

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2018

Hana Novotná

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



Charakteristika RNA viromu bezu černého
(*Sambucus nigra*)

Bakalářská práce

Hana Novotná

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2018

Vedoucí práce: Mgr. Dana Šafářová Ph.D

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně za pomoci vedoucí práce Mgr. Dany Šafářové, Ph.D. a uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne:

Podpis:

SOUHRN

Bakalářská práce pojednává o virech infikujících bez černý (*Sambucus nigra* L.). Teoretická část krátce charakterizuje bez černý a dále se zabývá taxonomií virů infikujících bez černý, jejich okruhem hostitelů a příznaky, které na nich způsobují, jejich geografickým rozšířením, způsoby přenosu a molekulární charakteristikou. Konkrétně popisuje viry *Cherry leaf roll virus* (CLRV), *Arabis mosaic virus* (ArMV), *Tomato black ring virus* (TBRV), *Tomato ringspot virus* (ToRSV), *Tobacco ringspot virus* (TRSV), *Cherry rasp leaf virus* (CRLV) a *Strawberry latent ringspot virus* (SLRSV) z čeledi *Secoviridae*, *Sambucus virus S* (SVS), *Apple mosaic virus* (ApMV) a *Cucumber mosaic virus* (CMV) z čeledi *Bromoviridae*, viry z rodu *Carlavirus* (čeleď *Betaflexiviridae*), *Elderberry latent virus* (ELV), *Tomato bushy stunt virus* (TBSV) a *Tobacco necrosis virus* (TNV) z čeledi *Tombusviridae* a *Tobacco mosaic virus* (TMV) z čeledi *Virgaviridae*.

Praktická část je zaměřena na detekci virů ze vzorků listů bezu. Vzorky byly testovány na přítomnost CLRV, ArMV, ApMV, viry rodu *Carlavirus*, TBRV a SLRSV. Byla potvrzena přítomnost CLRV, virů z rodu *Carlavirus* a ArMV. Ze 40 testovaných vzorků byl CLRV detekován ve 12 z nich, viry rodu *Carlavirus* ve 21 z nich a ArMV byl přítomen jen v jednom vzorku. U některých bezů se vyskytla směsná infekce způsobená viry CLRV a carlaviry.

SUMMARY

The bachelor thesis is about viruses that infect black elderberry (*Sambucus nigra* L.). Theoretical part briefly characterizes black elderberry. Then it talks about the taxonomy of viruses infecting black elderberry, their host range, the symptoms they cause, their geographical distribution, the manners of transmission and their molecular characterization. Particularly, it describes viruses *Cherry leaf roll virus* (CLRV), *Arabis mosaic virus* (ArMV), *Tomato black ring virus* (TBRV), *Tomato ringspot virus* (ToRSV), *Tobacco ringspot virus* (TRSV), *Cherry rasp leaf virus* (CRLV) and *Strawberry latent ringspot virus* (SLRSV) from the family *Secoviridae*, *Sambucus virus S* (SVS), *Apple mosaic virus* (ApMV) and *Cucumber mosaic virus* (CMV) from the family *Bromoviridae*, viruses of the genus *Carlavirus* (family *Betaflexiviridae*), *Elderberry latent virus* (ELV), *Tomato bushy stunt virus* (TBSV) and *Tobacco necrosis virus* (TNV) from the family *Tombusviridae* and *Tobacco mosaic virus* (TMV) from the family *Virgaviridae*.

The experimental part is focused on the detection of viruses in samples of elderberry leaves. The samples were tested for the presence of CLRV, ArMV, ApMV, viruses of the genus *Carlavirus*, TBRV and SLRSV. The presence of CLRV, viruses of the genus *Carlavirus* and ArMV was confirmed. Out of the 40 tested samples CLRV was present in 12 of them, the viruses of the genus *Carlavirus* were present in 21 of them and ArMV was detected in a single sample. Some elderberries suffered mixed infection of CLRV and carlaviruses.

Poděkování:

Děkuji Mgr. Daně Šafářové, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost, vztřícnost a čas, který mi věnovala během zpracovávání bakalářské práce. Dále děkuji paní Janě Veselské a prof. RNDr. Milanu Navrátilovi, CSc. za pomoc a rady při práci v laboratoři. V neposlední řadě patří mé poděkování také mým rodičům a partnerovi za psychickou podporu.

OBSAH

1	Úvod	1
2	Cíle práce.....	2
3	Literární přehled	3
3.1	Bez černý (<i>Sambucus nigra</i> L.)	3
3.1.1	Taxonomické zařazení.....	3
3.1.2	Rozšíření a pěstování.....	3
3.1.3	Využití	4
3.2	RNA viry infikující bez černý	4
3.2.1	Čeleď <i>Secoviridae</i>	5
3.2.2	Čeleď <i>Bromoviridae</i>	11
3.2.3	Čeleď <i>Betaflexiviridae</i>	14
3.2.4	Čeleď <i>Tombusviridae</i>	16
3.2.5	Čeleď <i>Virgaviridae</i>	20
4	Materiál a metody.....	22
4.1	Biologický materiál.....	22
4.2	Použité chemikálie, soupravy a roztoky	22
4.3	Použité přístroje	23
4.4	Použité experimentální a vyhodnocovací postupy.....	23
4.4.1	Izolace RNA	23
4.4.2	Reverzní transkripce	24
4.4.3	Detekce virů polymerázovou řetězovou reakcí (PCR).....	25
4.4.4	Elektroforetická separace	29
5	Výsledky.....	30
5.1	Detekce CLRV	30
5.2	Detekce ArMV	31

5.3	Detekce ApMV	31
5.4	Detekce virů rodu <i>Carlavirus</i>	31
5.5	Detekce TBRV	33
5.6	Detekce SLRSV	33
6	Diskuze	34
7	Závěr	37
8	Seznam použité literatury	38

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

+ssRNA	jednovláknová RNA s funkcí mRNA
-ssRNA	templátová RNA pro +ssRNA
AIDS	syndrom získané lidské imunitní nedostatečnosti
ApMV	<i>Apple mosaic virus</i>
ArMV	<i>Arabis mosaic virus</i>
BBMV	<i>Broad bean mottle virus</i>
BIScV	<i>Blueberry scorch virus</i>
cDNA	komplementární DNA
CLRv	<i>Cherry leaf roll virus</i>
CMV	<i>Cucumber mosaic virus</i>
CP	plášťový protein (coat protein)
CRLV	<i>Cherry rasp leaf virus</i>
ELV	<i>Elderberry latent virus</i>
EIVA	Elderberry virus A
EIVB	Elderberry virus B
EIVC	Elderberry virus C
EIVD	Elderberry virus D
EIVE	Elderberry virus E
ESLV	<i>Elderberry symptomless virus</i>
FIV	<i>Feline immunodeficiency virus</i>
GarCLV	<i>Garlic common latent virus</i>
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>
HpMV	<i>Hop mosaic virus</i>
MP	movement protein
mRNA	mediátorová RNA
MYFV	<i>Melandrium yellow fleck virus</i>
ORF	otevřený čtecí rámeček (open reading frame)
P1A	kofaktor proteázy
PeIRSV	<i>Pelargonium ringspot virus</i>
PeSV	<i>Pea streak virus</i>
RdRp	RNA dependentní RNA polymeráza

RNAi	RNA interference
RT	reverzní transkripce
sgRNA	subgenomická RNA
SLRSV	<i>Strawberry latent ringspot virus</i>
SLV	<i>Shallot latent virus</i>
ssRNA	jednovláknová RNA
TBRV	<i>Tomato black ring virus</i>
TBSV	<i>Tomato bushy stunt virus</i>
TGB	'triple gene block'
TMV	<i>Tobacco mosaic virus</i>
TNV	<i>Tobacco necrosis virus</i>
ToRSV	<i>Tomato ringspot virus</i>
tRNA	transferová RNA
TRSV	<i>Tobacco ringspot virus</i>
UTR	nepřekládaná oblast (untranslated region)
VPg	protein asociovaný s genomem s funkcí 5' čepičky (viral protein genome-linked)

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Uspořádání genomu virů rodu *Nepovirus*

Obrázek 2: Uspořádání genomu virů čeledi *Bromoviridae*

Obrázek 3: Uspořádání genomu virů rodu *Carlavirus*

Obrázek 4: Uspořádání genomu virů čeledi *Tombusviridae*

Obrázek 5: Uspořádání genomu virů rodu *Tobamovirus*

Obrázek 6: Detekce CLRV pomocí RT-PCR u části vzorků

Obrázek 7: Detekce ArMV pomocí nested RT-PCR u části vzorků

Obrázek 8: Detekce virů rodu *Carlavirus* pomocí RT-PCR u části vzorků

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Složení RT reakčních směsí pro jeden vzorek

Tabulka 2: Složení PCR reakční směsi pro jeden vzorek

Tabulka 3: Podmínky PCR pro detekci CLRV a 'direct' PCR pro SLRSV

Tabulka 4: Podmínky PCR pro detekci ApMV, 'direct' PCR pro ArMV a nested PCR pro SLRSV

Tabulka 5: Podmínky nested PCR pro ArMV

Tabulka 6: Podmínky PCR pro detekci virů rodu *Carlavirus*

Tabulka 7: Podmínky PCR pro detekci TBRV

Tabulka 8: Seznam použitých primerů

Tabulka 9: Vzorke pozitivní pro viry rodu *Carlavirus* podle lokalit, ze kterých pocházejí

1 ÚVOD

Virom je soubor genetické informace všech virů v daném hostiteli. Viry u rostlin způsobují řadu příznaků, chlorotické a nekrotické skvrny na listech, morfologické změny listů, zakrslost, snížení plodnosti nebo znehodnocení plodů. V některých případech dochází i k úhynu infikovaných rostlin. Některé infekce jsou latentní, ale působí synergicky v případě infekce dalším virem. Informace z výzkumu virů rostlin se využívají v zemědělství. Aby se zamezilo hospodářským ztrátám, používá se výsadbový materiál zkontrolovaný na přítomnost virů, které danou rostlinu infikují. V případě výskytu infekce u hospodářsky pěstovaných rostlin je možné zabránit jejímu dalšímu šíření omezením pohybu a šíření vektorů tohoto viru. Zdrojem infekce mohou být planě rostoucí rostliny v okolí polí.

Pěstování bezu černého se rozšiřuje díky jeho pozitivnímu vlivu na lidské zdraví. Jeho plody jsou využívány ve farmacii při prevenci proti virovým infekcím.

K detekci konkrétních virů v rostlinném materiálu se využívá RT-PCR se specifickými primery.

2 CÍLE PRÁCE

- Shromáždění literárních zdrojů a vypracování literární rešerše na téma „Charakteristika RNA virů infikujících zástupce rodu *Sambucus*“.
- Analýza vybraného souboru vzorků bezu černého a detekce virů s důrazem na nepoviry, zvládnutí technik izolace RNA, RT-PCR, elektroforéza.
- Charakteristika RNA viromu symptomatických a nesymptomatických vzorků.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Bez černý (*Sambucus nigra* L.)

Bez černý je dřevina, může se jednat o strom i keř. Keřovitá varianta dosahuje výšky 5 m, stromovitá až 10 m. Větve mladých rostlin mají zelenou nebo šedozelenou barvu a jejich povrch bývá brázděn lenticelami. Starší větve jsou tmavší, zbarvené více došeda nebo dohněda. Větve obsahují širokou bílou nebo nažloutlou dřeň. Bez má mělký kořenový systém rozrůstající se do velké plochy. Listy jsou vstřícné, lichozpeřené a mají krátký řapík. Čepel lístků má eliptický nebo vejčité eliptický tvar a pilovitě zubatý okraj. Vrchol lístků je zašpičatělý. Délka lístků se pohybuje mezi 4 až 8 cm a šířka mezi 1,5 až 3 cm. Květenstvím je plochý vrcholík, který má průměr 10-25 cm. Květenství je tvořeno drobnými bílými nebo nažloutlými vonnými květy. Květy jsou oboupohlavné, objevují se v květnu až v červnu. Plodem je drobná (5-8 mm velká), lesklá, dužnatá, černo-fialová peckovice. Plod nese 3-5 vejčitých až elipsoidních semen.

Bez černý roste především na pasekách, světlinách, okrajích lesů, ve světlých listnatých a lužních lesích, v obcích a podél vodních toků. Vyhovují mu vlhké, humózní půdy bohaté na dusík. Je schopen odolávat klimatickým extrémům (Slavík, 2010).

3.1.1 Taxonomické zařazení

Do druhu *Sambucus nigra* se kromě evropského poddruhu *Sambucus nigra* subsp. *nigra* nově řadí i další poddruhy, které byly původně považovány za samostatné druhy. Nejvýznamějším z nich je americký poddruh *Sambucus nigra* subsp. *canadensis* (Applequist, 2015).

Bez černý patří do čeledi bezovité (*Sambucaceae*) (Slavík, 2010). Dříve byl bez řazen do čeledi zimolezovité (*Caprifoliaceae*), která ale nebyla monofyletická. Bez je součástí řádu štětkotvaré (Dipsacales) (Donoghue a kol., 2001).

3.1.2 Rozšíření a pěstování

Evropský poddruh bezu černého (*S. n.* subsp. *nigra*) je rozšířen v Evropě kromě nejsevernějších oblastí, v Malé Asii a na Kavkaze. Byl zavlečen i na ostrovy ve Středozemním moři a do severní Afriky. V České republice je rozšířen po celém území kromě nejvyšších poloh (Slavík, 2010). Americký poddruh (*S. n.* subsp. *canadensis*) je původní rostlinou na východě Severní Ameriky a ve Střední Americe (Applequist, 2015).

Bez černý je pěstován v zahradách kolem domů, některé jeho kultivary i v parcích (Slavík, 2010). Mezi jeho okrasné formy patří *Sambucus nigra* f. *alba*, *S. nigra* f. *aurea*, *S. nigra* f. *laciniata* a *S. nigra* f. *pendula* (EPPO, 2008). Komerční zemědělská produkce je soustředěna do Dánska, Itálie, Rakouska a Německa (Mohebalian a kol., 2012). Nejčastěji pěstovaným kultivarem v Evropě je 'Haschberg', který je využíván pro produkci plodů (Veberic a kol., 2009). V Severní Americe je bez pěstován v menším měřítku než v Evropě, nicméně jeho produkce stále narůstá. Ve Spojených státech bývá nejčastěji pěstován poddruh *S. n.* subsp. *canadensis*, protože pro evropský poddruh *S. n.* subsp. *nigra* zde nejsou vhodné podmínky. Je snaha vyšlechtit kultivar evropského poddruhu bezu černého, který by bez problémů rostl i v Severní Americe (Thomas a kol., 2015).

3.1.3 Využití

Bez černý je medonosná dřevina. Květy a plody bezu bývají využívány jako potravina nebo k lidovému léčení. Zpracovává se i ve farmaceutickém průmyslu. Květy slouží k přípravě nápojů. Z plodů jsou připravovány zavařeniny, povidla, šťávy a vína. Ze zralých plodů se získává barvivo. Plody obsahují vitamíny A, B6 a C, dále také vápník, železo a některé antioxidanty. Listy by neměly být konzumovány, protože obsahují jedovatý glykosid sambucinigrin. Květy snižují horečku, působí močopudně a protizánětlivě, podporují vykašlávání a mohou mít i mírný stimulační účinek na tvorbu mléka u kojících žen. Plody mírní bolest při migrénách, mají projímavý účinek, pomáhají při bolesti břicha, bolesti v krku a revmatismu (Charlebois, 2007; Slavík, 2010; Úradníček a kol., 2009). Roschek a kol. (2009) zjistili, že extrakt z plodů bezu černého inhibuje infekci chřipkovým virem A (H1N1) v buňkách psích ledvin *in vitro*. Inhibice infekce je způsobena flavonoidy, které se vážou na viriony a brání jim tak ve vstupu do hostitelské buňky. Plody bezu by tedy měly být schopné zabránit rozvoji chřipkové infekce. Odvar z kůry bezu je schopen inhibovat infekci viru *Feline immunodeficiency virus* (FIV) v buňkách kočičích ledvin *in vitro*. FIV je velmi podobný viru *Human immunodeficiency virus* (HIV), což naznačuje, že by výtažky z bezové kůry mohly být využívány i k léčbě syndromu získané lidské imunitní nedostatečnosti (AIDS) (Uncini Manganelli a kol., 2005).

