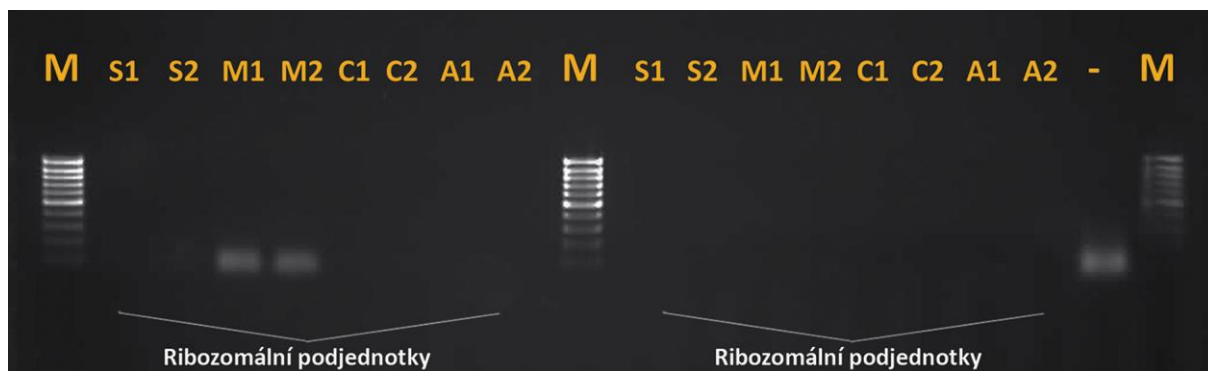
5.2.2 Stanovení integrity celkové RNA

Ze zkoušených metod byla výsledná integrita RNA dobrá u všech izolačních metod pomocí „silika“ dle Rott a Jelkmann (2001). Zbylé metody *TriPure Isolation Reagent* (Roche) a fenol-chloroformová metoda dle Sambrook a Russel (2001) byly nevyhovující.

Uvedené výsledky poukazují, že i na základě integrity celkové RNA se izolace „silika“ metodou dle Rott a Jelkmann (2001) modifikace II (fenol-chloroform) projevila jako nejlepší ze všech testovaných metod, což je zvláště u problematických dřevnatých rostlin velmi důležité. Porovnání integrity izolované celkové RNA je znázorněna na obrázcích 8. a 9.



Obrázek 8. Stanovení integrity izolované celkové RNA. Elektroforeogram polymerů RNA po separaci na agarózovém gelu. M: *RiboRuler™ High Range RNA Ladder* (Fermentas); vzorky S1, S2 (*Sorbus* spp.), M1, M2 (*Malus* spp.), C1, C2 (*Crataegus* spp.) a A1, A2 (*Aronia* spp.), - negativní kontrola (ddH₂O): vlevo izolace pomocí „silika“ (Rott a Jelkmann, 2001) a vpravo izolace pomocí „silika“ (Rott a Jelkmann, 2001) s využitím fenolu a chloroformu.



Obrázek 9. Stanovení integrity izolované celkové RNA. Elektroforeogram polymerů RNA po separaci na agarózovém gelu. M: *RiboRuler™ High Range RNA Ladder* (Fermentas); vzorky S1, S2 (*Sorbus* spp.), M1, M2 (*Malus* spp.), C1, C2 (*Crataegus* spp.) a A1, A2 (*Aronia* spp.), - negativní kontrola (ddH₂O): vlevo izolace pomocí *TriPure Isolation Reagent* (Roche) a vpravo fenol-chloroformová metoda dle Sambrook a Russel (2001).

5.3 Přenos vlnovníka hrušňového

5.3.1 Přenos roztočů na zdravé listy

Odebraní vlnovníci, kteří byli přeneseni do speciálního víčka a připnuty na nový zdravý list, byli po dobu tří dnů sledováni, zda se jim podařilo adaptovat se na novém zdroji potravy. Životaschopnost roztočů byla následně pozorována pod binokulární lupou. Bylo zjištěno, že přenesení roztoči zůstávali stále na dně víčka ve všech vzorcích a bez možnosti příjmu potravy pravděpodobně všichni zahynuli. Na novém listu nebyla pozorována žádná fyziologická změna.

Důvod, proč se roztoči nebyli schopni přemístit a přizpůsobit na novém listu, je nejasná. Jedna z možných příčin je pravděpodobnost mechanického poškození roztoče při samotném přenosu, což je vzhledem k jejich drobné a křehké stavbě těla pravděpodobné.

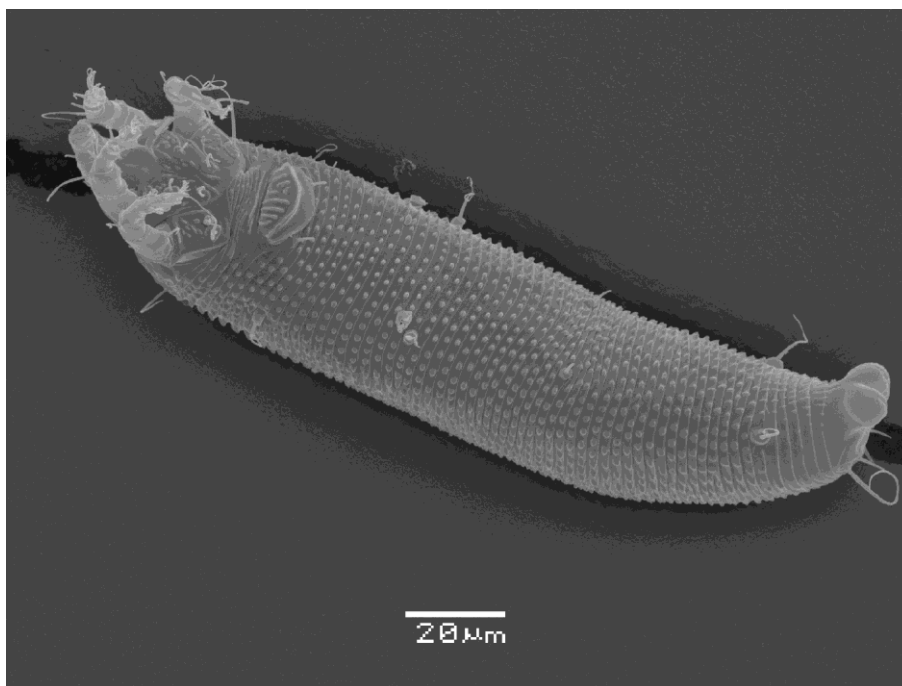
Obrázek 10. Spodní strana listu s háčkami vlnovníků.