3.2 RNA viry infikující bez černý

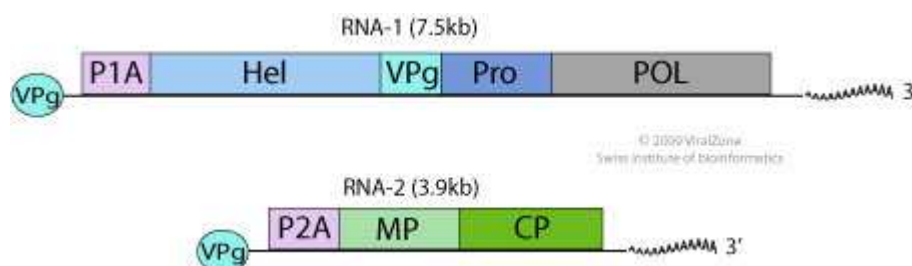
Viry bezu černého nebyly příliš intenzivně studovány. V posledních letech ale stoupl zájem o komerční produkci bezu. Ve Spojených státech se za rok 2009 zvýšil prodej výživových doplňků z bezu černého o 50 % (Mohebalian a kol., 2012). S tím se zvýšil

i zájem o studium jeho škůdců (Holb a kol., 2010; Thomas a kol., 2015). Přesto byly viry infikující bez studovány již dříve. První práce jsou datovány od poloviny 20. století (Blattný a Osvald, 1950; Jones a Murant, 1971; Uyemoto, 1970). Virózy u bezu černého způsobují dekolorační i morfogenní změny. Běžnými příznaky jsou chlorotické lemování žilek a chlorotická mozaika na listech. Chlorotické lemování žilek se objevuje jen na některých listech napadené rostliny. Výrazné je na jaře a na podzim. Bývá spojeno se zakrslostí a snížením fertility (málo květů). Mozaiku tvoří ostře ohraničené nepravidelné skvrny, kroužky a elipsy. Zprvu jsou tyto skvrny žlutozelené, ale časem mohou nekrotizovat. S chlorotickou mozaikou není spojován vážnější pokles růstu ani plodnosti (Blattný a Osvald, 1950; Cooper, 1979). Dalšími pozorovanými příznaky jsou puchýřovitost listů, zlaté panašování listů, bělání okrajů listů a částí listů mezi žilkami (zachování zelených žilek a ostrůvků), vícedílnost vrcholových lístků a krajkovitost lístků. Příznaky mohou být i kombinované (Blattný a Osvald, 1950). Bez černý infikují viry z čeledí *Secoviridae*, *Bromoviridae*, *Betaflexiviridae*, *Tombusviridae* a *Virgaviridae*. Genom virů všech těchto čeledí tvoří jednovláknová RNA s funkcí mRNA (+ssRNA) (Keller a kol., 2015; King a kol., 2012; Mayo a Jones, 1973; Schimanski, 1991; Uyemoto, 1970). Je nejasné, jestli může být bez infikován virem *Apple mosaic virus* z čeledi *Bromoviridae*, protože autoři zaměňují bez černý a jeřáb (Grimová a kol., 2013).

3.2.1 Čeleď *Secoviridae*

Čeleď *Secoviridae* patří do řádu *Picornavirales*. Tato čeleď zahrnuje rody *Nepovirus*, *Comovirus*, *Fabavirus*, *Cheravirus*, *Sadwavirus*, *Torradovirus*, *Sequivirus* a *Waikavirus*. Jedná se o viry rostlin, které napadají zemědělsky významné plodiny a snižují jejich výnosy. Jsou přenášeny háďátky, mšicemi a brouky, případně i pylem a semeny. Jejich viriony jsou neobalené, mají ikosahedrální symetrii a průměr okolo 30 nm. Kapsida je složena z 60 kapsomer, které jsou tvořeny třemi doménami. Genom je představován dvěma lineárními +ssRNA, přičemž každá z nich je nesena jinou virovou částicí (Thompson a kol., 2014). Výjimku tvoří viry rodů *Sequivirus* a *Waikavirus*, jejichž genom je tvořen jedinou molekulou +ssRNA. Viriony obsahující RNA-1 a RNA-2 lze od sebe rozlišit na základě jejich sedimentačního koeficientu. Rychleji sedimentující viriony nesou RNA-1 a nazývají se B komponenty, středně rychle sedimentující viriony (M komponenty) obsahují RNA-2 a pomalu sedimentující viriony (T komponenty) jsou prázdné. U virů, jejichž genomová RNA je rozdělena do dvou virionů, je pro vznik infekce zapotřebí obou částic nesoucích genomovou RNA. U většiny druhů z čeledi *Secoviridae* bývá genomová

RNA polyadenylována na 3' konci. Na 5' konec nukleové kyseliny je u některých virů kovalentně navázán VPg protein kódovaný virem. RNA-1 sice nese všechny informace potřebné pro replikaci viru, ale bez RNA-2, která kóduje další proteiny, nemohou vznikat nové virové částice (King a kol., 2012). Obvykle každá molekula genomové RNA kóduje jeden velký polyprotein, který je až posttraslačně štěpen trypsinu podobnou proteázou na dílčí proteiny. U virů s rozděleným genomem kóduje RNA-1 kofaktor proteázy (P1A), helikázu, trypsinu podobnou proteázu, RNA dependentní RNA polymerázu (RdRp) a VPg protein, je-li přítomen. RNA-2 pak nese geny pro plášťový protein (CP), movement protein (MP) a N-terminální doménu zapojenou do replikace RNA-2 (viz Obr. 1). U virů, jejichž genom je tvořen jedinou molekulou RNA, jsou geny pro CP a MP proteiny blíže 3' konci a geny pro ostatní funkční proteiny blíže 5' konci genomové RNA. CP a MP jsou nezbytné k pohybu virionů z buňky do buňky. Počet CP se u jednotlivých rodů liší, pohybuje se od jedné do tří. Trypsinu podobná proteáza štěpí virové polyproteiny na jednotlivé funkční proteiny. Helikáza je zapotřebí pro začátek replikace (Li a kol., 2014; Thompson a kol., 2014; King a kol., 2012).



Obrázek 1: Uspořádání genomu virů rodu *Nepovirus* (podle Viralzone, 2017a)

Legenda: P1A – kofaktor proteázy; Hel – helikáza; VPg – protein, který se váže na 5' konec genomové RNA; Pro – trypsinu podobná proteáza; POL – RNA dependentní RNA polymeráza; P2A - N terminální doména zapojená do replikace RNA-2; MP – movement protein; CP – plášťový protein (coat protein)

Rod *Nepovirus*

Rod virů *Nepovirus* je součástí podčeledi *Comovirinae*. Mezi příznaky napadení rostliny virem tohoto rodu patří tečky a skvrny na listech a plodech, případně mozaika. U bylin jsou příznaky pozorovatelné jen ze začátku infekce. K vymizení příznaků dochází díky RNA interferenci (RNAi), při níž dochází k umlčování genů viru rostlinou. V důsledku RNAi může, ale nemusí dojít ke snížení koncentrace virové RNA v rostlinných buňkách. Viry rodu *Nepovirus* jsou široce rozšířeny v oblastech s mírným klimatem. Genom těchto

virů odpovídá obecné charakteristice čeledi *Secoviridae*. RNA-2 kóduje jen jeden jediný velký plášťový protein.

Viry rodu *Nepovirus* jsou na základě velikosti RNA-2 rozděleny do tří podskupin. Viry podskupiny A mají kratší RNA-2 (3700–4000 nukleotidů). Ta je přítomna v komponentech M i B. Délka RNA-2 u virů podskupiny B se pohybuje mezi 4400 a 4700 nukleotidy. Nejdelší RNA-2 mají viry podskupiny C, a to 6400-7300 nukleotidů. RNA-2 se u podskupin B i C vyskytuje pouze v M komponentech (King a kol., 2012).

Cherry leaf roll virus (CLR)

Cherry leaf roll virus má široký okruh hostitelů. Infikuje především dřeviny, ale i byliny. Mezi běžné hostitele CLR patří bříza bělokorá (*Betula pendula* Roth.), bez černý (*Sambucus nigra* L.), třešeň a ořešák královský (*Juglans regia* L.). U různých hostitelských druhů vyvolává CLR odlišné příznaky (Rebenstorf a kol., 2006). Příznaky typické pro CLR na bezu (*Sambucus* spp. L.) jsou chlorotické mozaiky a skvrny (Berniak, 2016), žluté chlorotické lemování kolem žilek, případně tmavě zelené lemování žilek na chlorotických listech (Miličič a kol., 1987). U ořešáků (*Juglans* spp. L.) virus způsobuje černé nekrotické pruhy v tkáních kambia a floému (Mircetich a Rowhani, 1984). Infikované břízy (*Betula* spp. L.) mají na svých listech chlorotické skvrny, kroužky a lemování kolem žilek, někdy i nekrotické skvrny. Okraje listů bříz infikovaných CLR bývají srolované. Dochází zde také ke změně organizace gran v chloroplastech (Cooper a Atkinson, 1975; von Bargen a kol., 2009). CLR vážně poškozuje třešně (*Prunus avium* L.), u nichž tato infekce typicky způsobuje srolování okrajů listů. Dále dochází k opožděnému pučení listů a kvetení. Nakažené stromy nejsou schopny produkovat dostatek pryskyřice, odumírají jim větve, případně odumřou celé stromy (Copley, 1961). U olivovníku evropského (*Olea europaea* L.) virus způsobuje žloutnutí listů a deformaci listů a plodů (Luigi a kol., 2011). CLR je přenášen semeny a pylem, ale nepředpokládá se, že by byl přenášen hádátky, jako jiné viry z rodu *Nepovirus* (Wang a kol., 2002). Virus se běžně vyskytuje v Evropě, byl detekován i v Severní Americe, v Chile, v Rusku, na Novém Zélandě, v Austrálii a v Japonsku. Tento virus vykazuje poměrně velkou vnitrodruhovou variabilitu, a to jak v sekvenci RNA, tak i v antigenních vlastnostech. Izoláty z různých hostitelů byly na základě sekvencí nepřekládaných oblastí (UTR) na 3' konci rozděleny do šesti skupin, které zpravidla odpovídají i hostiteli, ze kterého byly vyzolovány. Izoláty infikující bez patří do fylogenetické skupiny E. Antigenní vlastnosti jednotlivých izolátů CLR byly studovány pomocí protilátek proti izolátu CLR

z vlašského ořechu (*Juglans regia* L.) z Francie. Žádná ze sedmi použitých monoklonálních protilátek nebyla schopná reagovat se všemi 24 testovanými izoláty. Skupiny složené z izolátů se stejnými antigenními vlastnostmi se z velké části překrývají s fylogenetickými skupinami vytvořenými na základě sekvence 3'-UTR. (Rebenstorf a kol., 2006).

RNA-1 u CLRV izolátu z třešně (*Prunus avium* L.) má velikost 7893 nukleotidů a RNA-2 velikost 6492 nukleotidů (bez polyA sekvence na 3' konci). CLRV patří do podskupiny C rodu *Nepovirus*, která je charakterizována velkou RNA-2 a dlouhou 3'-UTR na obou molekulách RNA (Eastwell a kol., 2012). Sekvence 3' UTR a 5' UTR je na RNA-1 a RNA-2 v rámci jednoho izolátu totožná nebo alespoň velmi podobná. (Eastwell a kol., 2012; Rebenstorf a kol., 2006).

Arabis mosaic virus (ArMV)

Arabis mosaic virus (ArMV) má široký okruh hostitelů, mezi něž patří např. třešeň, vinná réva (*Vitis vinifera* L.), lilie (*Lilium* spp. L.) maliník (*Rubus idaeus* L.), černý rybíz (*Ribes nigrum* L.), jahodník (*Fragaria* spp. L.), bez černý (*Sambucus nigra* L.) a chmel otáčivý (*Humulus lupulus* L.) (Gao a kol., 2016; Jones a McGavin, 2008; Kondakova, 1998a; Schimanski, 1991; Špak a kol., 1997). Typ a rozsah příznaků způsobených ArMV záleží na hostiteli a na konkrétním virovém izolátu. Na listech infikovaného bezu černého (*Sambucus nigra* L.) se objevuje chlorotické lemování žilek. To je viditelné zejména na jaře a na podzim, přes léto se tento příznak ztrácí (Cooper, 1979). U jahodníků se objevují chlorotické tečky a skvrny, zakrslost a předčasný úhyn, u některých kultivarů dokonce i systémové chlorózy nebo systémové nekrózy (Kondakova, 1998a). ArMV vážně poškozují rybíz. Listy rybízu bývají postiženy chlorotickými skvrnami a kroužky. Infekce také výrazně snižuje výnos. (Jones a McGavin, 2008). ArMV je přenášen semeny, roubováním, a především háďátky druhu *Xiphinema diversicaudatum* (Micoletsky). Virus je široce rozšířen, je možné jej detekovat v Evropě, Asii, Severní Americe a některých oblastech Afriky. Tento virus patří do podskupiny A v rámci rodu *Nepovirus*, která je charakteristická relativně krátkou RNA-2 (Elbeaino a kol., 2012).

Tomato black ring virus (TBRV)

Tomato black ring virus má široký okruh hostitelů. Infikuje mnohé hospodářsky významné rostliny např. rajče (*Solanum lycopersicum* L.), okurku (*Cucumis sativum* L.), tykev obecnou (*Cucurbita pepo* L.) hrách setý (*Pisum sativum* L.), tabák (*Nicotiana* spp. L.) (Rymelska a kol., 2013) a bez černý (*Sambucus nigra* L.) (Schimanski, 1991). Typ

a závažnost příznaků způsobených infekcí TBRV závisí na druhu hostitelské rostliny i na konkrétním virovém izolátu (Rymelska a kol., 2013). Listy infikovaného bezu černého (*Sambucus nigra* L.) jsou postiženy chlorotickým lemováním žilek. To je viditelné zejména na jaře a na podzim, přes léto se tento příznak ztrácí (Cooper, 1979). Infikovaná rajčata mají nekrotické tečky na listech a jejich listy jsou pokroucené. Na listech infikovaných okurek se vyskytují chlorotické tečky, případně mozaiky. Infekce může proběhnout i bezpříznakově. U infikovaného hrachu vnikají systémové mozaiky na listech a jejich deformace (Rymelska a kol., 2013). TBRV je přenášen larvami háďátek rodu *Longidorus*, konkrétně *L. elongatus* a *L. attenuatum* (Harrison, 1961). Virus je rozšířen celosvětově, jeho přítomnost byla zjištěna v Evropě, Severní i Jižní Americe a v některých oblastech Asie a Afriky (Rymelska a kol., 2013). TBRV patří do podskupiny B v rámci rodu *Nepovirus* (Jończyk a kol., 2004).

Tomato ringspot virus (ToRSV)

Tomato ringspot virus má široký okruh hostitelů, patří mezi ně např. vinná réva (*Vitis vinifera* L.) a bez černý. Příznaky způsobené tímto virem se na různých hostitelích liší, stejně tak se liší i příznaky vyvolané různými kmeny viru ToRSV. Virus na listech bezu způsobuje chlorotické lemování žilnatiny, chlorotické kresby a kroužky, nebo celkovou chlorózu (Uyemoto, 1970). Rostliny jsou celkově oslabené a po několika letech infekce mohou uhynout. Infikované bezy již neprodukují dobré plody (Way, 1981). Infikované rostliny vinné révy mají na svých listech chlorotické skvrny a žluté lemování žilek. ToRSV snižuje úrodu vína (Uyemoto, 1970). Tento virus je přenášen háďátky a pylem (Way, 1981) a je rozšířen celosvětově (EPPO, 2017d). ToRSV patří v rámci rodu *Nepovirus* do podskupiny C, pro kterou je charakteristická dlouhá RNA-2 (Walker a kol., 2015). Všechny izoláty tohoto viru testované Uyemotem (1970) měly stejné antigenní vlastnosti. ToRSV se svými morfologickými i biologickými vlastnostmi velmi podobá viru *Tobacco ringspot virus* (TRSV), nicméně tento virus se sérem proti ToRSV nereaguje.

Tobacco ringspot virus (TRSV)

Tobacco ringspot virus má široký okruh hostitelů (Chang a kol., 2016). Infikuje např. sóju (*Glycine max* (L.) Merr.), tabák (*Nicotiana tabacum* L.) zřídka i bez (EPPO, 2017e). TRSV u sóji způsobuje zakrslost, rolování lístků a nekrózu pupenů. Rostliny infikované v časných stádiích vývoje mají špatně vyvinuté květy, což vede k nízké produkci lusků, případně k úplné sterilitě. TRSV má tedy velký ekonomický dopad na pěstování sóji. Tento virus je přenášen pylem a háďátky druhu *Xiphinema americanum* Cobb, méně často také sarančaty

druhu *Melanoplus differentialis* Thomas, třásněnkami druhu *Thrips tabaci* Lindeman nebo brouky druhu *Epitrix hirtipennis* Melsheimer. TBRV je rozšířen celosvětově (Chang a kol., 2016). Tento virus patří do podskupiny A v rámci rodu *Nepovirus* (Zadeh a Foster, 2001).

Rod *Cheravirus*

Infekce vyvolané viry rodu *Cheravirus* jsou doprovázeny jen mírnými příznaky nebo jsou zcela bezpříznakové. Viry jsou přenášeny hád'átky, případně z generace na generaci pomocí semen. V infikovaných buňkách jsou pozorovány tubulární struktury, které jsou zapojeny do transportu virů z buňky do buňky. Genom virů rodu *Cheravirus* kóduje tři plášťové proteiny podobné velikosti (King a kol., 2012).

Cherry rasp leaf virus (CRLV)

Cherry rasp leaf virus infikuje především dřeviny, ale i byliny. Často postihuje komerčně pěstované ovocné dřeviny např. jabloně (*Malus domestica* L.) a třešně (James a Upton, 2002), dále také lilek brambor (*Solanum tuberosum* L.) a sléz (*Malva* spp. L.). Jedním z hostitelů CRLV je i bez černý (*Sambucus nigra* L.). Na listech infikovaných bezů se objevují chlorotické skvrny a kroužky. Listy jsou deformované (Villamor a Eastwell, 2016). U třešní tento virus výrazně snižuje úrodu. Na spodní straně listů infikovaných třešní se objevují výrůstky. Stromy jsou méně vitální, a někdy i odumírají. U infikovaných jabloní dochází k rolování listů směrem od okrajů ke střední žilce. Plody jsou zploštělé a mají horší chuť. CRLV je přenášen hád'átkem *Xiphinema americanum*. U některých bylinných druhů byl dokázán i přenos semen. Virus se do svého okolí šíří pomalu vzhledem k pomalému pohybu hád'átek (EPPO, 2017a; James a Upton, 2002). CRLV je původním virem v Severní Americe, ale byl detekován i na Novém Zélandu. V Evropě se nevyskytuje. Jedná se o karanténní virus. Aby nebyl CRLV dále šířen, je třeba používat zkontrolovaný výsadbový materiál. Měla by být zkontrolována i půda, protože může obsahovat infekční hád'átka (EPPO, 2017a).

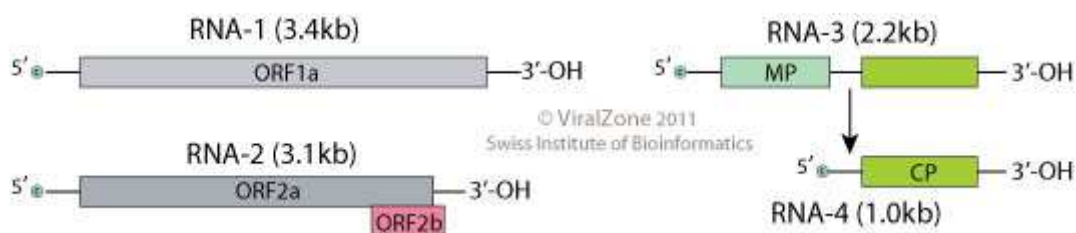
Strawberry latent ringspot virus (SLRSV)

Strawberry latent ringspot virus patří do čeledi *Secoviridae*, ale není zařazen do žádného rodu (King a kol., 2012). Dříve byl řazen do rodu *Sadwavirus* (Fauquet a kol., 2005). SLRSV infikuje více než 126 druhů patřících do 27 čeledí. Mezi hostitele tohoto viru patří např. jahodníky (*Fragaria* spp. L.), máta (*Mentha* spp. L.) (Tzanetakis a kol., 2006), bez černý (*Sambucus nigra* L.), ale i další zemědělské plodiny (EPPO, 2017b). Na infikovaném bezu černém bylo pozorováno chlorotické lemování žilek (Cooper, 1979). U jahodníků způsobuje infekce tímto virem zpomalený růst a kvetení a systémovou chlorózu na listech,

kteřá se objevuje na jaře a v průběhu léta vymizí. Napadené jahodníky mají také méně šlahounů (Kondakova, 1998b). Virus je přenášen háďátkou *Xiphinema diversicaudatum* a *X. coxi*, experimentálně také mechanickou inokulací infekční mízou. SLRSV se vyskytuje především v Severní Americe, ale i v Evropě (EPPO, 2008; Kondakova, 1998b; Tzanetakis a kol., 2006).

3.2.2 Čeleď *Bromoviridae*

Čeleď *Bromoviridae* zahrnuje rody *Alfamovirus*, *Anulavirus*, *Bromovirus*, *Cucumovirus*, *Iilarvirus* a *Olearvirus* (ICVT, 2017a). Jedná se o viry rostlin, které často infikují zemědělské plodiny. Jsou přenášeny hmyzími vektory, a to buď neperzistentně nebo mechanicky. Jsou rozšířeny celosvětově. Jejich viriony mohou mít sférický tvar s ikosahedrální symetrií nebo baciliformní tvar. Průměr sférických virionů se pohybuje mezi 26 a 35 nm. Délka baciliformních virionů je 30–85 nm a šířka 18–26 nm. Genom je představován lineární +ssRNA a může zahrnovat i subgenomickou RNA (sgRNA) nebo satelitní RNA. Velikost genomu se pohybuje okolo 8 kb. Genom se skládá ze tří lineárních +ssRNA (RNA-1, -2, -3), které nesou na 5' konci proteinovou čepičku. Na 3' konci nejsou polyadenylovány, ale vyskytují se zde vysoce konzervované sekvence nukleotidů, které vytvářejí sekundární strukturu a mohou být aminoacylovány. CP je kódován sgRNA, která je odvozená od otevřeného čtecího rámce 3b (ORF3b) na RNA-3, a nemusí být součástí virionu. Pro množení viru je zapotřebí enzymu replikázy, který se skládá ze dvou proteinů. První z nich má funkci helikázy a je kódován RNA-1, druhý má funkci RdRp a je kódován RNA-2. RNA-3 kóduje MP a protein, který se váže na 5' konec genomových RNA (viz Obr. 2).



Obrázek 2: Uspořádání genomu virů čeledi *Bromoviridae* (podle ViralZone, 2017b)

Legenda: ORF – otevřený čtecí rámec; MP – movement protein; CP – plášťový protein (coat protein); RNA-4 – subgenomická RNA

Replikace RNA probíhá na cytoplazmatické membráně hostitelské buňky. Nejdříve je genomová RNA (+ssRNA) přepsána do -ssRNA a následně je minus RNA vláknem

přepsáno opět do nové pozitivní genomové ssRNA. Plášťový protein je akumulován v hostitelských buňkách ve velkém množství, zatímco nestrukturálních proteinů je zde daleko méně. Nové viriony vznikají a hromadí se v cytoplazmě hostitelských buněk (Fauquet a kol., 2005; King a kol., 2012).

Rod *Bromovirus*

Viry rodu *Bromovirus* mají úzký přirozený okruh hostitelů. Příznaky se liší v závislosti na kombinaci viru a jeho hostitele, může se jednat o mozaiky a deformace. Infekce mohou být i bezpříznakové. Většina těchto virů je přenášena brouky, efektivita přenosu je však nízká. Dále jsou přenášeny mechanicky, *Broad bean mottle virus* (BBMV) je přenášen i semeny (Šafářová a kol., 2017). Viriony jsou sférické a mají průměr 27 nm (King a kol., 2012).

Sambucus virus S (SVS)

Sambucus virus S byl objeven Šafářovou a kol. (2017) na bezu černém v České republice. Infikovaný keř měl zakrslé žluté listy, jeho plody byly malé, a vyvíjely se a dozrávaly nerovnoměrně. Na tomtéž keři ale byly detekovány i viry z rodu *Carlavirus* a CLRV. Není tedy jisté, jakou souvislost mají tyto příznaky s infekcí SVS. Virus byl v rostlině rozšířen nerovnoměrně, přesto byly příznaky pozorovány na všech jejích částech. Genom SVS odpovídá obecné charakteristice virů z rodu *Bromovirus*. Geneticky nejpodobnější viru SVS je *Melandrium yellow fleck virus* (MYFV), se kterým sdílí 69,9 % sekvence aminokyselin u proteinu kódovaného ORF1 a 69,4 % u proteinu kódovaného ORF2.

Rod *Ilarvirus*

Viry rodu *Ilarvirus* infikují především dřeviny. Jsou obsaženy v pylových zrnech, které jsou přenášeny větrem na další rostliny, a tak je infikují. Případně mohou být přenášeny mechanicky třásněnkami, které se pylem živí. U některých druhů rodu *Ilarvirus* kóduje 2b ORF na RNA-2 protein, který je supresorem RNA interference. Napadená rostlina pak nemůže umlčovat geny viru. Všechny virové RNA jsou na 3' konci zakončeny podobnou sekvencí nukleotidů (King a kol., 2012).

Apple mosaic virus (ApMV)

Apple mosaic virus má široký okruh hostitelů, je schopen infikovat více než 65 druhů rostlin z 19 čeledí. Mezi hospodářsky významné hostitele ApMV patří jablň (*Malus domestica* L.), líska (*Corylus avellana* L.), jahodník (*Fragaria* spp. L.), maliník (*Rubus idaeus* L.) a různí zástupci rodu *Prunus* (třešeň, slivoň, mandloň, broskvoň atd.) (Grimová

a kol., 2016). Existuje ojedinělý záznam o infekci ApMV na bezu černém (Grimová a kol., 2013). Příznaky způsobené ApMV se liší v závislosti na hostiteli a konkrétním virovém kmenu (Grimová a kol., 2016). U napadených jabloní tento virus způsobuje chlorotickou mozaiku listů, jejich deformaci, případně i nekrotické skvrny. Může se objevit také žluté lemování kolem žilek. Takto postižené listy předčasně opadávají. U mladých rostlin zpomaluje růst. Virus výrazně snižuje výnosy u zemědělsky pěstovaných stromů. Jabloně mají méně ovoce, to je menší a obsahuje menší množství vitamínu C. Některé kultivary jabloní však zůstávají bez příznaků (Grimová a kol., 2016; Lakshmi a kol., 2011). Listy lísek infikovaných ArMV jsou postiženy chlorotickými a žlutými kroužky a mozaikami. ArMV u lísek zpomaluje růst a výrazně snižuje výnosy. Některé lísky napadené virem bývají bez příznaků (Ciešlínska a Valasevich, 2016). ApMV je přenášen vegetativně a roubováním. Není známý žádný přenos vektorem (Grimová a kol., 2016). U chmelu byl prokázán i přenos vzájemným dotykem rostlin (Pethybridge a kol., 2002). ApMV je rozšířen celosvětově v závislosti na výskytu svých hostitelských druhů (Grimová a kol., 2016).

Rod *Cucumovirus*

Viry rodu *Cucumovirus* mají velmi široký okruh hostitelů. Jsou přenášeny neperzistentně mšicemi. Všechny viry tohoto rodu nesou blízko 3' konce RNA-2 druhý ORF, který kóduje protein působící jako supresor RNA interference (protein 2b) stejně jako u některých virů rodu *Ilarvirus*. Všechny virové RNA jsou na 3' konci zakončeny podobnou sekvencí nukleotidů, která může formovat strukturu podobnou transferové RNA (tRNA). Tato struktura může být aminoacylována tyrosinem (King a kol., 2012).

Cucumber mosaic virus (CMV)

Cucumber mosaic virus má širší okruh hostiteků než jakýkoli jiný virus (Palukaitis a kol., 1992). Je schopen infikovat více než 1000 druhů rostlin z 85 různých čeledí např. okurky (*Cucumis* spp. L.), dýně (*Cucurbita* spp. L.), rajčata (*Solanum lycopersicum* L.), lilie (*Lilium* L.) a bez černý (*Sambucus nigra* L.) (Kim a kol., 2016; Lin a kol., 2003; Schimanski, 1991). Jedná se o jeden z ekonomicky nejvýznamnějších virů rostlin (Lin a kol., 2003). Virus napadá plodiny v oblastech s mírným a tropickým klimatem. CMV je přenášen neperzistentně více než 80 druhy mšic. Příznaky infekce CMV se postupně mění. První listy nakažené rostliny jsou chlorotické, mladší listy, které vyrostly až po nakažení rostliny virem, nesou mozaiku. Listy na ještě mladších větvích jsou deformované. Nejmladší tkáň rostliny už nenesou žádné viditelné příznaky infekce. Toto postupné uzdravování rostliny se děje pravděpodobně kvůli umlčování virových genů rostlinou, a to

i přesto, že CMV kóduje protein 2b, který funguje jako supresor RNAi. Mezi systémové příznaky infekce CMV patří také zkracování internodií a malý vzrůst (Murphy a kol., 2016). Jednotlivé izoláty viru CMV byly rozděleny do dvou podskupin na základě jejich antigenních vlastností, peptidového mapování CP a sekvence nukleových kyselin.

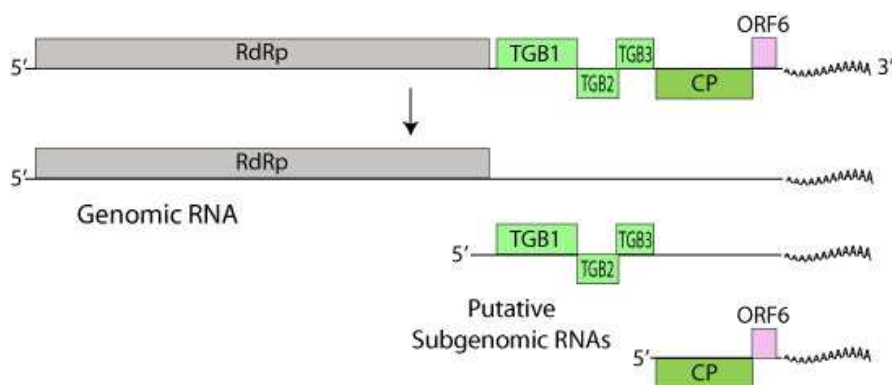
3.2.3 Čeleď *Betaflexiviridae*

Čeleď *Betaflexiviridae* patří do řádu *Tymovirales*. Tato čeleď zahrnuje rody *Capillovirus*, *Carlavirus*, *Citrivirus*, *Foveavirus*, *Trichovirus*, *Vitivirus*, *Robigovirus*, *Chordovirus*, *Divavirus* a *Tepovirus* (ICVT, 2017a). Viry z čeledi *Betaflexiviridae* infikují rostliny, především dřeviny. Velká část virů patřících do této čeledi způsobuje jen mírné příznaky. Všechny viry z čeledi *Betaflexiviridae* jsou přenášeny mechanickou inokulací, jen některé z nich mohou být přenášeny hmyzími vektory. Jejich virové částice mají tvar flexibilního vlákna o průměru 12-13 nm. Délka virionů se pohybuje obvykle mezi 600 a 1000 nm, ale mohou být i delší. Virové částice mají helikální symetrii a jsou neobalené. Kapsida je tvořena jediným plášťovým proteinem. Genom většiny těchto virů je tvořen jednou lineární molekulou +ssRNA. Jen některé viry z rodu *Carlavirus* mají dvě sgRNA nesené samostatně menšími viriony. Velikost genomové RNA se pohybuje mezi 5,9 a 9 kb. SgRNA mají velikost 2,1-3,3 kb a 1,3-1,6 kb. RNA nesou na svém 5' konci 7-methylguanidinovou čepičku a jsou polyadenylovány na 3' konci. Genom kóduje 2-6 proteinů, jejich počet je konstantní v rámci jednotlivých rodů. ORF1 navazuje na 5' UTR a kóduje protein umožňující replikaci RNA. Součástí tohoto proteinu jsou domény s metyltransferázovou aktivitou, aktivitou helikázy a RNA dependentní RNA polymerázy. U většiny virů z této čeledi se mezi doménami s aktivitou metyltransferázy a helikázy nachází ještě domény s aktivitou alkylovaného DNA reparačního proteinu (alkylated DNA repair protein) a papainu podobné proteázy. Další menší ORF kódují proteiny umožňující pohyb viru z buňky do buňky (King a kol., 2012; ViralZone, 2017c). Viry rodů *Capillovirus*, *Citrivirus*, *Trichovirus*, *Vitivirus* a *Tepovirus* mají jediný MP, viry rodů *Carlavirus*, *Foveavirus* a viry nezařazené do žádného rodu nesou ve svém genomu tři ORF kódující proteiny zapojené do pohybu virů. Tyto ORF se souhrnně nazývají jako 'triple gene block' (TGB) (Marais a kol., 2015). Gen (geny) pro MP jsou zpravidla umístěny u 3' konce ORF1. Za ním (za nimi) se nachází gen pro CP. U virů z rodů *Carlavirus*, *Vitivirus* a některých virů z rodu *Trichovirus* se na 3' konci RNA nachází gen pro protein s motivem zinkového prstu, který je schopen vázat se na nukleové kyseliny. Viry rodu *Vitivirus* navíc exprimují protein působící jako supresor umlčování RNA genů.