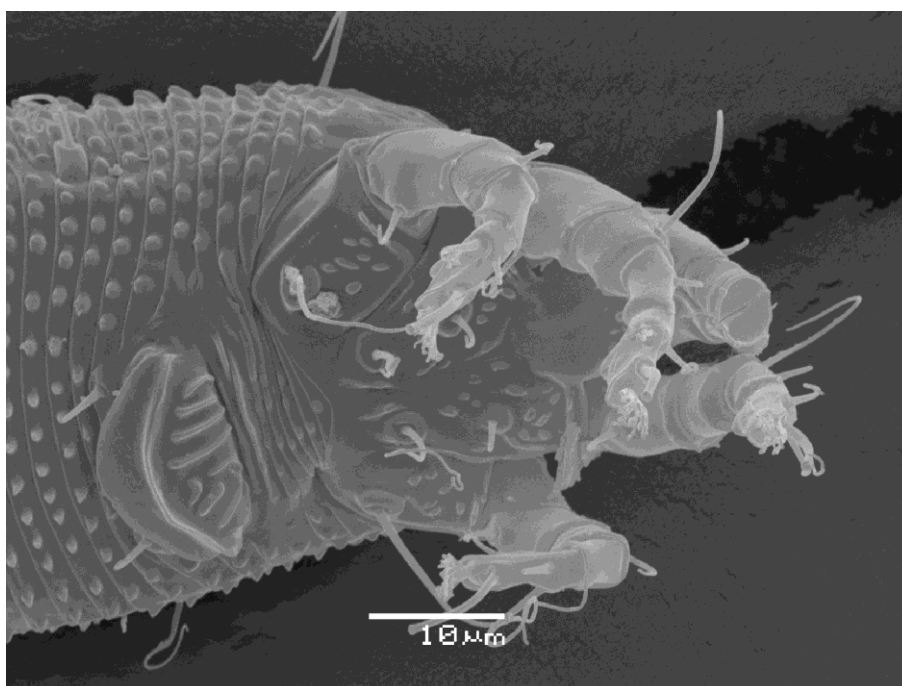
5.3.2 Elektronová mikroskopie vlnovníka hrušňového (*Eriophyes pyri*)

Na základě výsledných fotografií z elektronové mikroskopie byla potvrzena hypotéza, že se opravdu jedná o vlnovníka hrušňového. Fotografie z elektronové mikroskopie zhotovil prof. Ing. Pavel Ryšánek, CSc. na přírodovědecké fakultě Karlovy univerzity v Praze.

Obrázek 11. Ventrální strana vlnovníka hrušňového (*Eriophyes pyri*).



Obrázek 12. Detail hlavové části těla *Eriophyes pyri*.



6 Diskuse

6.1 Hostitelský okruh EMARaV

Onemocnění kroužkovitosti jeřábu ptačího bylo pozorováno na volně rostoucích jeřábech již v šedesátých letech ve Finsku, Německu a později i v dalších zemích včetně České republiky (Jamalainen, 1957; Kegler, 1960; Schmelzer, 1977; Cooper, 1979; Polák *et al.*, 1990; Cooper, 1993; Polák a Zieglerová, 1996;). Z většiny dosavadních výzkumů, které probíhaly převážně ve výše zmíněných zemích, byl výskyt viru kroužkovitosti jeřábu potvrzen pouze na jeřábu ptačím (*Sorbus aucuparia*), který byl do dnešní doby považován za jeho jediného hostitele. Možnost širšího hostitelského okruhu infekčního agens způsobujícího kroužkovitosti jeřábu byla poprvé předmětem studia v 60. letech na Slovensku, kde byl realizován pokus zaměřený na přenos neznámého patogena na několik botanických druhů. Přenos patogena byl uskutečněn běžnou očkovací metodou a vyhodnocován na základě vyvolaných symptomů. Naočkovány byly 2-3 leté semenáče *S. aucuparia*, *P. communis*, *Amelanchier canadensis*, *M. silvestris*, *Cydonia oblonga*, *Spirea van Houttei*, *Cotoneaster horizontalis*, *Cotoneaster multiflora*, *Crataegus crus-galli*, *Sorbus intermedia* a *Persica vulgaris*. Z uvedených taxonů byl přenos úspěšný pouze u tří zástupců druhů *S. aucuparia*, *P. communis* a *A. canadensis* (Králíková, 1961). Pozorované příznaky u nových infikovaných druhů se shodovaly se symptomy spojovanými s infekcí EMARaV na jeřábu ptačím.

Do dnešní doby žádná další studie zaměřená na hostitelský okruh EMARaV neproběhla, a právě proto bylo předmětem této diplomové práce nalezení nových hostitelských druhů rostlin. Z uvedených výsledků na přítomnost EMARaV u nově zkoušených taxonů, jež jsou uvedeny v kapitole 5, vyplývá, že patogen není omezen pouze na jednoho hostitele, jehož představitelem je jeřáb ptačí, ale napadá i další druhy rostlin, jmenovitě *S. torminalis*, *S. aria*, *S. rotundifolia*, *S. intermedia I.*, *S. intermedia II.*, *S. × thuringiaca* cv. Fastigiata, *S. koehneana*, *Sorbaronia* spp., *S. commixta*, *A. spicata*, *A. ovalis*, *A. Lamarkii*, *A. alnifolia*, *Malus* spp., *Pyrus* spp., *C. laevigata* a *Aronia* spp. Získané výsledky naší studie tedy potvrzují výsledky slovenského výzkumu ze sedmdesátých let (Králíková, 1961) využívajícího pouze diagnostických metod založených na symptomatologii patogena.

Výsledky testů analýz z roku 2012 na katedře ochrany rostlin v rámci diplomové práce Ing. Michala Konradyho se v porovnání s aktuálním vyhodnocením hned v několika případech liší. V roce 2012 byla na základě provedených analýz vyloučena možnost uznání několika testovaných druhů jako hostitelských rostlin pro EMARaV. Jednalo se o zástupce

druhů *A. alnifolia*, *S. aria*, *S. intermedia* II. a *S. × thuringiaca* cv. Fastigiata. Toto tvrzení bylo ovšem v této předkládané studii na základě nově získaných výsledků vyvráceno. V roce 2013 byla rovněž pozorována poměrně vyšší četnost pozitivních rostlin u ostatních testovaných druhů oproti analýzám z předešlého roku. Příčina, která by vysvětlila rozdíly se výsledky z let 2012 a 2013 není jednoznačná a může být výsledkem více působících vlivů. Nabízí se několik možností, které by mohly průběh testování ovlivnit.