ORF1 je transkribován přímo z genomové RNA, ostatní ORF jsou přepisovány z menších sgRNA (viz Obr. 3). Replikace se odehrává v cytoplasmě. K jejímu uskutečnění je zapotřebí pouze replikační polyprotein kódovaný ORF1 (King a kol., 2012).

Rod *Carlavirus*

Zástupci rodu *Carlavirus* infikují úzký okruh hostitelů (van Lent a kol., 1980). Nevyvolávají závažné příznaky, nicméně se v důsledku infekce objevují v napadených pletivech různé virové inkluze a agregáty. Stejně jako ostatní zástupci z čeledi *Betaflexiviridae* jsou viry rodu *Carlavirus* přenášeny mechanickou inokulací. Kromě toho může být většina druhů přenášena neperzistentně mšicemi, některé také molicemi nebo semeny. Jednotlivé druhy jsou přirozeně rozšířeny na menším území, ale druhy infikující zemědělské plodiny byly díky pěstování rozšířeny na různá místa. Vyskytují se především v mírném pásmu. Genom carlavirů odpovídá obecné charakteristice čeledi *Betaflexiviridae*. Obsahuje šest ORF. Produkt ORF1 je posttranslačně štěpen pomocí domény s aktivitou papainu podobné proteázy. Viriony těchto virů jsou silně imunogenní, některé druhy vyvolávají specifickou odezvu, jiné mají podobné antigenní vlastnosti (King a kol., 2012).



Obrázek 3: Uspořádání genomu virů rodu *Carlavirus* (podle ViralZone, 2017d)

Legenda: RdRp – ORF1 (gen pro replikační polyprotein), TGB - 'triple gene block', CP - plášťový protein (coat protein), ORF6 – gen pro protein vázající nukleové kyseliny, genomic RNA – genomická RNA, putative subgenomic RNAs – předpokládané subgenomické RNA

Existuje několik záznamů z druhé poloviny 20. století o tom, že viry rodu *Carlavirus* infikují bez (Miličič a kol., 1987; van Lent a kol., 1980). Nalezený virus byl nazván *Elderberry virus A* (van Lent a kol., 1980). Podle EPPO (2017c) je vhodnější používat název *Elderberry symptomless virus* (ESLV). Nejsou známy sekvence genomové RNA u ESLV, tento virus býval detekován pomocí polyklonálních protilátek. Vzhledem k tomu,

že se infekce virů rodu *Carlavirus* často vyskytují ve směsi s jinými viry, ať už stejného, nebo jiného rodu, je možné, že ESLV je vlastně jen směsicí několika druhů rodu *Carlavirus* (Ho a kol., 2016).

Keller a kol. (2015) testovali přítomnost virů v devíti různých kultivarech bezu černého pěstovaných ve Spojených státech (8 kultivarů *Sambucus nigra* subsp. *canadensis* a 1 kultivar *Sambucus nigra* subsp. *nigra*). Objevili dva druhy virů patřících do rodu *Carlavirus*. Všechny testované kultivary *S. n.* subsp. *canadensis* byly pozitivní pro oba tyto viry. Kultivar *S. n.* subsp. *nigra* byl infikován pouze jedním z těchto virů.

Ho a kol. (2016) objevili pět druhů virů rodu *Carlavirus* v americkém poddruhu bezu černého (*S. n.* subsp. *canadensis*) a v bezu červeném (*S. racemosa*). Předběžně je pojmenovaly Elderberry virus A-E (EIVA-EIVE). Pomocí fylogenetické analýzy zjistili, že viry EIVA, EIVB a EIVD jsou si velmi blízce příbuzné. Totéž platí o EIVC a EIVE. Ukazuje se, že u carlaviřů na bezu dochází k sympatrické speciaci, přičemž EIVA, EIVB a EIVD tvoří jednu vývojovou linii a EIVC a EIVE druhou. Svou roli v jejich evoluci hraje i rekombinace.

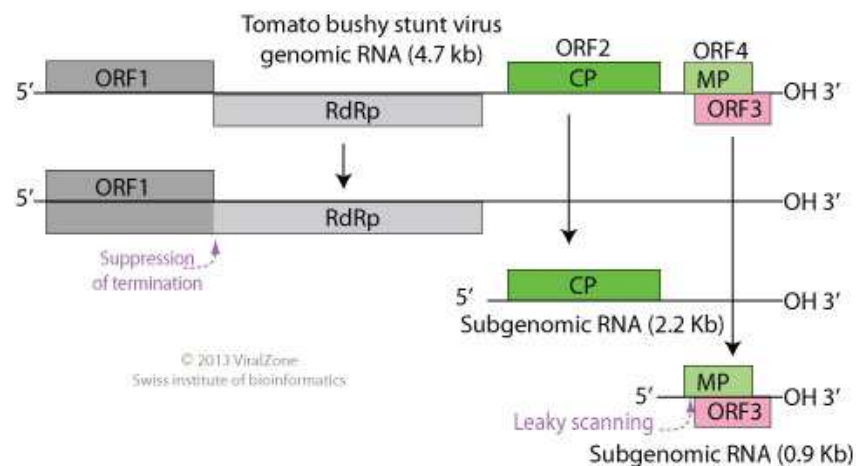
Smíšené infekce neumožňují zjistit patogenitu a ekonomický dopad jednotlivých druhů carlaviřů (Ho a kol., 2016). Infekce viry rodu *Carlavirus* na bezu mohou být latentní. Nicméně je známo, že různé viry v jednom hostiteli působí synergisticky. Latentní viry tohoto rodu tak mohou přispět ke vzniku závažných chorob (van Lent a kol., 1980). Proto by měla být vyvinuta snaha o jejich eliminaci při množení rostlin (Keller a kol., 2015).

Bez černý infikuje i *Blueberry scorch virus* (BIScV) z rodu *Carlavirus*. Tento virus se vyskytuje ve Spojených státech a některých zemích Evropy. BIScV je neperzistentně přenášen mšicemi. U kanadské borůvky (Brusnice chocholičnatá, *Vaccinium corymbosum* L.) způsobuje nekrózy listů a květů, případně chlorózy. Na bezu je však infekce bezpříznaková (Kalinowska a kol., 2013).

3.2.4 Čeleď *Tombusviridae*

Čeleď *Tombusviridae* zahrnuje rody *Aureusvirus*, *Avenavirus*, *Alphacarmovirus*, *Betacarmovirus*, *Gammacarmovirus*, *Dianthovirus*, *Machlomovirus*, *Panicovirus*, *Tombusvirus*, *Alphanecrovirus*, *Betanecrovirus*, *Pelarspovirus*, *Umbravirus*, *Gallantivirus*, *Zeavirus* a *Macanavirus* (ICVT, 2017a). Viry této čeledi infikují rostliny. Jednotlivé druhy mají poměrně úzký okruh přirozených hostitelů, ale další rostliny infikují experimentálně.

Infikován bývá často pouze kořenový systém rostlin, ale mohou vznikat i systémové infekce. Viry čeledi *Tombusviridae* jsou přenášeny mechanickou inokulací a množitelským materiálem, některé druhy také semeny a dotekem. Dále jsou tyto viry běžně přítomné v půdě, která je sama o sobě infekční. Přesto jsou některé druhy virů přenášeny i vektory. Většina druhů z této čeledi je rozšířena v mírném pásmu, některé však byly detekovány v tropech (King a kol., 2012). Jejich viriony mají ikosahedrální symetrii a jsou neobalené (George a kol., 2015). Kapsida je složena ze 180 identických proteinových podjednotek a má průměr 30-32 nm. Genom virů čeledi *Tombusviridae* je tvořen jednou lineární molekulou +ssRNA. Výjimku tvoří viry rodu *Dianthovirus*, jejichž genom je tvořen dvěma molekulami +ssRNA. 5' konec genomové RNA nese čepičku a 3' konec není polyadenylován. S některými druhy virů jsou asociovány satelitní RNA nebo satelitní viry. Genom virů čeledi *Tombusviridae* nese 3-5 ORF. Jejich počet je stejný v rámci rodu. Jeden z ORF kóduje RdRp. Uvnitř sekvence tohoto ORF se nachází terminační kodon, který ale bývá periodicky umlčován. Střídá se tedy syntéza dlouhého a krátkého proteinu. Viry rodu *Dianthovirus* tuto situaci řeší posunem RNA na ribozomu. Součástí polymerázy není žádná helikázová ani metyltransferázová doména. ORF pro RdRp je překládán přímo z genomové RNA, další ORF blíže 3' konci jsou překládány ze sgRNA. Další ORF kódují CP a MP, u některých rodů jsou exprimovány i proteiny potlačující umlčování genů nebo další proteiny neznámé funkce (viz Obr. 4).



Obrázek 4: Uspořádání genomu virů čeledi *Tombusviridae* (podle ViralZone, 2017e)

Legenda: ORF – otevřený čtecí rámec; RdRp – RNA dependentní RNA polymeráza; CP – plášťový protein (coat protein); MP – movement protein; ORF3 – gen pro protein potlačující umlčování genů, suppression of termination – umlčení terminace, subgenomic RNA – subgenomická RNA, 'leaky scanning' - umožňuje alternativní čtení sgRNA a vznik supresoru umlčování RNA

Translace je řízena sekvencí na 3'-UTR, která hybridizuje s 5'-UTR za tvorby vlásenky. Replikace genomové RNA probíhá v membránových vezikulách asociovaných s endoplasmatickým retikulem, případně v modifikovaných peroxizomech, mitochondriích a výjimečně i v chloroplastech (King a kol., 2012).

Elderberry latent virus (ELV)

Elderberry latent virus je patří do čeledi *Tombusviridae*, ale není zařazen do žádného z rodů (ICTV, 2017b). Tento virus byl poprvé izolován z amerického poddruhu bezu černého (*Sambucus nigra* subsp. *canadensis*) ve Spojených státech (Jones, 1972). Všichni známý přirození hostitelé ELV patří do rodu *Sambucus* (EPPO, 2017f). Infekce ELV na bezu zůstává bez příznaků (Jones, 1972). Na experimentálně infikovaných hostitelích *Chenopodium amaranticolor* a *C. quinoa* vyvolává tento virus vznik velkých chlorotických skvrn a někdy i mírnou systémovou chlorózu. ELV je též schopen infikovat rostliny tabáku druhu *Nicotiana benthamiana* a *N. clevelandii*, u nichž vyvolává mírnou systémovou chlorózu. I několik dalších rostlin lze experimentálně infikovat tímto virem, avšak nedochází u nich k rozvoji symptomů (*Chenopodium murale*, *C. capitatum*, *Datura stramonium*, *N. tabacum* cv. White Burley, *N. debnyii*, *N. glutinosa*, *N. megalosiphon*, *Tetragonia expansa*, a *Vicia faba*) (Jones a kol., 2000). ELV byl detekován v Evropě a Severní Americe (EPPO, 2017g). ELV je velmi podobný viru *Pelargonium ringspot virus* (PelRSV). Viriony ELV precipitují s polyklonálními protilátkami proti PelRSV a naopak. Sdílí i mnoho dalších vlastností jako okruh experimentálních hostitelů, velikost virionů a velikost jednoho z proteinů. Je otázkou, jestli by měli být považovány za samostatné druhy nebo pouze za dva kmeny téhož druhu (Jones a kol., 2000).

Rod *Tombusvirus*

Většina virů z rodu *Tombusvirus* infikuje své hostitele bez pomoci vektorů, výjimkou je pouze virus *Cucumber necrosis virus*, který je přenášen houbou druhu *Olpidium bornovanus*. Genom těchto virů obsahuje čtyři ORF. ORF1 kóduje protein, který ukotvuje virus ve vnější mitochondriální nebo peroxizomální membráně. V případě, že je umlčen stop kodon za ORF1, translace pokračuje za vzniku většího proteinu. Oba tyto proteiny představují součást RdRp. ORF2 kóduje CP a z ORF3 a ORF4 jsou přepisovány dva malé MP (King a kol., 2012).

Tomato bushy stunt virus (TBSV)

Tomato bushy stunt virus má úzký okruh hostitelů. Infikuje rajče (*Solanum lycopersicum* L.), salát (*Lactuca sativa* L.), vinnou révu (*Vitis vinifera* L.) a několik dalších rostlin (Hafez a kol., 2010; Novák a Lanzová, 1976). Existuje i záznam o infekci TBSV na bezu černém (Schimanski, 1991). U rajčete TBSV způsobuje deformaci listů spojenou s chlorotickou mozaikou a nektrózou. Listy jsou malé a rostou blízko u sebe. Infikované rostliny mají méně plodů, ty jsou menší a na jejich povrchu se objevují chlorotické kroužky, skvrny a linie. TBSV způsobuje pěstitelům rajčat velké ekonomické ztráty. Viriony jsou stabilní a vyskytují se v pletivech ve vysokých koncentracích, odtud se dostávají i do půdy. TBSV je přenášen pylem, semeny, množitelským materiálem a experimentálně mechanickou inokulací. Tento virus je rozšířen v Severní i Jižní Americe, v Evropě a v severní Africe (Hafez a kol., 2010).

Rod Betanecrovirus

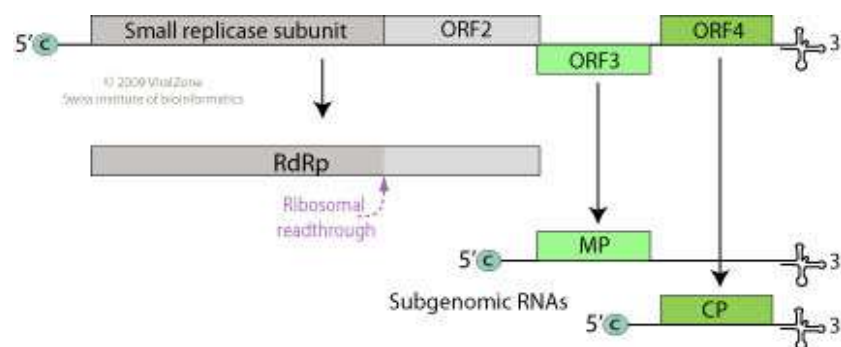
Viry rodu *Betanecrovirus* mají široký okruh hostitelů. Typickým příznakem, které tyto viry vyvolávají, jsou lokální nekrotické léze na listech (King a kol., 2012). Genom těchto virů obsahuje pět ORF. ORF1 kóduje protein o relativní molekulové hmotnosti asi 22 kDa. V případě, že je stop kodon umlčen, translace pokračuje a vznikne protein o relativní molekulové hmotnosti 88 kDa. Oba tyto proteiny jsou potřebné k replikaci genomu. ORF2, ORF3 a ORF4 kódují malé MP. CP je kódován ORF5 v blízkosti 3' konce genomové RNA (Fang a Coutts, 2013).

Tobacco necrosis virus (TNV)

Tobacco necrosis virus má velké množství hostitelů. Patří mezi ně např. tabák (*Nicotiana tabacum* L.), cuketa (*Cucurbita pepo* var. *giromontiina*), fazol obecný (*Phaseolus vulgaris* L.), okurka (*Cucumis sativum* L.) a bez (*Sambucus* spp. L.) (Montalbini a Della Torre, 1996; Roggero a Lisa, 1995; Teakle, 1962; Uyemoto a kol., 1971). U tabáku způsobuje tento virus nekrotické tečky na listech (Montalbini a Della Torre, 1996). Na mladých listech infikovaných cuket se objevují žluté kroužky, které časem nekrotizují. Nekróza postihuje také stonek a řapíky (Roggero a Lisa, 1995). Na kořenech fazolů a okurek infikovaných TNV se vyskytují nekrotické léze. Na kořeny hostitelů je virus přenášen pomocí houby lahvičkovky zelené (*Olpidium brassicae*) (Teakle, 1962). TNV je rozšířen celosvětově (King a kol., 2012).

3.2.5 Čeleď *Virgaviridae*

Čeleď *Virgaviridae* zahrnuje rody *Furovirus*, *Goravirus*, *Hordeivirus*, *Pecluvirus*, *Pomovirus*, *Tobamovirus* a *Tobravirus* (ICTV, 2017a). Tyto viry infikují rostliny. Dalšími biologickými vlastnostmi se navzájem významně liší. Jejich viriony jsou neobalené, mají tyčkovitý tvar a helikální symetrii. Jejich genom je tvořen +ssRNA, která na svém 5' konci nese čepičku a je zakončena strukturou podobnou tRNA na 3' konci. Molekul genomové RNA může být několik v závislosti na rodu. Genom kóduje RdRp, jeden nebo více MP a CP. RdRp je překládána přímo z genomové RNA, zatímco další geny jsou exprimovány ze sgRNA (viz Obr. 5) (King a kol., 2012).



Obrázek 5: Uspořádání genomu virů rodu *Tobamovirus* (podle ViralZone, 2017f)

Legenda: ORF – otevřený čtecí rámeček; c – čepička (cap), RdRp – RNA dependentní RNA polymeráza; MP – movement protein; CP – plášťový protein (coat protein), small replicase subunit – malá podjednotka replikázy, ribosomal readthrough – umlčovaný stop kodon, subgenomic RNAs – subgenomické RNA

Rod *Tobamovirus*

Viry rodu *Tobamovirus* mají poměrně úzký okruh přirozených hostitelů, ale experimentálně infikují mnoho dalších druhů rostlin. Jsou přenášeny kontaktem bez pomoci vektorů, případně semeny. Viry rodu *Tobamovirus* jsou rozšířeny po celém světě. Jejich virové částice jsou dlouhé 300-310 nm a mají průměr 18 nm. Kratší viriony nesou sgRNA. Genom je představován jedinou molekulou RNA. Gen pro RdRp obsahuje stop kodon, který bývá někdy umlčován. Pro replikaci je zapotřebí obou proteinů kódovaných tímto genem. RdRp má helikázovou a methyltransferázovou doménu. Dále genomová RNA kóduje jeden MP a jeden CP (viz Obr. 5) (King a kol., 2012). CP je zapotřebí pro pohyb viru v hostiteli na velké vzdálenosti (Chen a kol., 1996). Viriony těchto virů jsou silné imunogeny (King a kol., 2012).

Tobacco mosaic virus (TMV)

Hostitelský okruh jednotlivých kmenů viru *Tobacco mosaic virus* se od sebe liší (Chen a kol., 1996). Některý z kmenů TMV byl detekován např. na tabáku (*Nicotiana L.*), rajčeti (*Solanum lycopersicum L.*), paprice (*Capsicum L.*), česneku čínském (*Allium chinense G. Don*) a bezu (Chen a kol., 1996; Fletcher a MacNeill, 1971; Mueller, 1967). Příznaky způsobené tímto virem se u hostitelů téhož druhu liší v závislosti na konkrétním genotypu hostitele a podmínkách, ve kterých je hostitelská rostlina pěstována. Vliv na příznaky má teplota prostředí, intenzita světla a délka dne (osvětlení). Infikovaná rajčata mají v zimě (teplota 14,5 °C) pokroucené listy a pomalu rostou. V létě (teplota 20 °C) jsou tyto příznaky mírnější, ale objevuje se mozaika na listech (Fletcher a MacNeill, 1971). U tabáku infikovaného TMV se objevují při 15,5 °C lokální nekrotické léze, při 22,5 °C dochází k sekundární nekróze, která může být letální. Při 36 °C a vyšších teplotách jsou na rostlinách patrné chlorotické léze, mozaiky a lemování žilek (McKinney a Clayton, 1945).

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Biologický materiál

V rámci bakalářské práce bylo testováno 39 rostlin bezu černého (*Sambucus nigra* subsp. *nigra*) a jeden bez chebdí (*Sambucus ebulus*). Vzorky listů pochází z různých lokalit, 2 vzorky jsou z Olomoucka, 1 z blízkosti obce Hněvotín, 1 z blízkosti obce Slatinky, 5 z údolí říčky Šumice poblíž Náměště na Hané, 16 z Lednice, 1 z Velkého Týnce, 4 z blízkosti obce Čejkovice, 1 v blízkosti obce Rostěnice a 9 ze Střelských Hoštic. Vzorek bezu chebdí byl sebrán u obce Čejkovice. Vzorky byly skladovány v mrazicím boxu při -80 °C.

Vzorky byly testovány na přítomnost následujících virů: *Cherry leaf roll virus* (CLRV), *Arabidopsis mosaic virus* (ArMV), *Apple mosaic virus* (ApMV), viry rodu *Carlavirus*, *Tomato black ring virus* (TBRV) a *Strawberry latent ringspot virus* (SLRSV).

4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky

Použité chemikálie

Agarose I (AMBRESKO, kat.č. 97062-250)

dNTP Mix (10 mM each) (ThermoFisher Scientific, kat.č. R0192)

GeneRuler™ 100bp DNA Ladder (ThermoFisher Scientific, kat.č. SM0241)

GoodView II, Nucleic Acid Stain (SBS Genetech, kat.č. HGV-2)

Rnasin ribonuclease inhibitor (Promega, kat.č. N2111)

2-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, kat.č. 63700)

Random primers (Promega, kat.č. C1181)

Použité soupravy

BioScript™ reverzní transkriptáza (Bioline, kat.č. BIO-27036)

My Taq Red DNA polymeráza (Bioline, kat.č. BIO-21110)

NucleoSpin RNA Plant (Macherey-Nagel, kat.č. 740949.250)

Použité roztoky a jejich příprava

50x TAE (242 g Tris base, 57,1 ml ledové kyseliny octové, 100 ml EDTA c = 0,5 mol·l⁻¹, doplněno na 1 l deionizovanou vodou)

70% Etanol

4.3 Použité přístroje

Centrifuga Biofuge pico (Heraeus)

Elektroforetická komora HU10 MINI (Fisherbrand)

Homogenizátor FastPrep 24 (MP Biomedicals)

Laminární box Telstar (PV-100)

Minicentrifuga PRISM™ mini (Labnet International, Inc.)

Spektrofotometr NanoDrop 1000 (Thermo SCIENTIFIC)

Thermocycler T100™ Thermal Cyclor (BIO-RED)

Transiluminátor G : BOX (SynGene) - dokumentační systém GeneSnap

Váhy AND EK 200G (Schoellar Pharma Prague, Ltd.)

Vortex MS2 Minishaker (IKA)

Výrobník ledu F100 Compact (Icematic)

Zdroj stejnosměrného proudu MS major science, MP-250V (BioTech)

4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

4.4.1 Izolace RNA

Celková RNA ze vzorku listů byla izolována metodou adsorpce na silikátovou membránu pomocí kitu NucleoSpin RNA Plant (Macherey-Nagel).

Do homogenizační zkumavky bylo vloženo 70–80 mg vzorku listu. Vzorek byl homogenizován společně se 700 μ l RA1 pufru a 7 μ l merkaptoetanolu pomocí homogenizátoru FastPrep (MP Biomedicals) při 5,0 M/S po dobu 30 s. Homogenát byl krátce stočen v centrifuze, supernatant byl aplikován na Place NucleoSpin Filtr umístěný ve sběrné zkumavce a centrifugován při 13 000 rpm po dobu 1 min. Filtrát byl přemístěn do 2ml zkumavky, do které bylo přidáno 700 μ l 70% etanolu a směs byla zvortexována. Asi polovina této směsi byla přemístěna na NucleSpin RNA Plant Column a centrifugována při 13 000 rpm po dobu 1 min. Filtrát byl odstraněn a na kolonu byl přemístěn zbytek směsi. Ta byla opět centrifugována při stejných podmínkách. Filtrát byl opět odstraněn. Na kolonu bylo aplikováno 350 μ l MDB pufru a její obsah byl centrifugován při 13 000 rpm po dobu 1 min. Byla připravena DNáza reakční směs smícháním 10 μ l DNázy I s 90 μ l DNáza reakčního pufru. Směs byla promíchána překlápěním zkumavky. 95 μ l DNáza reakční směsi bylo aplikováno na střed silikátové

membrány kolony. Obsah kolony byl inkubován s DNáza reakční směsí po dobu 15 min. Následně byla kolona promyta 200 μ l RA2 pufru a centrifugována při 13 000 rpm po dobu 30 s. Kolona byla přemístěna do nové sběrné zkumavky. Dále bylo na kolonu aplikováno 600 μ l RA3 pufru. Kolona byla centrifugována při 13 000 rpm po dobu 1 min. Filtrát byl odstraněn. Na kolonu bylo aplikováno 250 μ l RA3 pufru. Kolona byla centrifugována při 13 000 rpm po dobu 2 min. Kolona byla přemístěna do nové 'nuklease-free' 1,5ml zkumavky a byla z ní vymyta RNA pomocí 60 μ l 'RNase-free' vody. Dále byla kolona centrifugována při 13 000 rpm po dobu 1 min. Zkumavky s vyizolovanou RNA byly krátkodobě uchovávány na ledu, dlouhodobě v mrazicím boxu při -80 °C. Koncentrace a čistota vyizolované RNA byla stanovena pomocí spektrofotometru NanoDrop 1000 (Thermo Scientific).

4.4.2 Reverzní transkripce

Pro přepsání izolované RNA do cDNA bylo využito reverzní transkripce (RT) s random primery. K jejímu provedení byl použit kit BioScript Reverse Transcriptase (Bioline).

Vzorky izolované RNA byly zředěny pomocí dEPC vody na koncentraci cca 150 μ g·ml⁻¹. Zředěné vzorky byly stočeny v centrifuze, protřepány a znovu stočeny. Vzorky RNA i všechny potřebné chemikálie byly uchovávány na ledu a práce probíhala v laminárním boxu, aby se zabránilo poškození a znečištění chemikálií a vzorků.

Nejprve byly namíchaný dvě reakční směsi, první z dEPC vody, dNTP a random primerů, druhá z dEPC vody, RT-PCR reakčního pufru, inhibitoru ribonukleáz a reverzní transkriptázy (BioScript). Množství jednotlivých chemikálií odpovídalo počtu vzorků (viz Tab. 1). Připravené reakční směsi byly stočeny v centrifuze, protřepány a znovu stočeny. Do 0,2ml mikrozkuvek bylo napipetováno 7 μ l reakční směsi I a 3 μ l ředěných vzorků. Získaná směs byla stočena v centrifuze, protřepána a znovu stočena. Zkumavky s takto připravenou směsí byly přemístěny do thermo cycleru (BIO-RED), kde byly po dobu 5 min inkubovány při 70 °C. Poté byly okamžitě přemístěny na led. Do zkuvek bylo přidáno 10 μ l reakční směsi II. Takto získaná směs byla stočena v centrifuze, protřepána a znovu stočena. Zkumavky byly přemístěny do cycleru, kde byly inkubovány po dobu 10 min při 25 °C a poté 30 min při 42 °C. Získaná cDNA byla uchovávána v mrazáku.

Tabulka 1: Složení RT reakčních směsí pro jeden vzorek

Položka	Koncentrace prac. roztoku	Konečná koncentrace	1 test [μ l]
Reakční směs I			
voda			5,6
dNTP	10 mmol·l ⁻¹	500 μ mol·l ⁻¹	1
random primer	20 μ mol·l ⁻¹	0,4 μ mol·l ⁻¹	0,4
Reakční směs II			
voda			4
RT-PCR pufr	5x	1x	4
inh. ribonukleáz	40 U· μ l ⁻¹	40 U	1
BioScript RT pol	10 U· μ l ⁻¹	10 U	1

4.4.3 Detekce virů polymerázovou řetězovou reakcí (PCR)

Detekce konkrétních virů ve vzorcích byla provedena pomocí PCR se specifickými primery a cDNA získané reverzní transkripcí jako templátu.

Byla připravena reakční směs z pufru, sterilní vody, forward a reverse primerů a Taq polymerázy v množství odpovídajícímu počtu vzorků (viz Tab. 2). Připravená reakční směs byla stočena v centrifuze, protřepána a znovu stočena. Do 0,2ml mikrokumavek bylo napipetováno po 23 μ l reakční směsi a byly přidány 2 μ l vzorků cDNA. Získaná směs byla stočena v centrifuze, protřepána a znovu stočena. Zkumavky s takto připravenou směsí byly vloženy do cycleru. Na přístroji byly nastaveny podmínky pro PCR amplifikaci. Zkumavky se získanými PCR produkty byly uchovávány v mrazáku.

Po celou dobu práce byly chemikálie uchovávány na ledu. Práce probíhala ve sterilních podmínkách laminárního boxu.

Tabulka 2: Složení PCR reakční směsi pro jeden vzorek

Položka	Koncentrace prac. roztoku	Konečná koncentrace	1 test [μ l]
pufr	5x	1x	5
voda			17,55
f primer	20 μ mol·l ⁻¹	0,1 μ mol·l ⁻¹	0,13
r primer	20 μ mol·l ⁻¹	0,1 μ mol·l ⁻¹	0,13
Taq pol	5 U· μ l ⁻¹	1 U	0,2

Detekce CLRV

Detekce CLRV byla provedena pomocí PCR podle Bertoliniho a kol. (2003) se specifickými primery CLRV1/CLRV2 (postup viz kapitola „4.4.3 Detekce virů polymerázovou řetězovou reakcí“). PCR amplifikace probíhala za podmínek popsaných v Tab. 3.

Tabulka 3: Podmínky PCR pro detekci CLRV a 'direct' PCR pro SLRSV

Teplota	Čas	Počet cyklů
94 °C	2 min	1
94 °C	30 s	
50 °C	30 s	35
72 °C	1 min	
72 °C	7 min	1

Detekce ArMV

Detekce ArMV byla provedena pomocí nested PCR podle Pantalea a kol. (2001). Pro 'direct' PCR byly použity specifické primery AP1/AP2 (postup viz kapitola „4.4.3 Detekce virů polymerázovou řetězovou reakcí“). PCR amplifikace probíhala za podmínek popsaných v Tab. 4.

Tabulka 4: Podmínky PCR pro detekci ApMV, 'direct' PCR pro ArMV a nested PCR pro SLRSV

Teplota	Čas	Počet cyklů
94 °C	2 min	1
94 °C	30 s	
50 °C	30 s	40
72 °C	1 min	
72 °C	7 min	1

Při 'direct' PCR pro ArMV mohou vznikat nespecifické produkty, proto se k detekci používá nested PCR.