Vzorky, které byly v roce 2012 izolovány metodou „silika“ dle Rott a Jelkmann (2001), byly o rok později izolovány stejnou metodou, ovšem s přidáním fenolu a chloroformu. Rozdíly by tedy mohly být způsobeny nevhodně vybranou izolační metodou, která by mohla zapříčinit nedostatečně kvalitní izolaci RNA pro další analýzu RT–PCR k detekci virového patogena. Podrobněji je problematika izolačních metod popsána v následující kapitole.

K ověření správnosti dosažených výsledků pomocí vybrané molekulární metody (RT–PCR) je vhodné metodu alespoň jednou zopakovat k eliminaci možných vzniklých falešně pozitivních či falešně negativních výsledků během prováděné analýzy. V rámci této diplomové práce bylo testování provedeno celkem třikrát, kdežto v roce 2012 bylo uskutečněno pouze jednorázové testování. Pokud se tedy během prováděné metody vyskytla nedopatřením jakákoliv chyba, nebyla objevena a výsledek byl vyhodnocen jako tzv. falešně negativní.

Zajímavou skutečností je rovněž značné kolísání koncentrace viru v rostlině během roku. Teoreticky by tedy v případě odběru vzorků v nevhodnou dobu, mohla být pravděpodobnost nálezu patogena značně snížena a proto výsledky z opakovaného testování v průběhu roku, jsou jistě věrohodnější.

S rozšířením hostitelského okruhu virového patogena EMARaV na nové hostitele se zvyšuje i jeho význam. Jeřáb ptačí (*S. aucuparia*) jako volně rostoucí dřevina, je v našich podmínkách hojně zastoupen. V současné době je rovněž značně využívanou dřevinou nejen v okrasných zahradách či parcích, vzhledem k jeho zářivým červeným plodům, ale je vysazován i v alejích podél cest a ve městech, díky jeho odolnosti k imisím. Pro jiné druhy jeřábů je *S. aucuparia* využíván i jako podnož (Ryšánek, 2012; Kegler, 1960; Ebrahim-Nesbat a Izadpanah, 1992; Polák a Zieglerová, 1996). Objevení dalších hostitelských druhů, mezi které patří zástupci často využívaných okrasných dřevin a rovněž dřevin ovocných (*Pyrus* spp., *Malus* spp.), poukazuje na možné riziko nekontrolovatelného šíření viru a jeho stoupající ekonomický význam. Zatím nebylo jednoznačně prokázáno, že by samotný virus kroužkovitosti jeřábu způsoboval úhyn napadených stromů. Ovšem v několika případech byly

s patogenem EMARaV spojovány i příznaky zakrslosti či dokonce samotné chřadnutí a odumírání celého stromu (Ryšánek, 2012; Führling a Büttner, 1995). To pravděpodobně souvisí s individuální odolností každého infikovaného jedince. Častějším nebezpečím, které napadeným hostitelům hrozí, je jejich možná sekundární infekce dalšími patogeny (Garret *et al.*, 1985; Werner *et al.*, 1997). Rostliny napadené infekcí EMARaV, jsou náchylnější k druhotným infekcím, vzhledem k jejich snížené obranyschopnosti z důvodu působení primárních stresových faktorů, než rostliny zdravé. Právě tato kombinace může vést až k samotnému úhynu stromu.

6.2 Metody izolace RNA

U dřevin je obvykle detekce virů velmi obtížná. Důvodem je často jejich nízká a nerovnoměrná koncentrace v rostlinném pletivu (Garrett *et al.*, 1985; Werner *et al.*, 1997). Analýza rostlin infikovaných virovým patogenem je navíc zkomplikována přítomností sekundárních metabolitů, jako jsou taniny a polysacharidy a to zejména v jejich pozdní vegetativní fázi (Clark *et al.*, 1976; Newbury a Possingham, 1977; Singh *et al.*, 2002). Z těchto důvodů jsou obvykle běžně aplikované izolační metody nedostačující, tedy neschopné získat celkovou RNA v dostatečné čistotě a koncentraci.

V rámci této diplomové práce bylo testováno celkem pět různých postupů izolací celkové RNA. Hlavním cílem těchto pokusů bylo vyhodnocení, která z uvedených metod bude z hlediska kvality a kvantity vyizolovaná RNA z různých rostlinných vzorků (*Crataegus* spp., *Malus* spp., *Sorbus* spp., *Aronia* spp.) nejvhodnější. Právě izolace pomocí „silika“ metodou dle Rott a Jelkmann (2001) v modifikaci II s fenol-chloroformem vykazovala u všech testovaných druhů rostlin nejlepší výsledky. Je tedy pravděpodobné, že přítomnost fenolu a chloroformu snižuje přítomnost inhibičních látek v podobě sekundárních metabolitů rostlin a zvyšuje tak kvalitu a výtěžnost izolované RNA. Lze ji tedy doporučit k izolacím RNA u problematických dřevin. Naopak metody *TriPure Isolation Reagent* (Roche) a fenol-chloroformová izolační metoda dle Sambrook a Russel (2001) byly hodnoceny jako nedostatečné, a proto nevhodné k izolacím RNA u vybraných taxonomických druhů.

Testované rostlinné druhy (*Crataegus* spp., *Malus* spp., *Sorbus* spp., *Aronia* spp.) se vzájemně svým chemickým složením liší, což následně významně ovlivnilo samotný proces izolace celkové RNA. Z hodnocených druhů v rámci všech izolačních metod vycházely na základě kvantity a kvality RNA nejlépe jabloně a nejvíce problematickou dřevinou byl jeřáb.

Vzhledem k tomu, že byl v rámci naší práce hlavním rostlinným materiálem právě jeřáb, byl na výběr vhodné izolační metody kladen oprávněně velký důraz.