Produkty 'direct' PCR pro ArMV byly 40x zředěny. (Do 0,2ml mikrozkušavek bylo napipetováno 78 µl sterilní vody a následně 2 µl produktu 'direct' PCR.) Naředěný vzorek byl stočen v centrifuze, protřepán a znovu stočen. Byla připravena reakční směs

smícháním pufru, sterilní vody, primerů ArMV1nt/AP2 a polymerázy v množství odpovídajícímu počtu vzorků (viz Tab. 2). Připravená reakční směs byla stočena v centrifuze, protřepána a znovu stočena. Do 0,2ml mikrozkušavek bylo napipetováno po 23 µl reakční směsi a byly přidány 2 µl zředěného produktu 'direct' PCR. Takto připravená směs byla stočena v centrifuze, protřepána a znovu stočena. Zkušavky s touto směsí byly přemístěny do cycleru, který byl nastaven na podmínky amplifikace popsané v Tab. 5.

Tabulka 5: Podmínky nested PCR pro ArMV

Teplota	Čas	Počet cyklů
94 °C	2 min	1
94 °C	30 s	
50 °C	30 s	40
72 °C	30 s	
72 °C	7 min	1

Detekce ApMV

Detekce ApMV byla provedena pomocí PCR podle Sáncheze-Navarra a kol. (2005) se specifickými primery ApMV S/ApMV A (postup viz kapitola „4.4.3 Detekce virů polymerázovou řetězovou reakcí“). PCR amplifikace probíhala za podmínek popsaných v Tab. 4.

Detekce virů rodu *Carlavirus*

Pro hromadnou detekci virů rodu *Carlavirus* pomocí PCR se využívá primerů univcarla F/univcarla R (Ho a kol., 2016) (postup viz kapitola „4.4.3 Detekce virů polymerázovou řetězovou reakcí“). PCR amplifikace probíhala za podmínek popsaných v Tab. 6.

Tabulka 6: Podmínky PCR pro detekci virů rodu *Carlavirus*

Teplota	Čas	Počet cyklů
95 °C	3 min	1
95 °C	20 s	
53 °C	20 s	40
72 °C	30 s	
72 °C	7 min	1

Detekce TBRV

Detekce TBRV byla provedena pomocí PCR se specifickými primery TBRV-F/TBRV-R (Zemánek, 2017) (postup viz kapitola „4.4.3 Detekce virů polymerázovou řetězovou reakcí“). PCR amplifikace probíhala za podmínek popsanych v Tab. 7.

Tabulka 7: Podmínky PCR pro detekci TBRV

Teplota	Čas	Počet cyklů
95 °C	3 min	1
95 °C	30 s	
55 °C	30 s	40
72 °C	30 s	
72 °C	7 min	1

Detekce SLRSV

Detekce SLRSV byla provedena pomocí nested PCR podle Bertoliniho a kol. (2003). Pro 'direct' PCR byly použity specifické primery SLRSV1/SLRSV2 a postup popsany v kapitole „4.4.3 Detekce virů polymerázovou řetězovou reakcí“. Podmínky pro 'direct' PCR amplifikaci jsou uvedeny v Tab. 3. Pro nested PCR byly použity primery SLRSV i1/SLRSV i2. Nested PCR pro SLRSV byla provedena stejným způsobem jako nested PCR pro ArMV (viz kapitola „Detekce ArMV“), liší se pouze podmínky PCR amplifikace (viz Tab. 4).

Tabulka 8: Seznam použitých primerů

Virus	Název primeru	Sekvence 5'-3'	Velikost PCR produktu [bp]	Reference
CLRV	CLRV1	CATTTCATGCGACCGGTCTT	283	Bertolini a kol., 2003
	CLRV2	AGTCCGACACTCATAACAATAAGC		
ArMV	AP1	AATACCCCGGGTGTACATCG	421	Pantaleo a kol., 2001
	AP2	CATTAACCTTAAGATCAAGGATTC		
	ArMV1-nt	CCCCAATGATTATTTCTATGG	184*	
ApMV	ApMV S	CGTGAGGAAGTTTAGGTTG	417	Sánchez-Navarro a kol., 2005
	ApMV A	GCCTCCTAATCGGGGCATCAA		
Carlavirus	univ-carla F	TGYACIGARWSIGAYTRYGARGC**	180	Ho a kol., 2016
	univ-carla R	GCYTCICCISWRWAICKCATDAT**		
TBRV	TBRV-F	TCGCACTTTGGGGTACAGTC	414	Zemánek, 2017
	TBRV-R	TGGTGGCACACATAATGGCT		
SLRSV	SLRSV 1	GTTACTTTTACCTCCTCATTGTCCATGTGTTG	181	Bertolini a kol., 2003
	SLRSV 2	GACTATCGTACGGTCTACAAGCGTGTGGCGTC		
	SLRSV i1	TGGCCTTTATTGGTTGGAT	109	
	SLRSV i2	ATCTGCCACTGATTCTCAC		

*velikost PCR produktu s použitím primerů ArMV1-nt a AP2

**Y – C, T; I – inosin; R – A, G; W – A, C, G; S – C, G; K – G, T; D – A, G, T

4.4.4 Elektroforetická separace

Produkty PCR reakce byly detekovány pomocí elektroforetické separace v 1% agarózovém gelu.

Zásobní roztok 1% agarózy byl připraven smícháním 3 g agarózy (Agarose I, AMBRESKO) a 300 ml 1x TAE pufru. Suspenze byla rozvařena v mikrovlnné troubě. Gel byl okamžitě použit, přebytky byly po vychladnutí uchovávány v chladničce. Do 50 ml připraveného 1% roztoku agarózy byly po chvíli chládnutí přidány 3 µl GoodView (GoodView II, Nucleic Acid Stain) a směs byla promíchána, následně byla přelita do vaničky s hřebínkem. Gel tuhnul po dobu alespoň 30 min. Do elektroforetické komůrky byl nalit 1x TAE pufr tak, aby převrstvil gel. Do první a poslední jamky bylo napipetováno 1,5 µl standardu molekulové hmotnosti (100 bp DNA ladder, GeneRuler™) a do ostatních jamek 5 µl PCR produktu. Elektroforéza probíhala při napětí 80 V po dobu 30-40 min.

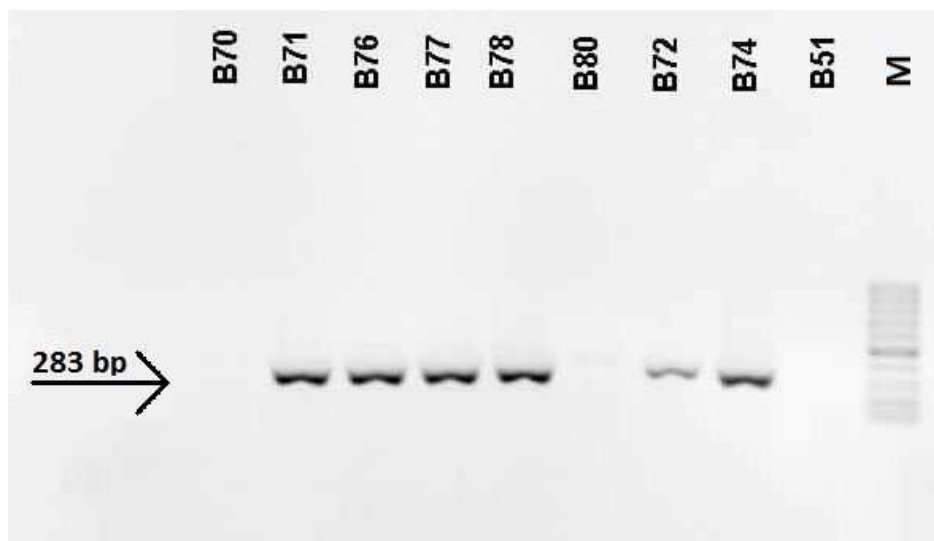
Výsledky elektroforézy byly vizualizovány pomocí UV-transiluminátoru (G : BOX, Syngene) a programu GeneSnap.

5 VÝSLEDKY

V rámci experimentální části bakalářské práce byla testována přítomnost některých RNA virů ve vzorcích listů 39 rostlin bezu černého a jedné rostliny bezu chebdí. Z pletiva listů byla izolována celková RNA. Ta byla přepsána do cDNA reverzní transkripcí s random primery. Reverzní transkripty byly použity jako templát pro PCR se specifickými primery pro detekci konkrétních virů nebo skupin virů. Přítomnost PCR produktů byla zjištěna pomocí elektroforézy v agarózovém gelu.

5.1 Detekce CLRV

Detekce CLRV byla provedena pomocí RT-PCR podle Bertoliniho a kol. (2003). V souboru 40 vzorků bylo detekováno 12 vzorků bezu černého pozitivních pro CLRV, jeden pocházel z Olomoucka (vzorek B2), jeden ze Slatinek (vzorek B15), jeden z údolí říčky Šumice poblíž Náměště na Hané (vzorek B22), tři z Čejkovic (vzorky B68, B69 a B71), jeden z Rostěnic (vzorek B72) a pět ze Střelských Hoštic (vzorky B74, B76, B77, B78 a B81). U těchto vzorků byl získán PCR produkt o očekávané velikosti 283 bp (viz Obr. 6).



Obrázek 6: Detekce CLRV pomocí RT-PCR u části vzorků

Legenda: B70, B71 atd. – označení vzorků; M – marker molekulové váhy, GeneRuler™ 100bp DNA Ladder; šipka ukazuje specifický PCR produkt o velikosti 283 bp

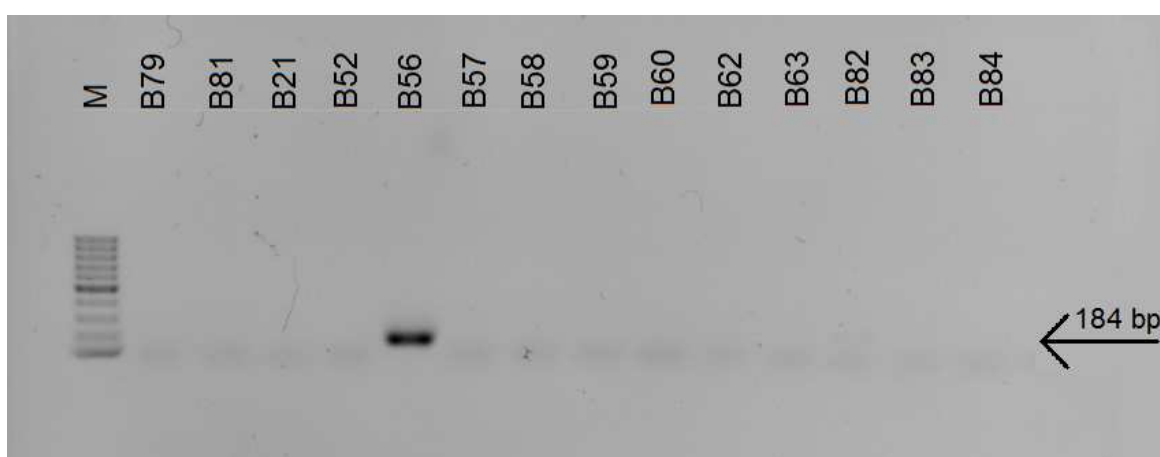
Listy infikovaných rostlin byly postiženy chlorotickou mozaikou, skvrnami a kroužky, případně celkovou chlorózou. Jedna infikovaná rostlina měla prosvětlenou žilnatinu a jiná rostlina zkrabacené listy. U 10 z 12 rostlin infikovaných CLRV byly detekovány i viry

rodu *Carlavirus*. Jedna ze dvou rostlin infikovaných pouze CLRV nejevila žádné příznaky infekce.

5.2 Detekce ArMV

Virus ArMV byl detekován pomocí nested RT-PCR podle Pantalea a kol. (2001). Mezi 40 testovanými vzorky byl nalezen jeden pozitivní vzorek pro ArMV. Jednalo se o vzorek B56 pocházející z bezu černého z Velkého Týnce. U tohoto vzorku byl získán PCR produkt o očekávané velikosti 184 bp (viz Obr. 7).

Listy rostliny infikované ArMV byly postiženy chlorotickou mozaikou.



Obrázek 7: Detekce ArMV pomocí nested RT-PCR u části vzorků

Legenda: B79, B81 atd. – označení vzorků; M – marker molekulové váhy, GeneRuler™ 100bp DNA Ladder; šipka ukazuje specifický PCR produkt o velikosti 184 bp

5.3 Detekce ApMV

Detekce ApMV byla provedena pomocí RT-PCR podle Sáncheze-Navarra a kol. (2005). U žádného ze 40 testovaných vzorků nebyl získán produkt.

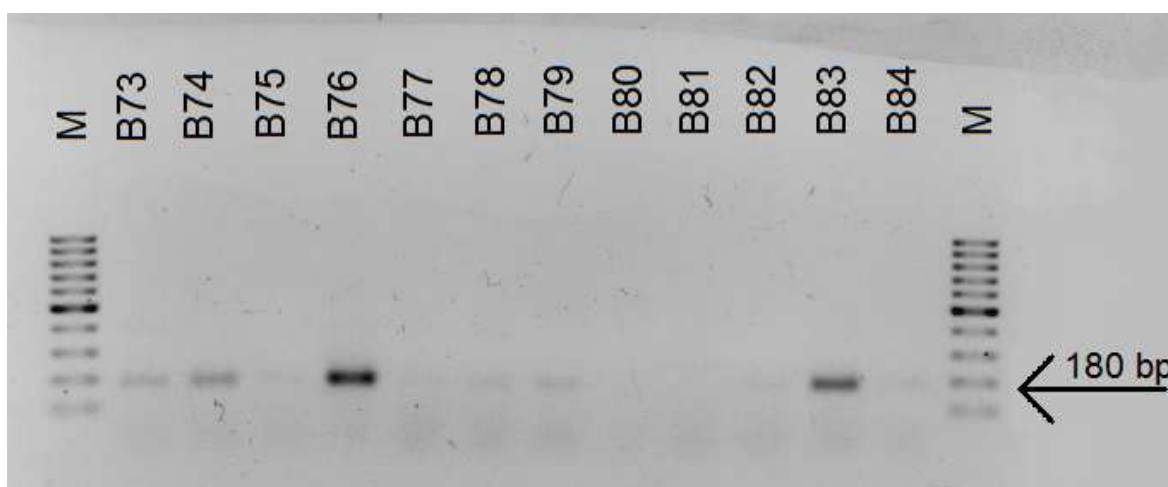
5.4 Detekce virů rodu *Carlavirus*

Detekce virů rodu *Carlavirus* byla provedena pomocí RT-PCR s využitím degenerovaných primerů podle Ho a kol. (2016). U většiny vzorků byl získán specifický PCR produkt, u některých z nich však bylo produktu velmi malé množství. Žádný PCR produkt nevykazovaly vzorky z Lednice, vzorek z Velkého Týnce, vzorek z Rostěnic a jeden ze vzorků ze Střelských Hoštic. Zbývajících 21 vzorků se ukázalo být pozitivní pro některý

blíže nespecifikovaný virus z rodu *Carlavirus* (viz Tab. 9). Byl u nich získán specifický produkt o velikosti 180 bp (viz Obr. 8). Jedním z nich byl i bez chebdí (vzorek B70).

Tabulka 9: Vzorky pozitivní pro viry rodu *Carlavirus* podle lokalit, ze kterých pocházejí

Lokalita	Počet	Číslo vzorku
Olomoucko	2	B2, B7
Hněvotín	1	B11
Slatinky	1	B15
Šumice, Náměšť n. H.	5	B21, B22, B82-84
Čejkovice	4	B68-71
Střelské Hoštice	8	B73-76, B78-81



Obrázek 8: Detekce virů rodu *Carlavirus* pomocí RT-PCR u části vzorků

Legenda: B73-B81– označení vzorků; M – marker molekulové váhy, GeneRuler™ 100bp DNA Ladder; šipka ukazuje specifický PCR produkt o velikosti 180 bp

U 10 testovaných rostlin se vyskytla směsná infekce způsobená CLRV a viry rodu *Carlavirus*. Postihla jednu rostlinu z Olomoucka (vzorek B2), jednu ze Slatinek (vzorek B15), jednu z údolí říčky Šumice poblíž Náměště na Hané (vzorek B22), tři z Čejkovic (vzorky B68, B69 a B71), a čtyři ze Střelských Hoštic (vzorky B74, B76, B78 a B81). Pouze u dvou vzorků pozitivních pro CLRV nebyly detekovány také viry rodu *Carlavirus*.