6.3 Vlnovník hrušňový jako potenciální vektor EMARaV

Šíření viru kroužkovitosti jeřábu ve volné přírodě nebylo stále objasněno (Nienhaus a Castello, 1989). Pokusy zaměřené na mechanický přenos viru byly neúspěšné, stejně tak nebyl prokázán ani přenos viru semeny či pylem (Benthack *et al.*, 2005; Mielke a Muehlbach, 2007). Prozatím byl doložen přenos EMARaV pouze pomocí očkování a roubování (Führling a Büttner, 1995; Králiková, 1961). Existuje předpoklad, že se EMARaV v přírodě šíří prostřednictvím vektoru vlnovníka hrušňového (*Eriophyes pyri*), který se často vyskytuje právě na EMARaV infikovaných jeřábech. Mezi jeho zdroje potravy rovněž patří i řada rostlin z čeledi *Rosaceae*, včetně hrušní a jabloní (Mielke *et al.*, 2010), které nově spadají i do hostitelského okruhu viru kroužkovitosti jeřábu, jak bylo v rámci této diplomové práce prokázáno. Mohla by tu být tedy souvislost přenosu EMARaV z infikovaných jeřábů na jeho další hostitele právě prostřednictvím vlnovníka hrušňového. Dalším předpokladem, který poukazuje na vlnovníka jako potenciálního přenašeče EMARaV je jeho taxonomické zařazení v čeledi vlnovníkovití (*Eriophyidae*), jehož zástupci jsou velmi často vektory virů z rodů *Rymovirus*, *Tritimovirus* a *Allexivirus* (Martelli *et al.*, 2007, Slykhuis, 1980). Současně byl prokázán blízký fylogenetický vztah EMARaV s rostlinnými viry PPSMV, MRSV a FMV (Elbeaino *et al.*, 2009; Mielke a Muehlbach, 2007; Walia *et al.*, 2009), jejichž vektory jsou rovněž roztoči z čeledi vlnovníkovití (Flock a Wallace, 1955; Kulkarni *et al.*, 2002; Seifers *et al.*, 1997). Nejnovější studie, zaměřená na vlnovníka hrušňového, jako domnělého přenašeče viru kroužkovitosti jeřábu, navíc dokázala přítomnost EMARaV přímo v těle *E. pyri* (Mielke *et al.*, 2010).

6.4 Přenos vlnovníka hrušňového (*Eriophyes pyri*, syn. *Phytoptus pyri*)

Příčina neúspěšných pokusů přenosu vlnovníka hrušňového na zdravé listy jeřábu ptačího není zcela objasněna. Ačkoliv byl přenos uskutečňován s nejvyšší možnou opatrností, mohlo dojít k mechanickému poškození vlnovníků při jejich samotném odběru jehlou či při sklepávání vlnovníků z jehly do připraveného uzavíratelného víčka. V případě takového poranění jejich životaschopnost významně klesá (Gray a Banerjee, 1999; Mielke *et al.*, 2007; Mielke *et al.*, 2008; Roberts *et al.*, 1994), což by vysvětlovalo jejich brzké úmrtí, nebo nedostatek sil a energie k jejich přemístění na zdravý list. Dalším faktorem, který by mohl ovlivnit životaschopnost roztočů, je nedostatek vzduchu. Je možné, že přeneseným roztočům nepostačoval pouze dostupný zdroj kyslíku v samotném víčku a potřebovali přísun čerstvého vzduchu, který jim byl v uzavřeném víčku znemožněn. Mohlo tak dojít k jejich udušení.

Nelze ovšem vyloučit ani další možnou příčinu nezdaru přenosu roztočů, a to nevhodné termíny odběru rostlinného materiálu s vlnovníky v době, kdy jsou nejvíce aktivní. V rámci této práce byli roztoči odebíráni převážně během letního období. Mielke *et al.* (2009) uvádějí, že nejlepší doba pro jejich odběr a přenos patogena je začátek léta. Je tedy možné, že se pozdější termín odběru vlnovníků může podílet na negativních výsledcích přenosu. Zda je toto kritérium skutečně natolik podstatné a má-li vliv na životaschopnost přenášených roztočů je prozatím předmětem další studie, která pokračuje na katedře ochrany rostlin.

7 Závěr

Předpoklad širšího hostitelského okruhu EMARaV byl potvrzen. Nově popsány hostiteli viru kroužkovitosti jeřábu jsou zástupci druhů *S. torminalis*, *S. aria*, *S. rotundifolia*, *S. intermedia I.*, *S. intermedia II.*, *S. × thuringiaca* cv. *Fastigiata*, *S. koehneana*, *Sorbaronia* spp., *S. commixta*, *A. spicata*, *A. ovalis*, *A. Lamarkii*, *A. alnifolia*, *Malus* spp., *Pyrus* spp., *C. laevigata* a *Aronia* spp. z čeledi *Rosaceae*. Zástupci druhů *S. aria*, *S. torminalis*, *S. commixta*, *Malus* spp., *Pyrus* spp. a *Crataegus laevigata* byly bezpříznakové. Ostatní testované druhy vykazovaly charakteristické symptomy v podobě žlutých chlorotických skvrn nepravidelných velikostí a tvarů. U zástupce druhu *S. intermedia I.* byly listy navíc výrazně deformované.

Z testovaných izolačních metod byla z hlediska čistoty, koncentrace a integrity izolované RNA vybrána jako nejvhodnější metoda „silika“ dle Rott a Jelkmann (2001) v modifikaci II. (fenol-chloroform), která byla následně využívána v rámci všech testovaných rostlinných druhů k detekci EMARaV.

Přenos EMARaV pomocí vektoru vlnovníka hrušňového (*Eriophyes pyri*) na zdravé jedince se nakonec nepodařilo prokázat z důvodu neúspěšného přenosu vlnovníků na nové listy. Ani v jednom z mnoha zkoušených pokusů přenosu vlnovníků na rostliny se z neznámých důvodů nepodařilo udržet roztoče životaschopné.

Úspěšná příprava preparátu roztoče pro elektronovou mikroskopii a jeho výsledná fotografická dokumentace potvrzují identifikaci vlnovníka hrušňového.

8 Seznam použité literatury

- Aas, G., Holdenrieder, O. 1992. Die Vogelbeere (*Sorbus aucuparia* L.) – der vielseitige Pionier. Wald Holz. 15. 48 – 50.
- Acikgöz, S., Döken, T. 2003. The determination of sampling time for dsRNA isolation of the agent of fig mosaic disease prevalent in Aegean region: Turkey. Acta Hort. 605. 307 – 310.
- Alberts, B. 2006. Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky. Espero. Ústí nad Labem. s. 630. ISBN: 80-902906-2-0.
- Amrine, J. W., Jr., Hindal, D. F. 1988. Rose rosette: a fatal disease of *multiflora* rose. West Virginia Univ. Agric. a Exp. Sta. Circ. Morgantown. 147. 4 pp.
- Amrine, J. W., Jr., Hindal, D. F., Williams, R., Appel, J., Stasny, T., Kassar, A. 1990. Rose rosette as a biocontrol of multiflora rose. Proc. South. Weed Sci. Soc. 43. 316 – 319.
- Amrine, J. W., Stasny, T. A. 1994. Catalog of the Eriophyidae (*Acarina: Prostigmata*) of the World. Michigan. USA. Indira Publishing House.
- Anderson, P. K., Cunningham, A. A., Patel, A. G., Moreles, F. J., Epstein, P. R., Daszak, P. 2004. Emerging infectious diseases in plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. Trends Ecol. Evolut. 19. 535 – 544.
- Anonym. Agropedia [online]. 6. ledna 2009 [cit. 2014 – 03 – 21]. Dostupné z <<http://agropedia.iitk.ac.in/content/sterility-mosaic-disease-pigeonpea>>.
- Anonym. International Committee on Taxonomy of Viruses [online]. 2014 [cit. 2014 – 03 – 29]. Dostupné z <<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>>.
- Astier S., Albouy J., Maury Y., Robaglia C., Lecoq H. 2007. Principles of Plant Virology, Genome, Pathogenicity, Virus Ecology. Science publishers. p. 472. ISBN: 978-1-57808-316-9.
- Atkinson, T. G., Grant, M. N. 1967. An evaluation of streak mosaic losses in winter wheat. Phytopathology. 57. 188 – 192.
- Benthack, W., Mielke, N., Büttner, C., Mühlbach, H. P. 2005. Double-stranded RNA pattern and partial sequence data indicate plant virus infection associated with ringspot disease of European mountain ash (*Sorbus aucuparia* L.) Arch. Virol. 150. 37 – 52.