Téměř polovina rostlin infikovaných pouze viry rodu *Carlavirus* nejevila žádné příznaky infekce. Ostatní infikované rostliny byly postiženy chlorotickou mozaikou, případně celkovou chlorózou listů. Jedna infikovaná rostlina měla zkrabacené listy bez chlorotických příznaků.

Všechny rostliny postižené směsnou infekcí CLRV a carlaviry měly na listech chlorotické mozaiky nebo byly zasaženy celkovou chlorózou listů (viz kapitola „5.1 Detekce CLRV“).

Všechny rostliny, u nichž nebyl detekován žádný z testovaných virů, byly bezpříznakové.

5.5 Detekce TBRV

Detekce TBRV byla provedena pomocí RT-PCR podle Zemánka (2017). Přítomnost tohoto viru byla testována u 36 vzorků, 4 vzorky (B2, B11, B21 a B73) nebyly testovány z důvodu nedostatku reverzního transkriptu. U žádného z těchto 36 vzorků nebyl získán produkt.

5.6 Detekce SLRSV

Detekce SLRSV byla provedena pomocí nested RT-PCR podle Bertoliniho a kol. (2003). Přítomnost tohoto viru byla testována u 37 vzorků, 3 vzorky (B2, B11 a B73) nebyly testovány z důvodu nedostatku reverzního transkriptu. U žádného z těchto 37 vzorků nebyl získán produkt.

6 DISKUZE

Bez černý (*Sambucus nigra* L.) infikují nejčastěji viry CLRV a viry rodu *Carlavirus*. CLRV je ve střední Evropě rozšířeným virem. Byl detekován v Německu na břízách (*Betula pendula* Roth.), jeřáběch (*Sorbus aucuparia* L.), jasaněch (*Fraxinus excelsior* L.) a bezu černém, v Polsku na bezu černém i červeném (*S. nigra* a *S. racemosa* L.) a na Slovensku na ořešáku (*Juglans regia* L.) (Berniak, 2016; Rebenstorf a kol., 2006). V České republice byla infekce CLRV zjištěna u třešní (*Prunus avium* L.), ořešáků a maliníků (*Rubus idaeus* L.) (Kumari, 2009). Přítomnost CLRV byla zjištěna u 12 vzorků bezu černého testovaných v rámci této bakalářské práce, tedy u 30 % vzorků. Tyto pozitivní vzorky pochází ze střední a jižní Moravy a jižních Čech. Dá se tedy usuzovat, že je CLRV na bezu rozšířen po celé České republice. Nález odpovídá situaci v zemích sousedících s Českou republikou. Příznaky na listech bezů infikovaných CLRV odpovídají těm popsaným v literatuře (Berniak, 2016).

ArMV je rozšířeným virem v České republice i v sousedním Polsku a Německu (EPPO, 2017h). Na našem území byl detekován na maliníku (*Rubus idaeus* L.) a na vinné révě (*Vitis vinifera* L.) (Komínek, 2008; Komínek a Holleínová, 2003; Špak a kol. 1997). Případů, kdy byl ArMV detekován na bezu černém není mnoho. Podařilo se to Cadmanovi (1960) ve Velké Británii a Schimanskému (1991) v Německu. V rámci této práce byl detekován jeden vzorek bezu černého infikovaný ArMV na stření Moravě. Přestože se jedná o jediný pozitivní vzorek, je tento výsledek neočekávaný. Různé kmeny ArMV mají totiž odlišný okruh hostitelů, a tedy kmen ArMV infikující vinnou révu nebo maliník nemusí být schopen přenosu na bez (EPPO, 2017i). Příznaky na listech bezu infikovaného ArMV jsou podobné těm popsaným v literatuře (Cooper, 1979).

ApMV je běžným patogenem chmele (*Humulus lupulus* L.) vyskytujícím se na území České republiky. Dále byl na našem území detekován na hrušních (*Pyrus* spp. L.), lískách (*Corylus avellana* L.), slivoních (*Prunus domestica* L.), jabloních (*Malus domestica* L.) a dokonce i na řasách rodu *Trebouxia*, které jsou fotobiontem některých lišejníků. (Grimová a kol., 2013; Petrzik, 2005; Petrzik a Svoboda, 1997; Petrzik a kol., 2013). Existuje ojedinělá a nejednoznačná práce v rámci níž byl detekován ApMV na bezu černém v České republice (Grimová a kol., 2013). Analýza velkého počtu bezů však přítomnost ApMV na bezu nepotvrdila.

Viry rodu *Carlavirus* byly v České republice detekovány opakovaně. Přítomnost virů *Garlic common latent virus* (GarCLV) a *Shallot latent virus* (SLV) byla zjištěna na česneku (*Allium sativum* L.), přítomnost *Hop mosaic virus* (HpMV) na chmelu (*Humulus lupulus* L.) a přítomnost *Pea streak virus* (PeSV) na tolici vojtěšce (*Medicago sativa* L.) (Klukáčková a kol., 2007; Poke a kol., 2010; Sarkisová a kol., 2016). Vzhledem k tomu, že viry tohoto rodu mají úzký okruh hostitelů, se však nedá předpokládat, že by tyto viry mohly infikovat i bez černý (van Lent a kol., 1980). Viry rodu *Carlavirus* na bezu černém byly v rámci Evropy detekovány v Německu, Nizozemsku, Chorvatsku a v Polsku (Kalinowska a kol., 2013; Miličič a kol., 1987; Schimanski, 1991; van Lent a kol., 1980). Ze vzorků testovaných v rámci této bakalářské práce jich bylo 21 označených jako pozitivní pro viry rodu *Carlavirus*. Tedy z 52,5 % testovaných vzorků byl získán specifický produkt. Pozitivní vzorky pochází ze střední a jižní Moravy a jižních Čech. Dá se tedy usuzovat, že je CLRV na bezu rozšířen po celé České republice. Jedná se o velký podíl pozitivních vzorků. Viry rodu *Carlavirus* byly detekovány pomocí univerzálních degenerovaných primerů, není tedy možné určit konkrétní druh virů. BISCV na bezu nezpůsobil žádné viditelné symptomy (Kalinowska a kol., 2013), zatímco listy většiny bezů, u kterých byly detekovány pouze viry rodu *Carlavirus*, byly postiženy chlorotickou mozaikou. Je ale možné, že tyto bezy byly infikovány i jiným virem, který nebyl testován. Viry rodu *Carlavirus* působí synergicky s jinými viry (van Lent a kol., 1980). Bezy infikované směsnou infekcí carlavirů a CLRV byly podle předpokladu všechny symptomatické.

Ve střední Evropě byl TBRV detekován na bezu černém v Německu a v Polsku (Rymelska a kol., 2013; Schimanski, 1991). V České republice byla přítomnost TBRV zjištěna u vinné révy (*Vitis vinifera* L.), maliníku (*Rubus idaeus* L.) a jahodníku velkoplodého (*Fragaria x ananassa* Duch.) (Honetšlegrová a Špak, 1995; Komínek, 2008; Špak a kol., 1997). Ve všech výše zmíněných případech byl TBRV detekován jen u několika rostlin z většího množství testovaných. V rámci této práce ale nebyl nalezen žádný vzorek pozitivní pro TBRV.

SLRSV byl v České republice detekován na maliníku (*Rubus idaeus* L.), ostružiníku (*Rubus* spp. L.), jahodníku velkoplodém (*Fragaria x ananassa* Duch.) a na třešni (*Prunus avium* L.) (Honetšlegrová a Špak, 1995; Kumari, 2009; Špak a kol., 1997). Případy infekce SLRSV na bezu černém jsou známy v Severní Americe (EPPO, 2008; Tzanetakis a kol., 2006), v kontinentální Evropě ale zatím žádná infekce tímto virem na bezu nebyla

zaznamenána. Podle očekávání ani v rámci této práce nebyl SLRSV ve vzorcích bezu černého z ČR detekován.

Žádný ze vzorků, u kterých nebyl detekován žádný virus, nevykazoval žádné příznaky typické pro virové infekce. Dá se tedy předpokládat, že nejsou infikovány žádným virem.

7 ZÁVĚR

V rámci této bakalářské práce byly testovány vzorky z 39 rostlin bezu černého (*Sambucus nigra* subsp. *nigra*) a jeden vzorek z bezu chebdí (*Sambucus ebulus*) na přítomnost některých RNA virů. Vzorky pocházely z několika lokalit na území České republiky. Ve vzorcích byla prokázána přítomnost virů *Cherry leaf roll virus*, virů z rodu *Carlavirus*, které již dále nebyly určovány do druhů, a *Arabis mosaic virus*. Virem *Cherry leaf roll virus* bylo infikováno 30 % testovaných rostlin a viry rodu *Carlavirus* 52,5 % testovaných rostlin. *Arabis mosaic virus* byl detekován pouze v jednom vzorku (odpovídá 2,5 % testovaných rostlin). Dále byly testovány viry *Apple mosaic virus*, *Tomato black ring virus* a *Strawberry latent ringspot virus*, žádný z nich ale nebyl detekován.

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Applequist, W. L. (2015): A brief review of recent controversies in the taxonomy and nomenclature of *Sambucus nigra sensu lato*, Acta Horticulture 1061: 25–33.
- Berniak, H. (2016): Partial characterization of *Cherry leaf roll virus* (CLRV) isolates infecting *Sambucus* spp. plants in Poland. Acta Scientiarum Polonorum 15: 55-63.
- Bertolini, E., Olmos, A., Lopéz, M. M., Cambra, M. (2003): Multiplex nested reverse transcription-polymerase chain reaction in a single tube for sensitive and simultaneous detection of RNA four viruses and *Pseudomonas savastanoi* pv. *Savastanoi* in olive trees. Phytopathology 93: 286-292.
- Blatný, C., Osvald, V. (1950): Virosoy bezu černého (*Sambucus nigra*). Ochrana Rostlin 23: 9-11.
- Cadman, C. H. (1960): Studies on the relationship between soil-borne viruses of the ringspot type occurring in Britain and Continental Europe. Virology 11: 653-664.
- Cieślińska, M., Valasevich, N. (2016): Characterization of Apple mosaic virus isolates detected in hazelnut in Poland. Journal of Plant Diseases and Protection 123: 187–192.
- Cooper, J. I. (1979): Virus diseases of trees and shrubs. Institute of Terrestrial Ecology, Oxford.
- Cooper, J. I., Atkinson, M. A. (1975): *Cherry leaf roll virus* causing a disease of *Betula* spp. in the United Kingdom. Forestry 48: 193-203.
- Cropley, R. (1961): *Cherry leaf-roll virus*. Annals of Applied Biology 49: 524-529.
- Donoghue, M. J., Eriksson, T., Reeves, P. A., Olmstead, R. G. (2001): Phylogeny and phylogenetic taxonomy of Dipsacales, with special reference to *Sinadoxa* and *Tetradoxa* (*Adoxaceae*), Haward papers 6: 459–479.
- Eastwell, K. C., Mekuria, T. A., Druffel, K. L. (2012): Complete nucleotide sequences and genome organization of a cherry isolate of *Cherry leaf roll virus*. Archives of Virology 157: 761–764.
- Elbeaino, T., Digiario, M., Ghebremeskel, S., Martelli, G. P. (2012): Grapevine deformation virus: Completion of the sequence and evidence on its origin from recombination events between *Grapevine fanleaf virus* and *Arabidopsis mosaic virus*. Virus Research 166: 136-140.
- EPPO (2008): Schéma pro produkci zdravých sazenic: Certifikační schéma pro bez. OEPP/EPPO Bulletin 38: 19–24.
- EPPO (2017a): Cherry rasp leaf 'nepovirus'. EPPO quarantine list. [cit. 12.5.2017]. Dostupné z EPPO: <https://gd.eppo.int/taxon/CRLV00/documents>.
- EPPO (2017b): *Strawberry latent ringspot virus* [cit. 27.3.2017]. Dostupné z EPPO: <https://gd.eppo.int/taxon/SLRSV0/hosts>.
- EPPO (2017c): *Elderberry symptomless virus* [cit. 18.5.2017]. Dostupné z EPPO: <https://gd.eppo.int/taxon/ESLV00>.
- EPPO (2017d): *Tomato ringspot virus* [cit. 22.5.2017]. Dostupné z EPPO: <https://gd.eppo.int/taxon/TORSV0/distribution>.
- EPPO (2017e): *Tobacco ringspot virus* [cit. 23.5.2017]. Dostupné z EPPO: <https://gd.eppo.int/taxon/TRSV00/hosts>.

- EPPO (2017f): *Elderberry latent virus* [cit. 26.5.2017]. Dostupné z EPPO: <https://gd.eppo.int/taxon/ELLV00/hosts>.
- EPPO (2017g): *Elderberry latent virus* [cit. 1.7.2017]. Dostupné z EPPO: <https://gd.eppo.int/taxon/ELLV00/distribution>.
- EPPO (2017h): *Arabis mosaic virus* [cit. 25.9.2017]. Dostupné z EPPO: <https://gd.eppo.int/taxon/ARMV00/distribution>.
- EPPO (2017i): *Arabis mosaic 'nepovirus'*. EPPO quarantine list. [cit. 25.9.2017]. Dostupné z EPPO: https://www.eppo.int/QUARANTINE/data_sheets/virus/ARMV00_ds.pdf.
- Fang, L., Coutts, R. H. A. (2013): Investigations on the *Tobacco Necrosis Virus D p60* Replicase Protein. PLoS ONE 8: e80912.
- Fauquet, C. M., Mayo, M. A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L. A. (2005): Virus taxonomy, Eight report of the international committee on the taxonomy of viruses. Elsevier Academic Press, San Diego, London.
- Fletcher, J. T., MacNeill, B. H. (1971): Influence of environment, cultivar and virus strain on the expression of *Tobacco mosaic virus* symptoms in tomato. Canadian Journal of Plant Science 51: 101-107.
- Gao, F., Lin, W., Shen, J., Fiao, F. (2016): Genetic diversity and molecular evolution of *Arabis mosaic virus* based on the CP gene sequence. Archives of Virology 161: 1047.
- George, B., George, B., Awasthi, M., Singh, R. N. (2015): Genome wide survey and analysis of microsatellites in *Tombusviridae* family. Genes Genomes 37: 657–667.
- Grimová, L., Winkowska, L., Konrady, M., Ryšánek, P. (2016): *Apple mosaic virus*. Phytopathologia Mediterranea 55: 1–19.
- Grimová, L., Winkowska, L., Ryšánek P., Svoboda, P., Petrzik, K. (2013): Reflects the coat protein variability of apple mosaic virus host preference?. Virus Genes 47: 119–125.
- Hafez, E. S. E., Saber, G. A., Fattouh, F. A. (2010): *Tomato bushy stunt virus* (TBSV) infecting *Lycopersicon esculentum*. Zeitschrift für Naturforschung 65c: 619 – 626.
- Harrison, B. D. (1961): Transmission of a strain of *Tomato black ring virus* by *Longidorus elongatus* (Nematoda). Virology 14: 480-485.
- Ho, T., Quito-Avila, D., Keller, K. E., Postman, J. D., Martin, R. R., Tzanetakis, I. E. (2016): Evidence of sympatric speciation of elderberry carlaviruses. Virus Research 215: 72–75.
- Holb, I. J., Fodor, B., Lakatos, P., Abonyi, F., Balla, B., Fazekas, M., Gáll, J. M. (2010): Effect of production system and pruning on *Aphis sambuci* dynamics over time and on elderberry yield. Journal of Applied Entomology 134: 615-625.
- Honetšlegrová, J., Špak. K. (1995): Detection and isolation of nepoviruses on strawberry in the Czech Republic. Acta Virologica 39: 121-124.
- Chang, H.-X., Brown, P. J., Lipka, A. E., Domier, L. L., Hartman, G. L. (2016): Genome-wide association and genomic prediction identifies associated loci and predicts the sensitivity of *Tobacco ringspot virus* in soybean plant introductions. BMC Genomics 17:153.
- Charlebois, D. (2007): Elderberry as a medicinal plant. In: Janick, J., Whipkey, A. (eds.): Issues in new crops and new uses, pp. 284–292, ASHS, Alexandria.