- Berger, J. 1996. Buněčná a molekulární biologie. Tobiáš. Havlíčkův Brod. s. 167. ISBN: 80-85808-42-0.
- Brčák, J. 1971. Vztahy rostlinných virů k přenašečům. Academia. Praha. ISBN: neuvedeno.
- Brčák, J. 1983. Rostlinné viry. In: Urban, Z.: Základy fytopatologie. Státní pedagogické nakladatelství. Praha. s. 32 - 52.
- Castellano, M. A., Gattoni, G., Minafra, A., Conti, M., Martelli, G. P. 2007. Fig mosaic in Mexico and South Africa. *Journal of Plant Pathology*. 89. 441 – 444.
- Clark, M. F., Adams, A. N., Thresh, J. M., Casper, R. 1976. The detection of plum pox and other viruses in woody plants by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Acta Hort*. 67. 51 – 57.
- Clark, M. F., Adams, A. N. 1977. Characteristics of the microplate methods of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. gen. Virol*. 34. 476 - 483.
- Condit, I. J., Horne, W. T. 1933. A mosaic of the fig in California. *Phytopathology*. 23. 887 – 896.
- Connors, I. L. 1941. Twentieth Annual Report of The Canadian Plant Disease Survey 1940. Department of Agriculture. Ottawa. Canada. p. 98.
- Cooper, J. I. 1979. *Virus Diseases of Trees and Shrubs*. Institute of Terrestrial Ecology. Oxford. UK.
- Cooper, J. I. 1993. *Virus disease of trees and shrubs*, 2nd edn. Chapman and Hall. London.
- Crowe, F. J. 1983. Witches' broom of rose: A new outbreak in several central states. *Plant Dis*. 67. 544 - 546.
- Davis, R. S., Beddes, T. 2011. Eriophyid mites – bud, blister, gall and rust mites. *Utah Pests fact sheet*. 149 (11). 1 – 5.
- Doudrick, R. L. 1984. Etiological studies of rose rosette. M. S. thesis. University of Missouri, Columbia.
- Ebeling, W., Pence, R. J. 1950. A severe case of an uncommon type of injury by the fig mite. *Bull. Calif. Dept. Agr*. 39. 47 – 48.
- Ebrahim-Nesbat, F., Izadpanah, K. 1992. Viruslike particles associated with ringfleck mosaic of mountain ash and a mosaic disease of raspberry in the Bavarian Forest. *Eur. J. For. Path*. 22. 1 – 10.

- Elbeaino, T., Digiaro, M., Martelli, G. P. 2009. Complete nucleotide sequence of four viral RNA segments of fig mosaic virus. *Arch. Virol.* 154. 1719 – 1727.
- Elbeaino, T., Digiaro, M., Alabdullah, A., De Stradis, A., Minafra, A., Mielke, N., Castellano, M. A., Martelli, G. P. 2009. A multipartite single-stranded negative-sense RNA virus is the putative agent of fig mosaic disease. *J. Gen. Virol.* 90. 1281 – 1288.
- Emmer, I. M., Fanta, J., Kobus, A. T. 1998. Reversing borealization as a means to restore biodiversity in Central-European mountain forests – an example from the Krkonoše Mountains. Czech Republic. *Biodiv. Conserv.* 7. 229 – 247.
- Epstein, A. H., Hill, J. H., Nutter, F. W. 1997. Augmentation of rose rosette disease for biocontrol of multiflora rose (*Rosa multiflora*). *Weed Sci.* 45. 172 - 178.
- Falk, B. W., Salem, N. 2005. Fig mosaic. University of California. *Plant Pathology* 54. 112 – 125.
- Flock, R. A., Wallace, J. M. 1955. Transmission of fig mosaic by the eriophyid mite *Aceria ficus*. *Phytopathology.* 45. 52 – 54.
- Fritzsche, R., Karl, E., Lehmann, W., Proeseler, G. 1972. Tierische Vektoren pflanzenpathogener Viren. VEB Gustav Fischer Verlag. Jena. ISBN: neuvedeno.
- Fröhlich, G., Beyer, R., Kleiner, E. M. 1979. Wörterbücher der Biologie. Phytopathologie und Pflanzenschutz. VEB Gustav Fischer Verlag. Jena. ISBN: neuvedeno.
- Frost, W. E., Ridland, P. M. 1996. Grasses. In: Lindquist, E. E., Sabelis, M. W., Bruin, J. (eds). *Eriophyid Mites – Their Biology, Natural Enemies and Control*. Elsevier. Amsterdam. pp. 619–629.
- Führling, M., Büttner, C. 1995. Transmission experiments of viruses to woody seedlings (*Quercus robur* L. and *Sorbus aucuparia* L.) by grafting and mechanical inoculation. *Eur. J. For. Pathol.* 25. 129 – 135.
- Garret, R. G., Cooper, J. A., Smith, P. R. 1985. Virus Epidemiology and Control. In: Francki, R. I. B. (eds). *The Plant Viruses*. New York. Plenum Press. pp. 269 – 297.
- Ghanekar, A. M., Sheila, V. K., Beniwal, S. P. S., Reddy, M. V., Nene, Y. L. 1992. Sterility mosaic of pigeonpea. In: Singh, U. S., Mukhooadhyay, A. N., Kumar, J., Chaubey, H. S. (eds.). *Plant Diseases of International Importance: Diseases of Cereals and Pulses*. Vol. I. Prentice Hall. Upper Saddle River. NJ. pp. 415 - 428.
- Gray, S. M., Banerjee, N. 1999. Mechanisms of arthropod transmission of plant and animal viruses. *Microbiol. Mol Biol Rev.* 63. 128 – 148.

- Grimová, L., Ryšánek, P., Zouhar, M. 2011. First report of European mountain ash ringspot-associated virus in the Czech Republic. *Journal of Plant Pathology*. 93. (4). 4s. 86p.
- Harris, K. F., Maramorosch, K. 1981. *Pathogens, vectors, and plant diseases*. Academic Press. New York. London.
- Henson, J. M., Frenbch, R. 1993. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 31. 81 - 109.
- Hong, Ch., Hansen, M. A., Day, E. 2012. *Rose rosette disease*. Virginia Polytechnic Institute and State University. Plant Pathology, Physiology and Weed Science. p. 4.
- Hull, R. 1986. The potential for using dot-blot hybridisation in the detection of plant viruses. In: Jones, R. A. C., Torrance, L. (eds.). *Developments and application in virus testing*. Association of Applied Biologists. Wellesbourne. U. K. s. 3 - 12.
- Hull, R. 2009. *Comparative plant virology*. Elsevier Academic Press. London. p. 376. ISBN: 978-0-12-374154-7.
- Jamalainen, E. A. 1957. *On plant virus diseases and viruslike diseases in Finland*. Publications of the Finnish State Agricultural Research Board No. 158. Agricultural Research Centre. Tikkurila. Finland.
- Jermoljev, E., Pozděna, J. 1972. *Sérologie rostlinných patogenů*. Academia. Praha. 264 s. ISBN: neuvedeno.
- Jones, A. T. 2000. Black currant reversion disease-the probable causal agent, eriophyid mite vectors, epidemiology and prospects for control. *Virus Res.* 71. 71 – 84.
- Kallinen, A. K., Lindberg, I. L., Tugume, A. K., Valkonen, J. P. 2009. Detection, distribution, and genetic variability of European mountain ash ringspot-associated virus. *Phytopathology*. 99. 344 – 352.
- Kannaiyan, J., Nene, Y. L., Reddy, M. V., Ryan, J. G., Raju, T. N. 1984. Prevalence of pigeonpea disease and associated crop losses in Asia, Africa and the Americas. *Trop. Pest Manag.* 30. 62 – 71.
- Kazda, J., Prokinová, E., Kabíček, J., Jindra, Z., Stejskal, V. 2011. *Choroby a škodcovia poľných plodín, ovocia a zeleniny*. Profi Press. Nitra. s. 183. ISBN: 978-80-970572-1-3.
- Kegler, H. 1960. Das Ringfleckmosaik der Eberesche. *Phytopathol. Z.* 37. 214 – 216.

- Khan, J. A., Dijkstra, J. 2006. Handbook of Plant Virology. Food Product Press. New York. London. Oxford. p. 515. ISBN: 1-56022-979-9.
- Koubová, D. Virus čárkovitosti pšenice působí problémy. Agronavigátor [online]. 9. února 2011 [cit. 2014-03-21]. Dostupné z <<http://www.agronavigator.cz/default.asp?ids=103&ch=1&typ=1&val=108120>>.
- Králiková, K. 1961. Krůžkovitost' jarabiny v ČSSR. Bratislava. Biologia 16. 835 – 838.
- Kúdela, V., Bartoš, P., Čača, Z., Dirlbek, J., Frič, F., Lebede, A., Šebesta, J., Ulrychová, M., Valášková, E., Veselý, D. 1989. Obecná fytopatologie. Academia. Praha. s. 387. ISBN: 80-200-0156-5.
- Kulkarni, N. K., Kumar, L. P., Muniyappa, V., Jones Teifion, A., Reddy, D. V. R. 2002. Transmission of pigeon pea sterility mosaic virus by the eriophyid mite *Aceria cajani* (Acari: Arthropoda). Plant. Dis. 86. 1297 – 1302.
- Kulkarni, N. K., Reddy, A. S., Kumar, P. L., Vijaynarasimha, J., Rangaswamy, K. T., Muniyappa, V., Reddy, L. J., Saxena, K. B., Jones, A. T., Reddy, D. V. R. 2003. Broad-based resistance to *pigeonpea sterility mosaic disease* in accessions of *Cajanus scarabaeoides* (L.) Benth. Indian Journal of Plant Protection. 31 (1). 6 - 11.
- Kumari, S. 2009. Detection of Cherry Leaf Roll Virus and Strawberry Latent Ring Spot Virus by One-Step RT-PCR. Department of Virology vol. 45. 140 - 143.
- Lanoiselet, V. M., Hind-Lanoiselet, T. L., Murray, G. M. 2008. Studies and the seed transmission of wheat streak mosaic virus. Australasian Plant Pathology Society. 37. 584 – 588.
- Leeuwen, T. V., Witters, J., Nauen, R., Duso, C., Tirry, L. 2009. The control of eriophyoid mites: state of the art and future challenges. Exp. Appl. Acarol. 51. 205 – 224.
- Lindquist, E. E., Sabelis, M. W., Bruin, J. 1996. Eriophyoid Mites - their biology, natural enemies and control, volume 6. Elsevier Science B. V. Amsterdam. p. 790. ISBN: 0-444-88628-1.
- Manion, P. D. 1981. Tree disease concepts. Prentice-Hall. Inc. Englewood Cliffs.
- Martelli, G. P., Castellano, M. A., Laforteza, R. 1993. An ultrastructural study of fig mosaic. Phytopathol. Mediterr. 32. 33 – 43.
- Martelli, G. P., Adams, M. J., Kreuze, J. F., Dolja, W. 2007. Family Flexiviridae: a case study in virion and genome plasticity. Annu. Rev. Phytopathol. 45. 73 – 100.

- Matthews, R. E. F. 1981. Plant virology. Academic Press. London. ISBN: neuvedeno.
- Matthews, R. E. F. 1991. Plant Virology. 3rd edition. Academic Press. London. s. 835. ISBN: neuvedeno.
- Mellott, J. L., Krantz, G. W. 2003. Eriophyid Mites. Washington State University. 89. 1 – 3.
- Menzel W., Jelkmann W., Maiss, E. 2002. Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control. Journal of Virological Methods. 99. 81 - 92.
- Mielke, N., Muehlbach, H. P. 2007. A novel, multipartite, negativestrand RNA virus is associated with the ringspot disease of European mountain ash (*Sorbus aucuparia* L.). J. Gen. Virol. 88. 1337 – 1346.
- Mielke, N., Weber, M., Khan, S., Muehlbach, H. P. 2008. Detection of European mountain ash ringspot associated virus (EMARaV) in *Sorbus aucuparia* L. by a specific antiserum and reverse transcription PCR. For. Pathol. 38. 371 – 380.
- Mielke, N., Thoma, J., Schlattermund, N., Mühlbach, H. P. 2010. Detection of European mountain ash ringspot-associated virus-specific RNA and protein P3 in the pear leaf blister mite *Phytoptus pyri* (Eriophyidae). Arch Virol. 155. 987 – 991.
- Mielke, N., Mühlbach, H. P. 2012. *Emaravirus*: A Novel Genus of Multipartite, Negative Strand RNA Plant Viruses. Viruses. 4. 1515 - 1536.
- Neergaard, P. 1979. Seed pathology. Vol 1 and 2. MacMillan Press. London. Basingstoke. ISBN: neuvedeno.
- Newbury, H. J., Possingham, J. V. 1977. Factors affecting the extraction of intact ribonucleic acid from plant tissue containing interfering phenolic compounds. Plant Physiol. 60. 543 – 547.
- Nienhaus, F., Castello J. D. 1989. Viruses in forest trees. Annu. Rev. Phytopathol. 27. 165 – 186.
- Oldfield, G. N., Reddy, M. V., Nene, Y. L., Reed, W. 1981. Preliminary studies of the eriophyid vector of sterility mosaic. Int. Chickpea Pigeonpea Newsl. 1. 25 - 27.
- Oldfield, G. N., Proeseler, G. 1996. Eriophyoid mites as vectors of plant pathogens. In: Lindquist, E. E., Sabelis, M. W., Bruin, J. (eds) Eriophyoid mites - their biology, natural enemies and control. Elsevier. Amsterdam. pp. 259–275.
- Orlob, G. B. 1966. Feeding and transmission characteristics of *Aceria tulipae* Keifer as vector of wheat streak mosaic virus. Phytopathol. Z. 55. 218 – 238.

- Ouchterlony, O. 1958. Diffusion in gel methods for immunological analysis. *Progr. Allergy*. 5. 1 - 78.
- Polák, Z., Procházková, Z., Branišová, H. 1990. Recent findings of viruses of forest trees on the territory of the Czech Republic. *Arch Phytopathol Pflanzenschutz*. 26. 389 – 393.
- Polák, Z., Zieglerová, J. 1996. Towards ringspots and variegation in mountain ash leaves. *Z Pflanzenkr Pflanzenschutz*. 103. 432 – 435.
- Proeseler, G. 1973. The gall mite *Cecidophyopsis ribis* (Westw.) as pest of currants. *Arch. Phytopathol. u. Pflanzenschutz*. 9. 383 – 394.
- Raspé, O., Findlay, C., Jacquemart, A. L. 2000. *Sorbus aucuparia* L. *J. Ecol.* 88. 910 – 930.
- Raspé, O., Jacquemart, A. L. 1998. Allozyme diversity and genetic structure of European populations of *Sorbus aucuparia* L. (Rosaceae: Maloideae). *Heredity*. 81. 537 – 545.
- Robel, J., Bandte, M., Mühlbach, H. P., von Bargen, S., Büttner, C. 2013. Ein neuartiges Virus in *Sorbus aucuparia* L.: Nachweis und Verbreitung des European mountain ash ringspot-associated virus (EMARaV). In: Dujesiefken, D. (eds). *Jahrbuch der Baumpflege 2013*. Braunschweig. Haymarket Media. pp. 47–53.
- Roberts, I. M., Jones, A. T., Amrine, J. W. 1994. Ultrastructure of black currant gall mite, *Cecidophyopsis ribis* (Acari: Eriophyidae), the vector of the agent of reversion disease. *Ann. Appl. Biol.* 125. 447 – 455.
- Roche, Diagnostics. 2004. TriPure Isolation Reagent: Monophasic solution of phenol and guanidine thiocyanate for RNA, DNA, and protein isolation. Roche Applied Science.
- del Rosario, M. S., Sill, W. H. Jr. 1965. Physiological strains of *Aceria tulipae* and their relationships to transmission of wheat streak mosaic virus. *Phytopathology* 55. 1168 - 1175.
- Rosypal, S. 1994. *Bakteriologie a virologie*. vyd. 1. Scientia s.r.o. Praha. s. 67. ISBN: 80-85827-16-6.
- Rott, M. E., Jelkmann, W. 2001. Characterization and detection of several filamentous viruses of cherry: adaptation of an alternative cloning method (DOP-PCR), and modification of an RNA extraction protocol. *Eur. J. Plant Pathology*. 107. 411 – 420.

- Royalty, R. N., Perring, T. A. 1996. Nature of damage and its assessment. In: Lindquist, E. E., Sabelis, M. W., Bruin, J. (eds) Eriophyoid mites - their biology, natural enemies and control. Elsevier. Amsterdam. pp. 493 – 508.
- Ryšánek, P. 2012. Virus kroužkovitosti jeřábu ptačího a jeho rozšíření v České republice. Zahradnictví 11. 42 – 44.
- Sambrook, J., Russell, D. W. 2001. Molecular cloning. Laboratory manual. Third ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. New York.
- Sanchez-Sanchez, H. M., Henry, M., C'ardenas-Soriano, E., Alvizo-Villasana, H. F. 2001. Identification of wheat streakmosaic virus and its vector *Aceria tosichella* in Mexico. Plant Disease. 85. 13 – 17.
- Seifers, D. L., Harvey, T. L., Martin, T. J., Jensen, S. G. 1997. Identification of the wheat culm mite as the vector of the high plains virus of corn and wheat. Plant. Dis. 81. 1161 – 1166.
- Serrano, L., Ramon, J., Segarra, J., Medina, V., Achón, M. A., López, M. 2004. New approach in the identification of the causal agent of fig mosaic disease. Acta Hort. 657. 559 – 566.
- Seth, M. L. 1962. Transmission of pigeonpea sterility by an eriophyid mite. Ind. Phytopathol. 15. 225 - 227.
- Schmelzer, K. 1977. Zier-, Forst- und Wildgehölze. In: Schmelzer, K., Spaar, D. (eds). Pflanzliche Virologie. Akademie Verlag. Berlin. pp. 276 – 405.
- Singh, R. P., Nie, X., Singh, M., Coffin, R., Duplessis, P. 2002. Sodium sulfite inhibition of potato and cherry polyphenolics in nucleic acid extraction for virus detection by RT-PCR. J. Virol. Meth. 99. 123 – 131.
- Slykhuis, J. T. 1955. *Aceria tulipae* in relation to the spread of wheat streak mosaic. Phytopathology. 45. 116 – 128.
- Slykhuis, J. T. 1980. Mites. In: Harris, K. F., Maramorosch, K. (eds) Vectors of plant pathogens. Academia Press. New York. pp. 325 – 356.
- Stakman, E. C., Harrar, J. G. 1957. Principles of plant pathology. The Ronald Press. New York. ISBN: neuvedeno.
- Staples, R., Allington, W. B. 1956. Streak of wheat in Nebraska and its control. University of Nebraska. College of Agriculture Research Bulletin. 178. 1 – 41.

- Styer, W. E., Nault, L. R. 1996. Corn and grain plants. In: Lindquist, E. E., Sabelis, M. W., Bruin, J. (eds) Eriophyoid mites - their biology, natural enemies and control. Elsevier. Amsterdam. pp. 611 – 618.
- Šefrová, H. 2006. Rostlinolékařská entomologie. Konvoj. Brno. s. 257. ISBN: 80-7302-086-6.
- Šmarda, J., Doškař, J., Pantůček, R., Růžicková, V., Koptíková, J. 2008. Metody molekulární biologie. Masarykova univerzita. Brno. s. 188. ISBN: 978-80-210-3841-7.
- Špak, J. 2007. Diagnostika rostlinných virů. Ústav molekulární biologie rostlin. České Budějovice. 43 s. ISBN: neuvedeno.
- Tarr, S. A. J. 1972. The principles of plant pathology. MacMillan Press. London. ISBN: neuvedeno.
- Valkonen, J. P. T., Rännäli, M. 2010. First report of European mountain ash ringspot associated virus (EMARaV) in eastern Karelia in Russia. Plant Dis. 94. 921.
- Von Barga, S., Arndt, N., Robel, J., Jalkenen, R., Büttner C. 2013. Detection and genetic variability of European mountain ash ringspot-associated virus (EMARaV) in Sweden. Forest Pathol. 43 (5). 429 - 432.
- Walia, J. J., Salem, N. M., Falk, B. W. 2009. Partial sequence and survey analysis identify a multipartite, negative-sense RNA virus associated with fig mosaic. Plant Dis. 93. 4 – 10.
- Weihs, U. 1995. Die Eberesche – eine ökologisch wertvolle Baumart bei der Walderneuerung auf Problemstandorten. In: Landesanstalt für Ökologie. Bodenordnung und Forsten. Landesamt für Agrarordnung Nordrhein – Westfalen (ed). Weichlaubhölzer und Sukzessionsdynamik in der naturnahen Waldwirtschaft. Landwirtschaftsverlag. Münster. pp 69–82 (Schriftenreihe der Landesanstalt für Ökologie, Bodenordnung und Forsten, Landesamt für Agrarordnung Nordrhein-Westfalen. vol 4).
- Werner, R., Muehlbach, H. P., Büttner, C. 1997. Detection of Cherry leaf roll nepovirus (CLRV) in birch, beech and petunia by immuno-capture RT-PCR using a conserved primer pair. Eur. J. For. Path. 27. 309 – 318.

9 Seznam použitých zkratek

Zkratka	Anglický název	Český název
ACLSV	<i>Apple chlorotic leaf spot virus virus</i>	virus chlorotické skvrnitosti listů jabloně
ApMV	<i>Apple mosaic virus</i>	virus mozaiky jabloně
ASGV	<i>Apple stem grooving virus</i>	virus žlábkovitosti kmene jabloně
ASPV	<i>Apple stem pitting virus</i>	virus mělké vrásčitosti kmene jabloně
bp	pair of bases	pár bází
BRV	<i>Blackcurrant reversion virus</i>	virus zvratu černého rybízu
BYV	<i>Beet yellows virus</i>	virus žloutenky řepy
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid	komplementární deoxyribonukleová kyselina
CLRV	<i>Cherry leaf roll virus</i>	virus svinutky třešně
CMV	<i>Cucumber mosaic virus</i>	virus mozaiky okurky
DAS – ELISA	double antibody sandwich ELISA	double antibody sandwich ELISA
ddH ₂ O	double - distilled water	dvakrát destilovaná voda
DNA	deoxyribonucleic acid	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxyribonucleotide triphosphate	deoxyribonukleotid trifosfát
dsRNA	double – stranded ribonucleic acid	dvouvláknová robinukleová kyselina
DMP	double membrane particle	dvojitá membránová částice
DTT	dithiothreitol	dithiothreitol
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid	etylen diamin tetraoctová kyselina
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay	imunochemická testovací metoda na pevné fázi
EMARaV	<i>European mountain ash ringspot-associated virus</i>	virus kroužkovitosti jeřábu
EMARSD	<i>European mountain ash ringspot disease</i>	onemocnění kroužkovitosti jeřábu
EMBL	European molecular biology laboratory	evropská molekulárně biologická laboratoř
FMV	<i>Fig mosaic virus</i>	virus mozaiky figu
FP	forward primer	forwardový primer
ICTV	International committee on taxonomy of viruses	Mezinárodní komise pro taxonomii virů
IgG	immunoglobulin G	imunoglobulin G
LBVV	<i>Lettuce big vein virus</i>	virus žilkovitosti salátu
MRSV	<i>Maize red stripe virus</i>	<i>Maize red stripe virus</i>

Zkratka	Anglický název	Český název
PCR	polymerase chain reaction	polymerázová řetězová reakce
PLRV	<i>Potato leafroll virus</i>	virus svinutky bramboru
PPSMV	<i>Pigeonpea sterility mosaic virus</i>	<i>Pigeonpea sterility mosaic virus</i>
PVX	<i>Potato virus X</i>	X virus bramboru
PVY	<i>Potato virus Y</i>	Y – virus bramboru
RNA	ribonucleic acid	ribonukleová kyselina
RP	reverse primer	reverzní primer
RPM	rounds per minute	otáčky za minutu
RRV	<i>Rose rosette virus</i>	<i>Rose rosette virus</i>
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction	reverzní transkripce polymerázová řetězová reakce
SDS	sodium dodecyl sulphate	dodecylsulfát sodný
spp.	species	druhy
ssRNA	Single-stranded ribonucleic acid	jednovláčenná ribonukleová kyselina
Taq polymeráza	DNA polymerase based on <i>Thermus aquaticus</i>	DNA polymeráza získána z <i>Thermus aquaticus</i>
TMV	<i>Tobacco mosaic virus</i>	virus tabákové mozaiky
TRSV	<i>Tobacco ringspot virus</i>	virus kroužkovitosti tabáku
WSMV	<i>Wheat streak mosaic virus</i>	virus čárkovité mozaiky pšenice