- Chen, J., Watanabe, Y., Sako, N., Ohshima, K., Okada, Y. (1996): Mapping of host range restriction of the rakkyo strain of *Tobacco mosaic virus* in *Nicotiana tabacum* cv. Bright Yellow. *Virology* 226: 198–204.
- ICTV (2017a): Taxonomy [cit. 26.5.2017]. Dostupné z ICTV: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>.
- ICTV (2017b): Complete section as applicable [cit. 16.10.2017]. Dostupné z ICTV: https://talk.ictvonline.org/ICTV/proposals/2014.006aP.A.v2.Tombusviridae_4sp.pdf.
- James, D., Upton, C. (2002): Nucleotide sequence analysis of RNA-2 of a flat apple isolate of *Cherry rasp leaf virus* with regions showing greater identity to animal picornaviruses than to related plant viruses. *Archives of Virology* 147: 1631–1641.
- Jończyk, M., Le Gall, O., Pałucha, A., Borodynko, N., Pospieszny, H. (2004): Cloning and sequencing of full-length cDNAs of RNA1 and RNA2 of a *Tomato black ring virus* isolate from Poland. *Archives of Virology* 149: 799-807.
- Jones, A. T. (1972): Purification and properties of elderberry latent virus, one of four sap-transmissible viruses obtained from American elder (*Sambucus canadensis* L.). *Annals of Applied Biology* 70: 49-58.
- Jones, A. T., McGavin, W. J. (2008): A damaging outbreak of *Arabidopsis mosaic nepovirus* in blackcurrant, the occurrence of other nepoviruses in *Ribes* species, and the demonstration that *Alfalfa mosaic virus* is the cause of interveinal white mosaic in blackcurrant. *Annals of Applied Biology* 129: 47-55.
- Jones, A. T., McGavin, W. J., Brunt, A. A., Phillips, S. (2000): *Elderberry latent virus*: its relationship to *Pelargonium ringspot virus* and its identification as a distinct member of the genus *Carmovirus*, family *Tombusviridae*. *Annals of Applied Biology* 136: 147-152.
- Jones, A. T., Murrant, A. F. (1971): Serological relationship between cherry leaf roll, elm mosaic and golden elderberry viruses. *Annals of Applied Biology* 69: 11-15.
- Kalinowska, E., Paduch-Cichal, E., Chodorska, M. (2013): First Report of *Blueberry scorch virus* in elderberry in Poland. *Plant Disease* 97: 1515.
- Keller, K. E, Mosier, N. J., Thomas, A. L., Quito-Avila, D. F, Martin, R. R. (2015): Identification of two new carlaviruses in elderberry. *Acta Horticulturae* 1061: 161-164.
- Kim, H. S., Kim, D. W., Jung, Y.-T. (2016): Development of serological procedures for sensitive, rapid detection of *Cucumber mosaic virus* in *Lilium*. *Horticulture, Environment, and Biotechnology* 57: 633–639.
- King, A. M. Q., Adams, M. J., Carstens, E. B., Lefkowitz, E. J. (2012): *Virus taxonomy*, Ninth report of the international committee on the taxonomy of viruses. Elsevier Academic Press, Amsterdam.
- Klukáčková, J., Navrátil, M., Duchoslav, M. (2007): Natural infection of garlic (*Allium sativum* L.) by viruses in the Czech Republic. *Journal of Plant Diseases and Protection* 114: 97–100.
- Komínek, P. (2008): Distribution of grapevine viruses in vineyards of the Czech Republic. *Journal of Plant Pathology* 90: 357-358.
- Komínek, P., Holleínová, V. (2003): Evaluation of sanitary status of grapevines in the Czech Republic. *Plant, Soil and Environment* 49: 63-66.

- Kondakova, V. (1998a) Studies on Nepo—Viruses in strawberry II. Isolation and Identification of *Arabid mosaic virus* from strawberry in Bulgaria. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 12: 39-42.
- Kondakova, V. (1998b): Studies on Nepo—Viruses in strawberry “Identification of *Strawberry latent ringspot virus* in Bulgaria”. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 12: 37-38.
- Kumari, S. (2009): Detection of *Cherry leaf roll virus* and *Strawberry latent ring spot virus* by one-step RT-PCR. *Plant Protection Science* 45: 140–143.
- Lakshmi, V., Hallan, V., Ram, R., Ahmed, N., Zaidi, A. A., Varma, A. (2011): Diversity of Apple mosaic virus isolates in India based on coat protein and movement protein genes. *Indian Journal of Virology* 22: 44-49.
- Li, J. L., Cornman, R. S., Evans, J. D., Pettis, J. S., Zhao, Y., Murphy, C., Peng, W. J., Wu, J., Hamilton, M., Boncristiani Jr., H. F., Zhou, L., Hammond, J., Chen Y. P. (2014): Systemic spread and propagation of a plant-pathogenic virus in european honeybees, *Apis mellifera*. *mBio* 5: e00898-13.
- Lin, H.-X., Rubio, L., Smythe, A., Jiminez, M., Falk, B. W. (2003): Genetic diversity and biological variation among California isolates of *Cucumber mosaic virus*. *Journal of General Virology* 84: 249–258.
- Luigi, M., Godena, S., Dermic, E., Barba, M., Faggioli, F. (2011): Detection of viruses in olive trees in Croatian Istria. *Phytopathologia Mediterranea* 50: 150-153.
- Marais, A., Faure, Ch., Mustafayev, E., Candresse, T. (2015): Characterization of new isolates of *Apricot vein clearing-associated virus* and of a new *Prunus*-infecting virus: Evidence for recombination as a driving force in *Betaflexiviridae* evolution. *PLoS ONE* 10: e0129469.
- Mayo, M. A., Jones, A. T. (1973): The protein and nucleic acid components of *Elderberry latent virus*. *Journal of General Virology* 19: 245-252.
- McKinney, H. H., Clayton, E. E. (1945): Genotype and temperature in relation to symptoms caused in *Nicotiana* by the mosaic virus. *The Journal of Heredity* 36: 323-331.
- Miličić, D., Plavšić, B., Grbelja, J., Živojin, E. (1987): *Cherry leafroll virus* and *Elderberry carlavirus* on *Sambucus nigra* L. in south-east Europe. *Acta Botanica Croatica* 46: 1-8.
- Mircetich, S. M., Rowhani, A. (1984): The relationship of *Cherry leafroll virus* and blackline disease of English walnut trees. *Phytopathology* 74: 423-428.
- Mohebalian, P. M., Cernusca, M. M., Aguilar, F. X. (2012): Discovering niche markets of elderberry juice in the United States, *HortTechnology* 22: 556-566.
- Montalbini, P., Della Torre, G. (1996): Evidence of a two-fold mechanism responsible for the inhibition by allopurinol of the hypersensitive response induced in tobacco by *Tobacco necrosis virus*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 48: 273–287.
- Mueller, W. C. (1967): *Tobacco mosaic virus* obtained from diseased wisteria and elder. *Plant Disease Reporter* 51: 1053-1054.
- Murphy, J. F., Masiri, J., Hadi, B. A. R., Dute, R. R. (2016): Recovery from *Cucumber mosaic virus* infection for "calwonder" bell pepper plants does not counter negative impacts on plant growth. *Journal of Phytopathology* 164: 840-846.

- Novák, J. B., Lanzová, J. (1976): Identification of *Alfalfa mosaic virus* and *Tomato bushy stunt virus* in hop (*Humulus lupulus* L.) and grapevine (*Vitis vinifera* subsp. *sativa* (DC./HEGI) plants in Czechoslovakia. *Biologia Plantarum* 18: 152-154.
- Palukaitis, P., Roossinck, M. J., Dietzgen, R. G., Francki, R. I. B. (1992): *Cucumber mosaic virus*. *Advances in Virus Research* 41: 281-348.
- Pantaleo, V., Saponari, M., Gallitelli, D. (2001): Development of nested PCR protokol for detection of olive-infecting viruses in crude extracts. *Journal of Plant Pathology* 83: 143-146.
- Pethybridge, S. J., Wilson, C. R., Hay, F. S., Leggett, G. W., Sherriff, L. J. (2002): Mechanical transmission of *Apple mosaic virus* in Australian hop (*Humulus lupulus*) gardens. *Annals of Applied Biology* 141: 77-85.
- Petrzik, K. (2005): Capsid protein sequence gene analysis of *Apple mosaic virus* infecting pears. *European Journal of Plant Pathology* 111: 355-360.
- Petrzik, K., Svoboda, P. (1997): Screening of *Apple mosaic virus* in hop cultivars in the Czech Republic by reverse transcription polymerase chain reaction. *Acta Virologica* 41: 101-103.
- Petrzik, K., Vondrák, J., Barták, M., Peksa, O., Kubešová, O. (2013): Lichens—a new source or yet unknown host of herbaceous plant viruses?. *European Journal of Plant Pathology* 138: 549-559.
- Poke, F. S., Crowle, D. R., Whittock, S. P., Wilson, C. R. (2010): Molecular variation of hop mosaic virus isolates. *Archives of Virology* 155: 1721-1724.
- Rebenstorf, K., Candresse, T., Dulucq, M. J., Büttner, C., Obermeier, C. (2006): Host species-dependent population structure of a pollen-borne plant virus, *cherry leaf roll virus*. *Journal of Virology* 80: 2453-2462.
- Roggero, P., Lisa, V. (1995): Characterization of an isolate of *Tobacco necrosis virus* from zucchini. *Journal of Phytopathology* 143: 485-489.
- Roschek Jr., B., Fink, R. C., McMichael, M. D., Li, D., Alberte, R. S. (2009): Elderberry flavonoids bind to and prevent H1N1 infection in vitro. *Phytochemistry* 70: 1255-1261.
- Rymelska, N., Borodynko, N., Pospieszny, H., Hasiów-Jaroszewska, B. (2013): Analysis of the biological and molecular variability of the Polish isolates of *Tomato black ring virus* (TBRV). *Virus Genes* 47: 338-346.
- Sánchez-Navarro, J. A., Aparicio, F., Herranz, M. C., Minafra, A., Myrta, A., Pallás, V. (2005): Simultaneous detection and identification of eight stone fruit viruses by one-step RT-PCR. *European Journal of Plant Pathology* 111: 77-84.
- Sarkisová, T., Bečková, M., Fránová, J., Petrzik, K. (2016): *Pea streak virus* recorded in Europe. *Plant Protection Science* 52: 164-166.
- Schimanski, H. H. (1991): Virus incidence in natural stands of elder (*Sambucus nigra* L.). *Zentralblatt Fur Mikrobiologie* 146: 455-461.
- Slavík, B. (2010): *Květena České republiky* 5. Akademia. Praha.
- Šafářová, D., Candresse, T., Navrátil, M. (2017): Complete genome sequence of a novel bromovirus infecting elderberry (*Sambucus nigra* L.) in the Czech Republic. *Archives of Virology*, doi: 10.1007/s00705-017-3629-1.

- Špak, J., Kubelková, D., Honetšlegrová-Fránová J. (1997): Occurrence of nepoviruses in *Rubus* species in the Czech Republic. *Acta Virologica* 41: 177-179.
- Teakle, D. S. (1962): Necrotic symptoms of *Tobacco necrosis virus* in roots. *Phytopathology* 52: 1037-1040.
- Thomas, A. L., Byers, P. L., Avery Jr., J. D., Kaps, M., Gu, S., Johnson, H.-Y., Millican, M. (2015): 'Marge': a european elderberry for North American producers. *Acta Horticulturae* 1061: 191-199.
- Thompson, J. R., Kamath, N., Perry, K. L. (2014): An evolutionary analysis of the *Secoviridae* family of viruses. *PLoS ONE* 9: e106305.
- Tzanetakis, I. E., Postman, J. D., Gergerich, R. C., Martin, R. R. (2006): A virus between families: nucleotide sequence and evolution of *Strawberry latent ringspot virus*. *Virus Research* 121: 199-204.
- Uncini Manganelli, R.E., Zaccaro, L., Tomei, P.E. (2005): Antiviral activity in vitro of *Urtica dioica* L., *Parietaria diffusa* M. et K. and *Sambucus nigra* L. *Journal of Ethnopharmacology* 98: 323-327.
- Úradníček, L., Maděra, P., Tichá, S., Koblížek, J. (2009): Dřeviny České republiky, 2. přepracované vydání. Lesnická práce, Kostelec nad Černými lesy.
- Uyemoto, J. K. (1970): Symptomatically distinct strains of *Tomato ringspot virus* isolated from grape and elderberry. *Phytopathology* 60: 1838-1841.
- Uyemoto, J. K.; Gilmer, R. M.; Williams, E., 1971: Sap-transmissible viruses of elderberry in New York. *Plant Disease Reporter*, 55: 913-916.
- van Lent, J. W. M., Wit, A. J., Dijkstra, J. (1980): Characterization of carlavirus in elderberry (*Sambucus* spp.). *Netherlands Journal of Plant Pathology* 86: 117-134.
- Veberic, R., Jakopic, J., Stampar, F., Schmitzer, V. (2009): European elderberry (*Sambucus nigra* L.) rich in sugars, organic acids, anthocyanins and selected polyphenols. *Food Chemistry* 114: 511-515.
- Villamor, D. E. V., Eastwell, K. C. (2016): *Sambucus nigra* subsp. *caerulea* and *Malva* spp.: Newly identified hosts of *Cherry rasp leaf virus*. *Plant disease* 100: 867.
- ViralZone (2017a): *Nepovirus* [cit. 29.3.2017]. Dostupné z ViralZone: http://viralzone.expasy.org/all_by_species/300.html.
- ViralZone (2017b): *Bromoviridae* [cit.6.4.2017]. Dostupné z ViralZone: http://viralzone.expasy.org/all_by_species/31.html.
- ViralZone (2017c): *Betaflexiviridae* [cit. 25.5.2017]. Dostupné z ViralZone: http://viralzone.expasy.org/739?outline=all_by_species.
- ViralZone (2017d): *Carlavirus* [cit. 25.5.2017]. Dostupné z ViralZone: http://viralzone.expasy.org/268?outline=all_by_species.
- ViralZone (2017e): *Tombusviridae* [cit. 25.5.2017]. Dostupné z ViralZone: http://viralzone.expasy.org/53?outline=all_by_species.
- ViralZone (2017f): *Tobamovirus* [cit. 1.6.2017]. Dostupné z ViralZone: http://viralzone.expasy.org/51?outline=all_by_species.

- von Barga, S., Grubits, E., Jalkanen, R., Büttner, C. (2009): *Cherry leaf roll virus* - an emerging virus in Finland?. *Silva Fennica* 43: 727–738.
- Walker, M., Chisholm, J., Wei, T., Ghoshal, B., Saeed, H., Rott, M., Sanfacon, H. (2015): Complete genome sequence of three *Tomato ringspot virus* isolates: evidence for reassortment and recombination. *Archives of Virology* 160: 543–547.
- Wang, S., Gergerich, R. C., Wickizer, S. L., Kim, K. S. (2002): Localization of transmissible and nontransmissible viruses in the vector nematode *Xiphinema americanum*. *Phytopathology* 92: 646-653.
- Way, R. D. (1981): Elderberry culture in New York State. *New York's Food and Life Sciences Bulletin* 91.
- Zadeh, A. H., Foster, G. D. (2001): Cloning and sequencing of the coat protein gene of tobacco ringspot virus isolates from UK and Iran. *Acta Virologica* 45: 319-326.
- Zemánek, T. (2017): dsRNA pre stanovenie virómu rastlín. Diplomová práce. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc.