

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2017

Veronika Neoralová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



Mandloň obecná (*Prunus dulcis* (Mill.) D. A. Webb)
hostitel viru šarky švestky (*Plum pox virus*)

Bakalářská práce

Veronika Neoralová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2017

Vedoucí práce: Mgr. Dana Šafářová, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Dany Šafářové, Ph.D. a podklady, z nichž jsem čerpala, jsou uvedeny v přehledu literárních zdrojů.

V Olomouci dne

Podpis

SOUHRN

Bakalářská práce se zaměřuje na virus šarky švestky (*Plum Pox virus*, PPV) s důrazem na hostitele mandloň obecnou (*Prunus dulcis* (Mill.) D. A. Webb).

Práce je rozdělena do dvou částí. Teoretická část obsahuje literární rešerši shrnující dosavadní poznatky o viru i hostiteli a experimentální část zahrnuje detekci tří významných virů peckovin v celkem 62 stromech, z toho 48 mandloních obecných pocházejících ze 4 oblastí v České republice – Kaple, Čelechovice, Lednice (genové zdroje MENDELu), Horní Věstonice a Hustopeče.

Ve vzorcích byly provedeny detekce následujících patogenů: *Plum pox virus* (PPV) z čeledi *Potyviridae*, *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV) a *Prune dwarf virus* (PDV) – oba z čeledi *Bromoviridae*.

Mandloň obecná může být vzácně přirozeně infikována PPV, avšak nevykazuje výrazné symptomy spojené s ekonomickými ztrátami (Festić, 1978), které mohou u jiných náchylnějších hostitelů i úplně znehodnotit úrodu. Symptomy šarky na mandloních nejsou spolehlivým indikátorem přítomnosti PPV. Mohou znamenat infekci jinými patogeny indukujícími podobné symptomy jako například netypické zabarvení květů, žloutnutí listů, chlorotické skvrny a zesvětlení nervatury, nebo také koinfekci více viry. Příkladem mohou být jednotlivé i směsné infekce PNRSV, PDV či ACLSV (Németh, 1986; Nemchinov a Hadidi 1996; Creszenci a kol., 1997).

V současnosti se PPV infikované mandloně nachází ojediněle v Turecku (Akbaş a kol., 2011; Karabacak a Ilbaği, 2011; Ilbaği a Citir, 2014), Maďarsku (Pribék a kol., 2001; Kölber a kol., 2003), Bulharsku (Topchiiska, 1996; Kamenova a Milusheva, 2005) a Rumunsku (Macovei a Diaconu, 2001). Incidence je však nízká a navíc v oblastech, kde převažuje pěstování jiných druhů peckovin. Proto tyto výjimečné případy infekce nejsou závažnou hrozbou tamější ovocné produkce. Mimo Evropu byl PPV na mandloních potvrzen v Čile (Herrera a kol., 1994; 2013).

V souboru testovaných vzorků nebyla zjištěna infekce PPV, přestože některé stromy jevíly na listech symptomy možných virových onemocnění. Výsledky potvrdily, že v současnosti na našem území nejsou mandloně přirozenými hostiteli PPV a nepředstavují hrozbu v jeho epidemiologii. Za vhodných podmínek mohou být hostiteli experimentálními (Dallot a kol., 1997; Damsteegt a kol., 2007a; Petrov a Stoev, 2011). Pouze kmeny PPV-M, -D a -T nyní infikují mandloně (Pribék a kol., 2001; Kölber a kol., 2003; Ilbaği a Citir, 2014). Ve vzorcích však byly detekovány případy jednotlivých i směsných infekcí PDV a PNRSV. PNRSV byl detekován v koinfekci s PDV v pěti ze čtyřiceti mandloní a jednotlivě v pěti višních a jedné švestce. PDV byl detekován ve třiceti ze čtyřiceti osmi mandloní, ve třech švestkách a dvou višních.

SUMMARY

The bachelor thesis is focused on the *Plum pox virus* (PPV) with emphasis on host almond (*Prunus dulcis* (Mill.) D. A. Webb).

The thesis is divided into two parts. The theoretical part includes literature search which summarizes current knowledge about both the virus and the host. The experimental part of this thesis is focused on detection of 3 different viruses in samples collected from 62 trees, including 48 almonds, originating from 4 different locations in the Czech Republic – Kaple, Čelechovice, Lednice, Horní Věstonice and Hustopeče.

Detections of following pathogens were carried out in samples: *Plum pox virus* (PPV), belonging to the *Potyviridae* family, *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV) and *Prune dwarf virus* (PDV) - both belonging to the *Bromoviridae* family.

Almond can rarely be naturally PPV infected, but does not exhibit strong symptoms associated with economic losses (Festić, 1978), which may be present in other susceptible hosts and sometimes completely devalue the crop. Symptoms of sharka on almonds are not reliable indicator of PPV infection. They may be related to other viral infections inducing similar symptoms like atypical flowers coloring, yellowing of leaves, chlorotic mosaic and vein clearing. For example individual or mixed infections by PNRSV, PDV or ACLSV (Németh, 1986; Nemchinov a Hadidi 1996; Creszenci a kol., 1997).

Nowadays in Europe, PPV infected almonds are only present in Turkey (Akbaş et al., 2011; Karabacak and Ilbaği, 2011; Ilbaği and Citir, 2014), Hungary (Kölber et al., 2003), Bulgaria (Topchiiska 1996; Milusheva, 2005) and Romania (Macovei a Diaconu, 2001). However, the incidence is low and in areas where other species of stone fruit are predominant. Therefore, these rare cases are not a serious threat to the local fruit production. Out-of-Europe PPV infected almonds has been confirmed in Chile (Herrera et al., 1994; 2013).

In tested samples no PPV infections were detected although some of the trees including almonds had characteristic symptoms of possible viral disease. In Czech republic almonds are not natural PPV host and represent no significant risk in epidemiology of PPV so far. Under suitable conditions almonds may be experimental hosts. Only strands PPV-M, -D and -T are now infecting almonds. However, the situation might get worse with changing climatic conditions. In some samples some cases of both individual and mixed infections by PDV and PNRSV were detected. PNRSV was found in coinfection with PDV in five almonds and individually in five tart cherries and one plum. PDV was found in thirty out of forty-eight almonds, three plums and two tart cherries.

Poděkování

Ráda bych poděkovala Mgr. Daně Šafářové, Ph.D. za její odborné vedení, rady a čas, který mi věnovala. Dále děkuji p. Janě Veselské za pomoc v laboratoři a také rodičům, kteří mě ve studiu podporují.

Obsah

1. ÚVOD	8
2. CÍLE PRÁCE	9
3. LITERÁRNÍ PŘEHLED	10
3.1. Charakteristika rodu slivoň	10
3.2. Charakteristika mandloně obecné	10
3.2.1. Plody mandloní	12
3.2.2. Hospodářský význam mandloní	13
3.2.3. Toxicita semen mandloní	13
3.2.4. Geografické rozšíření mandloně	13
3.2.5. Virové patogeny mandloní	14
3.2.5.1. <i>Prunus necrotic ringspot virus</i> (PNRSV)	14
3.2.5.2. <i>Prune dwarf virus</i> (PDV)	15
3.2.5.3. <i>Apple chlorotic leafspot virus</i> (ACLSV)	15
3.3. Charakteristika viru šarky švestky	16
3.3.1. Úvod a taxonomické zařazení viru šarky švestky	16
3.3.2. Charakteristika kmenů viru šarky švestky	17
3.3.3. Biologická charakteristika viru šarky švestky	20
3.3.3.1. Hostitelský okruh viru šarky švestky z rodu slivoň	20
3.3.3.2. Hostitelé viru šarky švestky mimo rod slivoň	21
3.3.3.3. Distribuce viru šarky švestky v hostiteli	22
3.3.3.4. Symptomy šarky švestky na rodu slivoň	23
3.3.3.4.1. Symptomy šarky švestky na mandloních	23
3.3.3.4.2. Symptomy šarky švestky na listech slivoní	23
3.3.3.4.3. Symptomy šarky švestky na plodech slivoní	24
3.3.3.4.4. Další symptomy šarky švestky	24
3.3.3.5. Způsoby přenosu viru šarky švestky	24
3.3.4. Geografické rozšíření viru šarky švestky	26
3.3.4.1. Distribuce viru šarky švestky v Evropě	26
3.3.5. Molekulární charakteristika viru šarky švestky	28
3.3.5.1. Organizace genomu a strategie exprese viru šarky švestky	29
3.3.6. Způsoby ochrany před virem šarky švestky	32
3.3.7. Virus šarky švestky na mandloních	33
3.3.7.1. Rezistence mandloní k viru šarky švestky	34

3.3.8.	Metody detekce viru šarky švestky	35
4.	MATERIÁL a METODY	37
4.1.	Biologický materiál	37
4.2.	Metody	39
4.2.1.	Izolace RNA	39
4.2.1.1.	Izolace celkové RNA z listů ('silica capture')	39
4.2.1.2.	Izolace celkové RNA z květů	40
4.2.2.	Reverzní transkripce	40
4.2.3.	Detekce <i>Plum pox virus</i> (PPV)	41
4.2.4.	Detekce <i>Prune dwarf virus</i> (PDV)	42
4.2.5.	Detekce <i>Prunus necrotic ringspot virus</i> (PNRSV)	43
4.2.6.	Elektroforetická separace v agarózovém gelu	44
4.3.	Použité chemikálie a roztoky, přístroje, laboratorní vybavení	45
4.3.1.	Použité chemikálie a roztoky	45
4.3.2.	Přístroje a laboratorní vybavení	46
5.	VÝSLEDKY	47
6.	DISKUZE	51
7.	ZÁVĚR	54

1. ÚVOD

Virus šarky švestky (*Plum pox virus*, PPV) náleží do rodu *Potyvirus* z čeledi *Potiviridae*. Je jediným zástupcem *Potyvirus*, který napadá rod *Prunus*. Virus patří díky svým vlastnostem, širokému areálu rozšíření a schopnosti znehodnotit úrodu mnohých zástupců rodu *Prunus* k nejdestruktivnějším a nejnebezpečnějším rostlinným patogenům. Je původcem šarky švestky, závažného onemocnění peckovin, které nejvíce škodí na švestkách domácích (*P. domestica* L.), broskvoních obecných (*P. persica* L.), broskvoních nektarinkách (*P. persica* (L.) Batsch var. *nucipersica* (Suckow) C.K. Schneid) a meruňkách obecných (*P. armeniaca* L.), méně pak na višních obecných (*P. cerasus* L.) a třešních obecných (*P. avium* L.). Mandloň obecná (*P. dulcis* (Mill.) D. A. Webb) může být PPV také infikována, avšak bez výrazných symptomů, spojených s ekonomickými ztrátami (Festić, 1978; Németh, 1986; 1994; Nemchinov a Hadidi 1996; Creszenci a kol., 1997). Rozsah infekce a závažnost škod závisí na virovém izolátu, druhu a kultivaru hostitele, jeho fitness a ekologických podmínkách. PPV se šíří vegetativně distribucí infikovaného rostlinného materiálu a hmyzími vektory. Dnes je rozšířen globálně. V zemích, kde je ovocnářství šarkou nejvíce ohroženo, je nutná prevence dalšího šíření, pravidelné velkoplošné testování, eradikační programy a přísná fyto-sanitární opatření, kterými lze šíření viru alespoň zpomalit. Jedinou spolehlivou ochranou proti této neléčitelné viróze je likvidace veškerých zdrojů infekce a vývoj nových PPV rezistentních genotypů. Pojmenování „plum pox“ vychází z podobnosti symptomů šarky neštovicím („šarka“ – bulharsky znamená neštovice).

Tato bakalářská práce je zaměřena na molekulárně-biologickou charakteristiku viru šarky švestky a jejího hostitele mandloně obecné. Cílem experimentální části byla detekce 3 významných virů mandloní ve vybraných vzorcích.

2. CÍLE PRÁCE

Cílem této bakalářské práce bylo:

1. Vypracování literární řešerše na téma „Virus šarky švestky (*Plum pox virus*), jeho molekulárně-genetická a biologická charakteristika s důrazem na mandloň obecnou (*Prunus dulcis* (Mill.) D. A. Webb) jako hostitele“.
2. Zvládnutí technik izolace RNA, RT-PCR a elektroforetické separace.
3. Skríníng vybraného souboru mandloní a detekce *Plum pox virus* (PPV), *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV) a *Prune dwarf virus* (PDV) ve vzorcích listů a květů mandloní.

3. LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1. Charakteristika rodu slivoň

Rod slivoň (*Prunus* L.) náleží do podčeledi slivoňovitých, mandloňovitých (*Amygdaloideae*, *Prunoideae*) (Takhtajan, 1997), z čeledi růžovitých (*Rosaceae*), řádu růžotvarých (*Rosales*), třídy dvouděložných (*Magnoliopsida*), které spadá do oddělení krytosemenných rostlin (*Magnoliophyta*). Slivoň jsou nejčastěji opadavé, vzácně stálezelené dřeviny stromovitého nebo keřovitého vzrůstu rostoucí převážně v mírném pásmu severní polokoule. Listy slivoní rostou střídavě, jsou jednoduché, po okrajích zubaté. Květy vyrůstají jednotlivě nebo v květenstvích, bývají bílé až růžové barvy s pěti korunními a pěti kališními lístky. Plodem je kulatá až oválná peckovice s jedinou velkou zploštělou peckou (Srinivasan a kol., 2004; Hummer a Janick, 2009).

3.2. Charakteristika mandloně obecné

synonyma: *Prunus dulcis* (Mill.) D. A. Webb, *P. amygdalus* (L.) Batsch., *P. communis* L.,
Druparia amygdalus Clairv., *Amygdalus communis* L., *Amygdalus dulcis* Mill.

podřízené taxony: *P. dulcis* var. *fragilis*, *P. dulcis* var. *persicoides*, *P. dulcis* var. *semifragilis*,
P. dulcis var. *typica*, *P. dulcis* var. *dulcis*, *P. dulcis* var. *amara*

V současné době je popsáno kolem 30 poddruhů mandloní. Liší se v geografické distribuci a morfologii, avšak mezi některými poddruhy jsou jen minimální rozdíly. Mnoho z nich je globálně rozšířeno, jiné jsou přítomny pouze na konkrétních lokalitách (Browicz, 1989). Jen v blasti středomoří bylo identifikováno 485 typů mandloní (Küden a kol., 1993).

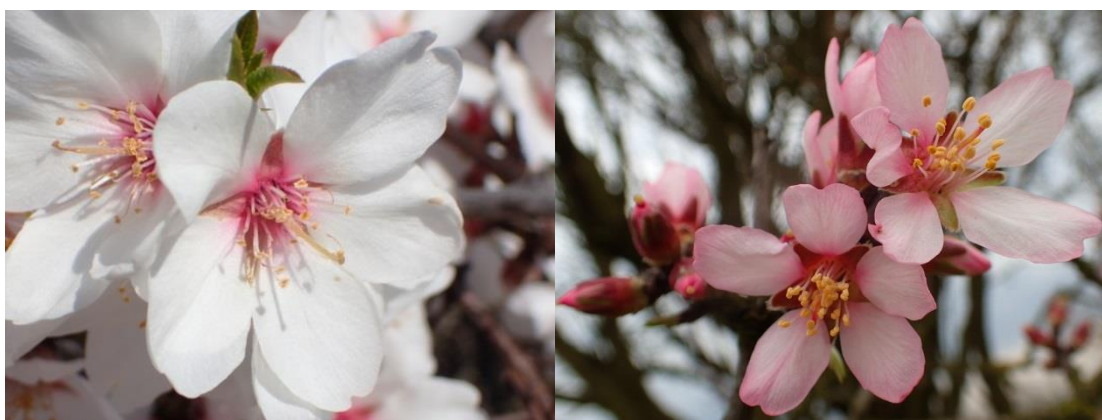
Mandloň obecná je 2 až 7 metrů vysoký teplomilný keř nebo strom rostoucí převážně v mírném středomořském podnebí, kde dochází ke střídání dlouhých vegetačních období v podobě teplých suchých lét, a kratších dormantních období v podobě mírných vlhkých zim. Mandloň je velmi tolerantní k horku a suchu a dobře snáší i kontinentální podnebí (Bernad, 1995). Daří se jí na slunných stanovištích, v polopropustných provzdušněných půdách zásobených živinami s přiměřeným, spíše výjimečným, zavlažováním. Dobře roste i na kamenitých půdách. Nesnáší těžké, kyselé a příliš podmáčené půdy (Kester a kol., 1991; Kester a Gradziel, 1996; Sus a kol., 2003; Gradziel, 2009, 2011; Yazbek a Oh., 2013). Mandloně plodí na jednoletých výhonech 2 až 4 roky po výsadbě a dosahují věku 25 až 50 let. Jsou-li pěstovány ze semen, mohou plodit hořká semena (Dicenta a García, 1993). Efektivního pěstování je docíleno roubováním

požadovaných kultivarů na vhodné podnože. Kombinací vlastností obou rostlin je docíleno lepší adaptace k vnějším podmínkám i zlepšení některých biologických vlastností nově naštěpované rostliny, takzvané „chiméry“. Roubování může být také způsobem přenosu rezistence k PPV (Pascal a kol., 2001; Martínez-Gómez a kol., 2004a, 2004b; Rubio-Cabetas a kol., 2010; Rubio a kol., 2003, 2013; Salava a kol., 2013).

Mandloň vytváří husté, v pozdějším věku mírně převislé, široce rozložené koruny. Kmen může mít průměr i přes 30 cm. Kůra je v mládí hladká šedozelená, později podélně rozbrázděná. Mladé větve jsou lysé zelené až načervenalé, často s popelavě šedým povlakem, hustě pokryté světlými lenticelami. Letorosty bývají středně dlouhé, v pozdějším období tmavnou, šednou až fialoví. Listy mají délku 5 až 12 cm, což asi dvojnásobek délky řapíku, jsou podlouhlé s ostrou špičkou. Čepel je kopinatá až věnčitě kopinatá. Květy se liší mezi kultivary, nejčastěji jsou bílé, zřídka narůžové, v průměru 3 až 4 cm široké. Bývají jednoduché a jednodomé. Kvetou od března do května ještě před vyrašením listů a ve vnitrozemí jsou často náchylné k jarním mrazíkům, které mohou ohrozit úrodu (Bernad, 1995; Rubio-Cabetas a kol., 2010). Jsou velmi podobné květům broskvoně. Korunní plátky jsou opakvěčité s mírným nebo žádným překrytím. Semeník je protáhlý, jemně plstnatý. Květní lůžko má zvonkovitý tvar. Vnitřní strana kalichu je žlutá, vnější tmavě zelená (Kester a kol., 1991; Kester a Gradziel, 1996; Sus a kol., 2003; Gradziel, 2009, 2011; Hummer a Janick, 2009).

Mandloň je rostlina alogamní a ke svému opylení tedy vyžaduje pyl druhé rostliny. Křížové opylení s divokými druhy mandloní je důvodem široké škály mandloňových kultivarů, je zdrojem genetické variability a tudíž i adaptivity k novým prostředím. Jsou však známy i odrůdy částečně či plně autogamní (Socias i Company, 1998; Bernad, 1995; Gradziel, 2009). Nejvýznamnějším opylovačem je včela medonosná (*Apis mellifera* L.).

Obrázek č. 1: Květy mandloní obecných (foto D. Šafářová)



Obrázek č. 2: Listy a plody mandloní obecných (D. Šafářová)



3.2.1. Plody mandloní

Plody mandloně jsou bočně zploštělé, podlouhlé, jemně plstnaté zelené peckovice dozrávající na podzim, asi 7 až 8 měsíců od vykvetení. Jejich zralost lze posoudit ze sesychání a praskání zelené rubiny, která se rozdělí ve svém ventrálním švu, odloupne se a odhalí endokarp. Tímto se mandloň odlišuje od jiných druhů *Prunus* produkujících dužnaté plody trvale chránící pecku uvnitř.

Oplodí neboli perikarp má tři části. (1) Svrchním exokarpem je světle zelená, stříbrně plstnatá slupka. (2) Mezokarp je tvořen světlejší nažloutlou kožovitou dužinou. Exokarp a mezokarp tvoří dohromady rubinu plodu, jež se během zrání zbarvuje hnědo-fialově, puká, otevírá se a odhaluje snadno luštitelná jádra. (3) Endokarpem je tvrdá, světle hnědá pecka neboli sklerokarp. Její velikost, tvar, tvrdost, rozvrásnění i pórovitost spolu s chutí a aroma semen, jsou typické pro každý kultivar. Žádoucími vlastnostmi u ovocných kultivarů je velký hmotnostní podíl semena v co nejtenčím endokarpu. Křehká tenká pecka však zvyšuje riziko znehodnocení úrody hmyzem nebo chorobami. Pecka obsahuje jedno až tři výživná semena nazývaná „jádra“ nebo „mandle“. Vícejadernost je považována za negativní znak, jelikož snižuje kvalitu semen (Spiegel-Roy a Kochba; 1981, Felipe, 1994). Semena bývají sladká (*P. dulcis* var. *dulcis*) nebo hořká (*P. dulcis* var. *amara*). Tato charakteristika je kontrolována pouze jedním genem se dvěma alelami, 'S' dominantní, zodpovědnou za sladkou příchut', a 's' recesivní, zodpovědnou za hořkou příchut'. Variace „*amara*“ s některými výhodnými vlastnostmi lze proto křížit s variacemi „*dulcis*“, přičemž potomstvo získá výhodné znaky hořkých kultivarů a přitom bude plodit sladká semena (Dicenta a García, 1993). Jejich embrya obaluje světle hnědé blanité osemení neboli spermoderm. Sladké mandle mají jemně ořechovou vůni a chuť, hořké mandle jsou trpké s výrazným aroma, pro které jsou v malých množstvích užívány k aromatizaci potravin. Semena jsou bohatá na vlákninu, lipidy, bílkoviny, minerály (Fe, Ca, K, P, Zn, Mg, Mn), vitamíny B₂ (riboflavin),

B₃ (niacin), B₆, B₉ (kyselina listová) a E (tokoferol) (Kester a kol., 1991; Kester a Gradziel, 1996; Sus a kol., 2003; Gradziel, 2009, 2011; Shahidi 2009; Esfahlan a kol., 2010; Yazbek a Oh., 2013). Amygdalin je někdy nesprávně označován jako vitamín B₁₇.

3.2.2. Hospodářský význam mandloní

Semena jsou hojně využívána v potravinářství a to buď samotná nebo v podobě z nich získaného oleje, mléka, sirupu, másla, mouka nebo pasty. Oblíbenými pochutinami jsou marcipán a nugát. Kosmetika a farmacie využívají některé složky získané z mandloní do mýdel, mastí, parfémů i léčiv (Gradziel, 2009, 2011; Hummer a Janick, 2009; Shahidi, 2009; Esfahlan a kol., 2010). Čerstvý mezokarp plodu může být krmivem dobytka a skořápku lze po nadrcení použít jako podestýlku nebo například jako surovinu k výrobě celulózového nanopapíru (Urruzola a kol., 2014).

3.2.3. Toxicita semen mandloní

P. dulcis var. *amara* plodí hořká semena obsahující glykosid amygdalin, prunasin a emulsin, který je směsí hydroláz. Jednou z nich je i beta-glukosidáza katalyzující přeměnu glykosidů amygdalinu a prunasinu na glukózu, kyanidy a nitril kyseliny mandlové, který je enzymem mandelonitril lyázou ihned přeměněn v benzaldehyd zodpovědný za hořkou příchut' a pach. Kyanidy na vzduchu vlivem vlhkosti a oxidu uhličitého uvolňují toxický kyanovodík, který se však při vyšších teplotách rozkládá. Zdravotním rizikem je pouze konzumace většího množství syrových hořkých mandlí (Gradziel, 2009, 2011; Shahidi, 2009).

3.2.4. Geografické rozšíření mandloně

Mandloň byla kultivována již v třetím tisíciletí před naším letopočtem a je jedním z prvních domestikovaných ovocných stromů vůbec. Obchodní kontakty antických národů se zbytkem světa zajistily postupnou distribuci mandloně do všech osídlených oblastí Asie, blízkého východu, severní Afriky a Středomoří, jak dokládají početné archeologické nálezy (Socias i Company, 1998). Globálního rozšíření z Eurasie pak dosáhla díky Španělům, kteří ji kolem roku 1700 během kolonizace přivezli do Kalifornie, odkud se rozšířila dále do Severní i Jižní Ameriky (Browicz, 1996; Hummer a Janick, 2009; Gradziel, 2009, 2011).

3.2.5. Virové patogeny mandloní

3.2.5.1. *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV)

synonyma: *Cherry ringspot virus*, *Peach ringspot virus*, *Cherry tatter leaf virus*, *Plum line pattern virus*, *Rose chlorotic mottle virus*, *Rose yellow vein mosaic virus*

Prunus necrotic ringspot virus neboli virus nekrotické kroužkovitosti třešně patří do rodu *Illarvirus* z čeledi *Bromoviridae*. Je to ssRNA(+) virus s isomerickými částicemi o průměru 23 nm. Nejvíce škodí na višních, dále běžně infikuje třešeň, švestku, broskvoň, meruňku a mandloň (Fulton, 1970a; Spiegel, 2008). PNRSV způsobuje Stecklenberskou chorobu (rugose masai), nejškodlivější virové onemocnění třešní a višní, jež je rozšířeno ve všech oblastech pěstování hostitelů PNRSV. Různé kmeny viru způsobují na mandloních širokou škálu symptomů projevujících se jako proužková vzorkovitost, kaliko mandloně nebo nekrotická kroužkovitost (Uyemoto a Scott, 1992; Spiegel, 2008). Šíření viru je možné vegetativně a mechanicky. Virus se nepřenáší dotykem mezi rostlinami. U některých zástupců *Prunus* bylo popsáno generativní šíření pylem a šíření semenem bylo prokázáno i u mandloní (Cole a kol., 1982; Barba a kol., 1986; Greber a kol., 1991, 1992). Vektory viru umožňující ještě efektivnější šíření jsou hád'átka (*Longidorus macrosoma*) a roztoči (*Vasates fockeui* Nal. et. Trt.). Často se vyskytuje v koinfekci s PDV, ApMV, ACLSV nebo PPV. V případě koinfekce s PDV dochází k antagonismu a zeslabení symptomů. Koinfekce s jinými viry vykazuje naopak synergismus. Symptomy úzce souvisí s typem izolátu, druhem, kultivarem a celkovým stavem hostitele a také s klimatem a počasím, přičemž jsou výraznější při nižších teplotách a v letních teplotách nad 38 °C mohou vymizet (Helguera a kol., 2001). Symptomy se mohou projevit až po několika letech (Németh, 1986, 1994; Spiegel, 2008).

Infekce může být akutní nebo chronická. V případě akutní infekce dochází u mandloní k nekrotickému šoku. Děje se tak převážně na mladých listech, kde se objevují světlé, nažloutlé až hnědé skvrny, později i nekrózy. Listy mohou být menší, zúžené, lesklé nebo zkroucené. Jsou křehké a ostřeji zoubkované. Na spodní straně se objevují v okolí nervatury drobné enance. Postižené pletivo po čase vypadá, listy dřeví a někdy zůstává pouze zbytkový pruh listu kolem hlavních žilek. Pupeny a letorosty odumírají, mohou být deformované, s klejotokem. Dochází k poklesu plodnosti a snížení úrody. Stromy slábnou, předčasný úhyn není vyloučen (Hluchý a kol., 1997). Při chronické infekci dochází ke svinování listů. Různé kmeny a izoláty PNRSV mohou na mandloních způsobovat následující onemocnění: nekrotickou kroužkovitost, proužkovou vzorkovitost a odumírání pupenů (almond bud failure) nebo kaliko (Nyland a kol., 1976; Lansac a kol., 1979). Nerovnoměrná distribuce a sezónní kolísání teplot i koncentrace virových částic v rostlině způsobují, že i chronicky nemocné stromy vypadají zdravě a při rutinním

ELISA testování často poskytují negativní výsledky (Németh, 1986, 1994; Uyemoto a Scott, 1992; Mekuria a kol., 2003; Spiegel, 2008).

3.2.5.2. *Prune dwarf virus (PDV)*

synonyma: *Peach stunt virus*, *Cherry (sour) yellows virus*, *Cherry chlorotic ringspot virus*

Prune dwarf virus neboli virus zakrslosti slivoně náleží do rodu *Illarvirus* z čeledi *Bromoviridae*. Je to ssRNA(+) virus s isomerickými částicemi o průměru 19 až 22 nm. Hostiteli jsou zástupci rodu *Prunus*, nejčastěji višně, na které způsobuje největší poškození, dále třešeň, broskvoň, meruňka, švestka a mandloň, ale také jiní zástupci čeledi *Rosaceae* (Fulton, 1970b).

PDV patří k nejzávažnějším a nejrozšířenějším patogenům peckovin. Často se vyskytuje ve směsné infekci s jinými viry, například PNRSV, ApMV či PPV. Způsobuje onemocnění „cherry yellows“, s akutními nebo chronickými projevy. Postupně dochází ke žloutnutí listů mimo okolí hlavních žilek, jejich deformaci, zakrslosti, zúžení, někdy s mozaikou a nekrotizací, případně i opadem listů a celkové zakrslosti stromu. Symptomy může PDV indukovat pouze v konkrétní části stromu nebo mohou být nezřetelné při vyšších teplotách (Németh, 1986). Šíří se jak vegetativně roubou, očky a podnožemi, tak i generativně pyllem a semenem. Vektory PDV nejsou známy (Uyemoto a Scott, 1992; Greber a kol., 1992; Mekuria a kol., 2003).

3.2.5.3. *Apple chlorotic leafspot virus (ACLSV)*

synonyma: *Apple chlorotic leaf spot trichovirus*, *Pear ring mosaic virus*, *Pear ring pattern mosaic virus*, *Quince stunt virus*, *Plum pseudopox virus*, *Apple latent virus type 1*

Apple chlorotic leafspot virus neboli virus chlorotické skvrnitosti jabloně náleží do rodu *Trichovirus* z čeledi *Betaflexiviridae*. Je to ssRNA(+) virus s podlouhlými, zahnutými helikálními částicemi s rozměry 720 x 12 nm (Yoshikawa, 2001).

Hostiteli jsou zástupci rodu jabloň (*Malus* spp.), hrušeň (*Pyrus* spp.), kdouloň (*Cydonia* spp.), jeřáb (*Sorbus* spp.) a slivoň (*Prunus* spp.). ACLSV je původcem globálně rozšířeného onemocnění chlorotické skvrnitosti jabloně a ohrožuje produkci jaderovin i peckovin (Yoshikawa, 2001). Má často latentní průběh bez zřetelných symptomů. Jindy se projevuje hnědými skvrnami na plodech připomínajícími otlaky. U jabloní způsobuje chlorotické skvrny listů, kresby, prstencové mozaiky, případně deformace a zmenšení listů. Některé kmeny ACLSV mohou na slivoních způsobovat onemocnění „plum bark split“ a na meruňkách onemocnění „butteratura“ (Németh, 1986, 1994). U některých zástupců *Prunus* může soubor symptomů připomínat šarku švestky. Proto jsou někdy projevy ACLSV nazývány „nepravá šarka“ nebo „pseudošarka“ (false sharka, false plum pox, pseudopox) (Posnette a Ellenberger, 1963). Podoba i závažnost

onemocnění závisí na kmeni a izolátu viru, druhu a kultivaru hostitele a okolním prostředí (Németh, 1986, 1994). Šíří se vegetativně infikovaným množitelským materiálem (Yoshikawa, 2001). Generativní šíření ani šíření vektory nebylo prokázáno (Mink, 1993).

3.3. Charakteristika viru šarky švestky

3.3.1. Úvod a taxonomické zařazení viru šarky švestky

Virus šarky švestky (*Plum pox virus*, *Plum pox potyvirus*, *Sharka virus*, PPV) je původcem neléčitelného onemocnění šarka švestky, jež je, až na výjimky, globálně rozšířeno. Patří k 10 nejstudovanějším virům v rostlinné molekulární patologii a je nevýznamnějším a nejnebezpečnějším patogenem peckovin, především díky (1) efektivnímu přenosu hmyzími vektory, (2) šíření vegetativním množením hostitelů, (3) širokému okruhu hostitelů, jejich vysoké vnímavosti a nedostatku zdrojů rezistence a (4) závažnosti symptomů některých nejcitlivějších kultivarů (Scholthof a kol., 2011). S nimi spojené ekonomické ztráty v podobě snížení kvantity i kvality plodů, jejich předčasného opadu, zhoršení fitness a postupné chřadnutí nebo úhyn stromů jsou obrovskou hrozbou pro světové ovocnářství. Rozsah a závažnost škod závisí na virovém izolátu, druhu a kultivaru, jeho stavu i ekologických podmínkách (Németh, 1986, 1994).

Nejvíce virus škodí na švestkách, broskvoních a meruňkách, méně pak na nektarinkách, višních a třešních (Nemchinov a Hadidi 1996; Creszenci a kol., 1997). Konzumace šarkou poškozených plodů sice nepředstavuje zdravotní rizika, ale kvůli nepříjemné kyselé chuti a gumovité struktuře ovoce není doporučována.

Plum pox virus náleží do čeledi *Potiviridae* zahrnující 8 rodů (*Potyvirus*, *Brambyvirus*, *Bymovirus*, *Ipomovirus*, *Macluravirus*, *Poacevirus*, *Rymovirus*, *Tritimovirus*). Rod *Potyvirus* je jedním z nejpočetnějších a evolučně nejúspěšnějších skupin rostlinných virů infikujících jednoděložné i dvouděložné byliny a dřeviny ve většině klimatických oblastí světa. (López-Moya a kol., 2009). Rod *Potyvirus* zahrnuje kolem 180 virových druhů (Brunt, 1992), které mohou být přenašeny neperzistentně mšicemi (*Aphidoidea*) (Labonne a kol., 1995; Wallis a kol., 2005) a které způsobují téměř třetinu všech virových onemocnění kulturních plodin (Gibbs a kol., 2008).

PPV je jediným druhem *Potyvirus* infikující rod *Prunus* (Sihelská a kol., 2017). Poměrně vysoká mutační rychlost PPV generuje velkou genetickou variabilitu heterogenních virových populací s různými molekulárními a sérologickými vlastnostmi (Gürcan a Ceylan, 2016). Tato variabilita umožňuje virům přizpůsobit se různým podmínkám prostředí a různým hostitelům (Urcuqui-Inchima, 2001; Borgstrom a kol., 2001; Damsteegt a kol., 2007b; Verma a kol., 2013).

Schopnost rekombinace je jednou z hlavních sil řídících evoluci rostlinných virů. Mezi zástupci *Potyvirus* jsou velmi časté jak vnitrodruhové tak mezidruhové rekombinace. Byly zaznamenány i rekombinační události *Potyvirus* s jinými rody, což mohlo v minulosti výrazně ovlivnit schopnost adaptace k širšímu okruhu hostitelů (Valli a kol., 2007).

3.3.2. Charakteristika kmenů viru šarky švestky

Biodiverzitu PPV odráží uspořádání blízce příbuzných izolátů do jednotlivých monofyletických skupin, zvaných kmeny, představujících odlišné sérotypy. Do současnosti bylo popsáno celkem 9 kmenů lišících se jak svým geografickým rozšířením, tak epidemiologií a molekulárně-biologickými vlastnostmi (García a kol., 2014). Tři z nich se hojně vyskytují na našem území a zároveň jsou nejvýznamějšími kmeny z globálního hlediska. Nejrozšířenějším z nich je PPV-D (Dideron), kterým je na našem území infikováno přes 95 % nakažených stromů (Polák a Komínek, 2009), dále PPV-M (Marcus) a PPV-Rec (Rekombinant). Jejich izoláty vykazují celkovou shodu genomu 96 % mezi kmeny PPV-M a PPV-D a 97 % mezi kmeny PPV-Rec a PPV-M nebo PPV-Rec a PPV-D. Avšak po porovnání jejich nejvariabilnější části genomu, N1b-CP regionu, jsou od sebe jasně odlišitelné (Šubr a Glasa, 2008). Dalšími popsány kmeny jsou PPV-W (Winona), PPV-C (Cherry), PPV-T (Turkey), PPV-EA (El Amar), PPV-CR (Cherry Russia) a PPV-An (Ancestral) (Kerlan a Dunez, 1979; Glasa a kol., 2004b; James a Varga, 2005; Candresse a Cambra, 2006). Různé izoláty se liší epidemiologií a biologickými vlastnostmi (López-Moya a kol., 2000), například symptomatologií (Jarausch a kol., 2004; Palmisano a kol., 2010) agresivitou (Quiot a kol., 1995), nebo přenosností vektory (Deborré a kol., 1995).

PPV-D (Dideron)

Jedná se o nejrozšířenější kmen PPV západní Evropy a některých středomořských a středoevropských oblastí, ale i globálně. Vyskytuje se v Turecku, Severní a Jižní Americe i v několika asijských zemích, avšak tamější izoláty jsou biologicky odlišné od evropských. První izoláty pocházejí z meruňky z jihovýchodní Francie (Kerlan a Dunez, 1979). Dideron je označován za mírný neagresivní kmen PPV (Levy a kol., 2000b). Nejčastěji přirozeně infikuje meruňky a švestky, v polních podmínkách jen vzácně broskvoně (Quiot a kol., 1995; Gottwald a kol., 1995; Dallot a kol., 1998; Glasa a kol., 2004b; Gildow a kol., 2004a, 2004b; Wang a kol., 2006; Cambra a kol., 2008). V České republice je to dominantní kmen šířící se epidemicky na švestkách a myrobalánu (*P. cerasifera* Ehrh. var. *myrobalana*) (Polák, 2002; Polák a Komínek, 2009).

PPV-M (Marcus)

Nejstarší izoláty pochází z broskvoní ze severního Řecka (Candresse a kol., 1994; Kerlan a Dunez, 1979). Nyní je hojně rozšířen v jižní, východní a střední Evropě a vyskytuje se také v Turecku. Marcus bývá označován jako epidemická či agresivní forma a způsobuje závažnější

symptomy než kmen Dideron (Levy a kol., 2000b). Je to nejvíce patogenní kmen (Myrta a kol., 2001; Wang a kol., 2006). Škodí převážně na broskvoních, mezi kterými se velmi rychle šíří díky neperzistentnímu přenosu mšic broskvoňovou (*Myzus persicae* Sulzer) (Dallot a kol., 2004; Capote a kol., 2010), ale vyskytuje se také na meruňkách, myrobalánu a méně často na švestkách (Gadiou a kol., 2008). Existují 2 fylogenetické větve PPV-M, charakterizované odlišnou nukleotidovou sekvencí dvou genomických regionů, P3-6K₁ a CP. Tyto větve se vzájemně liší geografickou distribucí, sérologií a epidemiologií. PPV-M1 (PPV-Mb) převládá ve střední a východní Evropě, kdežto PPV-M2 (PPV-Ma) je rozšířen spíše ve Středomoří (Dallot a kol., 2011; Glasa a kol., 2011).

PPV-EA (El Amar)

Vyskytuje se v Egyptě a Tunisku na broskvoních, švestkách a meruňkách. Poprvé byl izolován roku 1990 z meruňky z Egypta a jako samostatný kmen je rozlišován od roku 1991. O jeho epidemiologii zatím není známo mnoho informací (Wetzel a kol., 1991a).

PPV-W (Winona)

Izolát W3174, pocházející ze dvou stromů švestky v Kanadě, byl roku 2003 na základě sérologických a molekulárních dat označen za zástupce nového kmene Winona (James a kol., 2003; James a Varga, 2005). Později byl jeho výskyt zaznamenán i v Litvě, kam byl zavlečen z Ukrajiny a Ruska. Evropské izoláty jsou odlišné od kanadských. Pozdější analýza genomů prokázala, že původní kanadský izolát W3174 vznikl pravděpodobně homologní rekombinací litevského izolátu Winona s kmeny Marcus a Dideron (Glasa a kol., 2011).

PPV-Rec (Recombinant)

Jde o kmen vzniklý homologní rekombinací kmenů Dideron a Marcus a zároveň třetí nejrozšířenější kmen na našem území a střední i východní Evropě. Vyskytuje se také v Turecku (Candresse a kol., 2007) a Kanadě (Thompson a kol., 2009). První izolát o6 byl objeven v Srbsku (Cervera a kol., 1993). Další izolát, BOR-3, byl později identifikován na Slovensku a zařazen do nově ustanoveného kmene Recombinant (Glasa a Šubr, 2001, 2005; Glasa a kol., 2002, 2004b). PPV-Rec se vyskytuje hojně ve střední a jihovýchodní Evropě na švestkách, méně na meruňkách a broskvoních (Kamenova a kol., 2011; Kamenova, 2014). Je efektivně přenášen mšicemi (Glasa a kol., 2004a). Za centrum, odkud se PPV-Rec rozšířily dále, pravděpodobně distribucí tolerantních genotypů švestky, je považována oblast bývalé Jugoslávie (Gadiou a kol., 2008).

PPV-T (Turkey)

Částečná sekvenace genomů čtyř sérologicky atypických tureckých izolátů „Abricotier Turquie“ (Ab-Tk) odhalila rekombinaci v oblasti genomu kolem 1566 pozice, kódující gen pro HC-Pro. Blízce příbuzné izoláty byly později nalezeny v provincii Ankara v Turecku a klasifikovány

jako nový rekombinantní kmen PPV-T. PPV-T infikuje především meruňky a švestky v Turecku, ale jeho výskyt byl potvrzen také v Albánii (Serçe a kol., 2009; García a kol., 2014; Palmisano a kol., 2015).

PPV-C (Cherry)

Třešně a višně byly dlouho považovány za imunní k PPV (Dosba a kol., 1987). První zmínky o infikovaných višních pocházely z Moldávie (Kalashyan a kol., 1994). Z nich byl získán první izolát a charakterizován Nemchinovem a Hadidim (1996). Později byl objeven odlišný izolát na třešních v jižní Itálii (Crescenzi a kol., 1995, 1997). PPV-C představuje jeden ze dvou kmenů přirozeně infikující třešně a višně. Zahrnuje 2 skupiny izolátů: SoC (sour cherry) z višní a SwC (sweet cherry) z třešně. Výskyt byl mimo Moldávii a Itálii omezeně zaznamenán i v Bulharsku (Topchiiska, 1996, 1997), Maďarsku (Kölber a kol., 1997) a Rumunsku (Maxim a kol., 2002).

V České republice se tento kmen nevyskytuje (Nemchinov a Hadidi, 1996; Navrátil a kol., 2004; Glasa a kol., 2004a; García a kol., 2014). Přestože přirozeně infikuje pouze třešně a višně, lze jím experimentálně inokulovat také podnože švestky domácí (Bodin a kol., 2003), některé kultivary broskvoní, bobkovišeň lékařskou (*P. laurocerasus* L. Dum. Cours.) a višeň tureckou (*P. mahaleb* L.) (Crescenzi a kol. 1997; Desvignes a kol., 1997; James a Thompson, 2006).

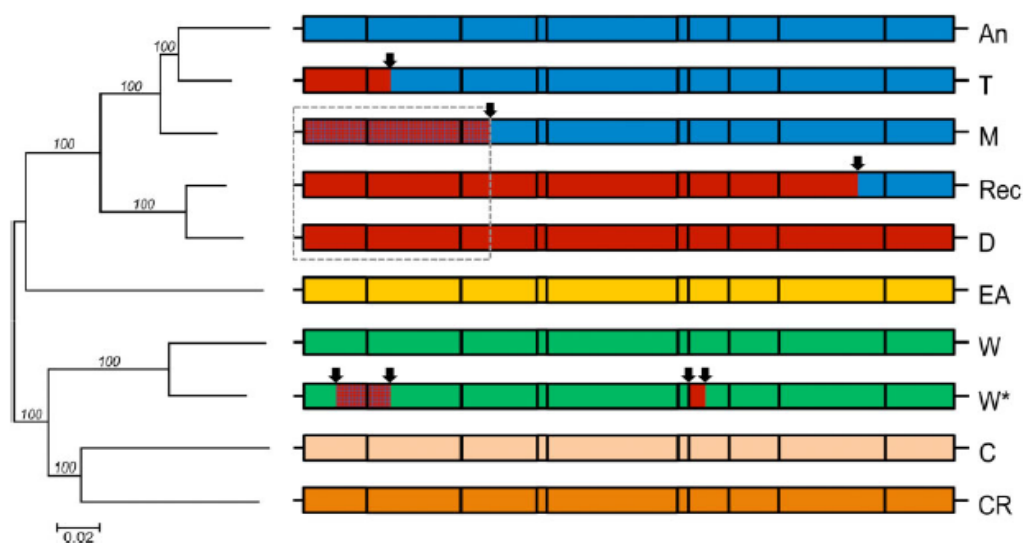
PPV-CR (Cherry Russia)

Jedná se o relativně nově objevený kmen infikující třešně. Izoláty byly poprvé získány z třešně z různých lokalit v oblastech Samara a Saratov v jižním Rusku. Další případy infekce PPV-CR byly zaznamenány v Moskvě. Fylogenetická analýza izolátů potvrdila, že představují zcela nový kmen, nejbližší příbuzný PPV-C a v menší míře také PPV-W (Chirkov a kol., 2013; Glasa a kol., 2013; García a kol., 2014).

PPV- An (Ancestral)

Jde o nejnovější identifikovaný kmen, jehož první izolát pochází z východní Albánie (Palmisano a kol., 2012). Kompletní genomická sekvence albánského izolátu odhalila rekombinaci, postihující 5' konec genomu kmenů PPV-M, PPV-D a PPV-Rec, jak již dříve ve svém evolučním schématu navrhli Glasa a Candresse (2005) (viz Obrázek č. 3).

Obrázek č. 3: Fylogenetické vztahy popsanych kmenů PPV. (převzato z: García a kol. (2014).



3.3.3. Biologická charakteristika viru šarky švestky

3.3.3.1. Hostitelský okruh viru šarky švestky z rodu slivoň

Rod *Prunus* zahrnuje přes 430 poddruhů jak kulturních ovocných, tak planě rostoucích nebo okrasných dřevin. Hospodářsky nejvýznamnějšími přirozenými hostiteli PPV z rodu *Prunus* jsou švestka domácí, broskvoň obecná, meruňka obecná, broskvoň nektarinka, japonská slíva (*P. salicina* Lindl.). Méně rozšířenými ovocnými hostiteli jsou meruňka mandžurská (*P. armeniaca* var. *mandshurica* Maxim), slivoň mexická (*P. mexicana* S. Watson), slivoň renklóda (*P. domestica* var. *italica* Borkh.) a různé mezidruhové hybridy zmíněných druhů (Dosba a kol., 1994), například mandlbroskvoň obecná (*P. dulcis* x *P. persica*), jsou také častými hostiteli PPV. Višeň obecná, třešeň obecná a mandloň obecná mohou být ve vhodných podmínkách také infikovány některými kmeny PPV (García a kol., 2014).

Také plané a okrasné druhy slivoň jsou hostiteli a významnými rezervoáry viru vhodnými k jeho přenosu mšicemi na ekonomicky významnější druhy (James a Thompson, 2006; Polák, 2006; Damsteegt a kol, 2007a; Kalinina a kol., 2007b; Polák a Komínek 2009). Širší okruh hostitelů napomáhá udržovat nízké nebo dokonce nedetekovatelné koncentrace viru v okolí pěstování ovocných druhů. V rámci efektivního managementu šarky by měly být i plané a okrasné druhy pravidelně monitorovány a testovány a v případě infekce odstraněny (James a Thompson, 2006).

Příkladem planých slivoň jsou myrobalán a trnka (*P. spinosa* L.), které jsou na našem území nejrozšířenější. Okrasnými druhy, které jsou často hostiteli PPV, jsou například višeň turecká, švestkovišeň americká (*P. americana* Marsh.), švestkovišeň pomořská (*P. maritima* Marsh.), meruňka japonská (*P. mume* Siebold & Zucc.), višeň žlaznatá (*P. glandulosa* Thunb.), višeň

plstnatá (*P. tomentosa* Thunb.), bobkovišeň lékařská (*P. laurocerasus* L. Dum. Cours.), střemcha pozdní (*P. serotina* Ehrh.), mandloň trojlaločná (*P. triloba* Lindl), mandloň nízká (*P. tenella* Batsch) nebo mandloň Davidova (*P. davidiana* (Carr.) Franch.) (Salamon a Palkovics, 2002; Sebestyén a kol., 2004; James a Thompson, 2006; Kölber, 2006; Mumford, 2006; Damsteegt a kol. 2007a; Sochor a kol., 2012; García a kol., 2014; Moorman a Gildow, 2016).

Šarka na okrasných slivoních sice může způsobovat symptomy poškozující jejich estetickou hodnotu (Kalinina a kol., 2007b) a nižší životaschopnost, ale doposud není známa přímá souvislost s ekonomickými ztrátami v produkci okrasných dřevin nebo s dlouhodobým negativním dopadem na původní floru a životní prostředí (James a Thompson, 2006). Problémy mohou nastat se změnou podmínek prostředí nebo se zavlečením agresivnějších kmenů s jiným okruhem hostitelů či vyšší virulencí a patogenitou pro některé kultivary. Největšími rezervoáry PPV v České republice jsou stará švestková stromořadí a kolem cest rostoucí myrobalán a trnky (Polák, 1997; Polák a Komínek, 2009).

3.3.3.2. Hostitelé viru šarky švestky mimo rod slivoň

Možný okruh hostitelů nezahrnuje pouze zástupce rodu *Prunus*. Různými kmeny PPV lze infikovat také řadu jiných rodů. Rozlišujeme hostitele (1) přirozené, které virus infikuje v prostředí a podmínkách jejich výskytu a (2) experimentální, kteří virus běžně nehostí, ale lze je jím inokulovat ve vhodných laboratorních podmínkách.

Experimentálními dřevinnými hostiteli PPV jsou na našem území například ptačí zob obecný (*Ligustrum vulgare* L.), brslen evropský (*Euonymus europaeus* L.) (Polák, 2000; Moorman a Gildow, 2016), lilek potměchuť (*Solanum dulcamara* L.) (Milusheva a Rankova, 2002) a jeřáb oskeruše (*Sorbus domestica* L.) (Šutić, 1971). Také ořešák královský (*Juglans regia* L.) může být PPV infikován, avšak tato informace nebyla opakovaně potvrzena (Baumgartnerova, 1996).

Z kulturních plodin řadíme mezi hostitele PPV například hrách setý (*Pisum sativum* L.), tolici dětelovou (*Medicago lupulina* L.), jetel luční, plazivý a inkarnát (*Trifolium pratense* L., *T. repens* L., *T. incarnatum* L.) a lupinu bílou (*Lupinus albus* L.). Z planých bylin lze jmenovat řadu druhů vyskytujících se přirozeně v podrostech ovocných sadů, například pryskyřník rolní, prudký aplazivý (*Ranunculus arvensis* L., *R. acris* L., *R. repens* L.), pampeliška lékařská (*Taraxacum officinale* (L.) Weber ex F.H. Wigg), kokoška pastuší tobolka (*Capsella bursa-pastoris* L.) starček obecný (*Senecio vulgaris* L.), pcháč rolní (*Cirsium arvense* (L.) Scop.), ptačinec prostřední (*Stellaria media* (L.) Vill.), lilek černý (*Solanum nigrum* L.), zběhovec lesní (*Ajuga genevensis* L.), zvonek řepkovitý (*Campanula rapunculoides* L.), svlačec rolní (*Convolvulus arvensis* L.), hluchavka bílá, objímavá a nachová (*Lamium album* L., *L. amplexicaule* L., *L. purpureum* L.), vikev setá a huňatá (*Vicia sativa* L., *V. villosa* Roth), komonice bílá a lékařská (*Melilotus albus*

Med., *M. officinalis* (L.) Pall.) či silenka nadmutá (*Silene vulgaris* (Moench) Garcke) (Milusheva a Rankova, 2002; Viršček a kol., 2004; Sebestyén a kol., 2004; Polák, 2006; James a Thompson, 2006). Úplný význam bylinných hostitelů v epidemiologii PPV není doposud prozkoumán, ale zcela jistě plní funkci rezervoáru, který je pravděpodobně ještě širší než dokládají dosavadní informace. Stále jsou objevováni noví hostitelé PPV (Németh, 1986, 1994; Llácer, 2006; James a Thompson, 2006; Viršček a kol., 2004).

Tabák (*Nicotiana benthamiana*, *N. clevelandii*, *N. occidentalis*, *N. bigelovii*, *N. edwardsonii*, *N. megalosiphon*, *N. tabacum*, *N. physalodes*) nebo merlík (*Chenopodium foetidum*, *C. ficifolium*, *C. murale*, *C. quinoa*, *C. amaranticolor*, *C. album*) jsou často využívány jako bylinné indikátory PPV infekce (Šutić a kol., 1971; Németh, 1986; Polák, 2006; Llácer, 2006; Damsteegt a kol. 2007a). Dřevinným indikátorem je například višň plstnatá (Damsteegt a kol., 1997).

3.3.3.3. Distribuce viru šarky švestky v hostiteli

Existují dva typy distribuce viru v hostiteli. (1) Při lokální infekci virus zůstává v místě nákazy a rostlina neprojevuje žádné nebo projevuje pouze mírné lokální symptomy, jako jsou nekrózy nebo chlorózy. (2) Během systémové infekce se virus šíří skrze plasmodesmata a dosáhne-li floému, dojde k rapidní disperzi virionů do celé rostliny. Pohyb skrze plasmodesmata však může trvat i roky roky (Németh, 1986, 1994). Mezitím se virus může usadit v jedné či několika větvích a ve zbytku stromu nemusí být detekovatelný. Externí části koruny stromu, kde je růst nejintenzivnější, obsahují většinou menší koncentrace viru nežli oblasti blíže kmenu. I v případě systémové infekce mohou zůstat některé části rostliny nezasažené. I z dlouhodobě nakaženého stromu lze proto získat bezvirózní materiál a absence symptomů nedokazuje, že rostlina není infikována. Podoba a intenzita symptomů není přímo úměrná koncentraci viru ani závažnosti onemocnění (Németh, 1986, 1994; Uyemoto a Scott, 1992; Travis, 2001).

Symptomy se u většiny infikovaných stromů objeví do 3 let po iniciální infekci. Mnoho stromů však zůstává bezpříznakových i několik let. Sérologické testy dokáží odhalit infekci ještě před plným projevem symptomů. Přítomnost či absence patogena musí být potvrzena kombinací více metod, které jsou spolehlivé, citlivé, specifické a schopné detekovat i malé množství virového antigenu ve vzorku (Kamenova a kol., 1978; Smith a kol., 1997; Travis, 2001). Rezistentní odrůdy bývají zcela bez symptomů, odrůdy tolerantní je neprojevují na plodech. Také plané a okrasné druhy bývají mnohdy bezpříznakové. K silnějším symptomům může docházet při směsné infekci, například s virem nekrotické kroužkovitosti třešně (PNRSV) nebo virem zakrslosti slivoně (PDV).

3.3.3.4. Symptomy šarky švestky na rodu slivoň

Projevy šarky lze pozorovat v různé míře na různých částech rostliny - nejčastěji na listech, ale také na květech, plodech a v některých ojedinělých případech i na peckách či kůře kmene. V rámci jednoho stromu nemusí být symptomy uniformní, jelikož koncentrace viru v rostlině není rovnoměrná. Symptomy jsou velmi variabilní a jejich přesná podoba, intenzita i zřetelnost závisí na mnoha faktorech – především na druhu a kultivaru hostitele, jeho kondici, stáří a vnímavosti k infekci, kmeni a izolátu viru, případně koinfekci s jinými patogeny a dalších podmínkách okolního prostředí jako je roční doba a počasí (Hluchý a kol., 1997; García a Cambra, 2007). Bývají zřetelnější při nižších teplotách a v horkých letních dnech mohou i zcela vymizet (Zacha a kol., 1998). Symptomy PPV lze obecně rozdělit na (1) změny zbarvení, (2) nekrózy, (3) poruchy růstu a vývoje. Symptomy šarky lze nejnáze vizuálně detekovat na švestkách a broskvoních. U merunek jsou méně zřetelné na listech. Poškození jsou nejzávažnější, jsou-li napadnuté mladé stromy (Németh, 1986).

3.3.3.4.1. Symptomy šarky švestky na mandloních

V případě mandloní nejsou symptomy spolehlivým indikátorem infekce PPV. Infikované mandloně většinou nevykazují žádné nebo vykazují jen nevýrazné symptomy na listech, méně často na květech. Jsou snadno zaměnitelné se symptomy jiných viróz způsobených například PDV, PNRSV nebo ACLSV („pseudošarka“) (Posnette a Ellenberger, 1963). Občas dochází k nekrotám. Na plodech ani celkovém vzrůstu mandloní se symptomy šarky neprojevují. Nedochozí k deformacím ani změnám zbarvení, struktury nebo chuti plodů, jako se děje u jiných druhů peckovin. Infekce PPV neohrožuje hospodářské výnosy mandloní. Symptomy mohou být intenzivnější při koinfekci (Festić, 1978; Németh, 1986, 1994; Pribék a kol., 2001; Llácer a Cambra, 2006; Damsteegt a kol., 2007a; Sochor a kol., 2012). Ilbaği a Citir (2014) přesto pozorovali na několika soliterně rostoucích starých mandloních výrazné symptomy systemické infekce PPV-T – chlorózy, nekrózy a mozaiky na listech, jejich deformace a opad, odumírání pupenů, chřadnutí větví a dokonce předčasný opad plodů.

3.3.3.4.2. Symptomy šarky švestky na listech slivoní

Symptomy na listech se objevují téměř u všech vnímavých hostitelů a jsou nejtypičtějšími projevy šarky. Jsou viditelné již od května, v pozdějších letních měsících jejich intenzita slábne. Nejdříve jsou pozorovatelné na mladých listech jako málo zřetelné nepravidelné odbarvení žilek. Později se objeví chlorotické kroužky, ornamentální kresby, skvrny nebo použky bez ostře ohraničených okrajů. U citlivějších kultivarů mohou žluté skvrny přecházet v tmavší nekrózy. Meruňky a broskvoně vykazují světlé lemování a chlorotickou kresbu kolem nervatury. Poškození

žilek mladších listů může vést k jejich deformacím. U některých odrůd lze symptomy sledovat jen na starších bazálních listech. Listy mohou předčasně opadávat (Németh, 1986, 1994; Hluchý a kol., 1997; García a Cambra, 2007).

Obrázek č. 4: Typické symptomy viru šarky švestky na švestce domácí (D. Šafářová)



3.3.3.4.3. Symptomy šarky švestky na plodech slivoní

Na plodech se v době dozrávání můžou začít objevovat světlejší nebo barevné skvrny, pruhy nebo kroužky, které se propadají. Vznikají okrouhlé defekty, vklesliny a nerovnosti s typickou podobou neštovic. Pod nimi je tvrdší, odlišně zbarvená, méně často nekrotická dužina hustě prorostlá žilkami, kterými pevně drží na pece. Symptomy jsou lépe pozorovatelné po oření voskové vrstvy z plodu. Postižené plody jsou nakyslé a méně cukernaté, často nevhodné ke konzumaci. U některých citlivých kultivarů se deformují celé plody a velká část z nich může opadnout ještě před sklizní. Také na peckách lze někdy pozorovat odbarvené skvrny, zejména u meruněk (Németh, 1986, 1994; Hluchý a kol., 1997; Cambra a kol., 2006b; García a Cambra, 2007).

3.3.3.4.4. Další symptomy šarky švestky

Častými projevy šarky je postupné chřadnutí a odumírání větví a později celého stromu. U některých citlivých odrůd slivoní lze někdy pozorovat praskliny a nekrózy na kůře, rezavění kůry, floému a později i xylému. Méně častým doprovodným symptomem je vylučování klejotoku, pryskyřici podobné směsi polysacharidů, a to jak z nekrotizovaných plodů, tak z kůry. Takové oblasti jsou oslabené a snáze napadnutelné dalšími patogeny (Németh, 1986, 1994).

3.3.3.5. Způsoby přenosu viru šarky švestky

(1) Vegetativní šíření, tedy propagace infikovaného množitelského materiálu, jako jsou rouby, očka, podnože a odkopy, je primárním a nejzávažnějším způsobem přenosu PPV, jež umožňuje přenos i na velké vzdálenosti v relativně krátkém čase. Toto nejlépe dokládá případ epidemie šarky,

jež se během několika let rapidně rozšířila z oblasti Balkánu do Maďarska a poté do zbytku Evropy (Németh, 1961, 1986, 1994; García a Cambra, 2007).

(2) Šíření vektory umožňují mšice (*Aphis* spp). Přenos PPV je necirkulativní a neperzistentní během sání se viriony dostanou pouze do stiletů a nedochází k jejich proniknutí do hemolymfy a následné kolonizaci mšice. I krátká doba sání v řádech sekund až minut umožňuje akvizici viru. Mšice je infekční ihned po jeho nabytí a infekčnost ztrácí při následujícím sání. Přenos patogena je možný zhruba do hodiny po akvizici. Je známo nejméně 20 druhů mšic, jež mohou PPV přenášet (Labonne a kol., 1995; Wallis a kol., 2005). Zvláště významné pro rod *Prunus* jsou mšice švestková (*Brachycaudus helichrysi*, Kaltentbach), mšice broskvoňová (*Myzus persicae*, Sulzer), mšice chmelová (*Phorodon humuli*, Schrank), mšice bodláková (*Brachycaudus cardui*, L.), mšice plaménková (*Myzus varians* Davidson, 1912), mšice jilmová (*Aphis spiraeicola* Patch) a mšice vojtěšková (*Aphis craccivora*, Koch) (Glasa a kol., 2004a; Cambra a kol., 2006b; Labonne a Dallot, 2006). Také druhy mšic, jež běžně nekolonizují rod *Prunus*, mohou být v šíření PPV významné, jelikož přilétají sát do ovocných sadů a tím infikují stromy v době, kdy je již sklizena jejich preferovaná potrava. Úspěšnost přenosu mšicemi závisí na druhu a kultivaru stromu, části rostliny, druhem, počtem a vývojovým stádiem vektoru, virovém kmenu a na faktorech vnějšího prostředí. Přenos je nejefektivnější na jaře a na podzim, v horkých letních měsících je mírnější (Kamenova a kol., 1978; Labonne a kol., 1995; Gildow a kol., 2004a, 2004b; Wallis a kol., 2005).

Vzdálenost, na kterou lze PPV vektory přenést, je vyvozována z epidemiologických studií sadů. Údaje však mohou být nepřesné díky skryté latentní infekci, jejíž plný projev lze pozorovat až po letech. Běžný je přenos do 75 metrů, ale ani větší vzdálenosti nejsou vyloučeny. Korelace mezi schopností mšic kolonizovat ovocné stromy a jejich schopností přenášet virus není známa (Morvan, 1988; Gottwald a kol., 1995).

(3) Generativní šíření bylo mnohými autory diskutováno, avšak neexistují pro něj důkazy a jsou nutné bližší informace. Szirmai (1961) poprvé popsal přenos PPV semenem u meruňek, Savulescu a Macovei (1965) u švestek a Coman a Cociu (1976) u broskvoní. Németh a Kölber (1983) detekovali PPV metodou ELISA u semenáčků švestek, meruňek a broskvoní. Další průzkumy předchozí výsledky nepotvrdily (Schimanski a kol., 1988; Eynard a kol., 1991; Myrta a kol., 1998; Pasquini a kol., 1998, 2000; Glasa a kol., 1999). Dnes je šíření semenem považováno za nepravděpodobné, přestože může být virus v jeho pletivech přítomen (Pasquini a Barba, 2006; Milusheva a kol., 2008).

3.3.4. Geografické rozšíření viru šarky švestky

Symptomy onemocnění šarka švestky byly poprvé zaznamenány mezi roky 1915 - 1918 v bulharské obci Zemen na švestkách domácích odrůdy „Kjustendilska sinya“. Jako virovová choroba byla poprvé klasifikována a popsána roku 1932 bulharským virologem a fytopatologem Prof. Dr. Dimitrijem Atanassovem ve vůbec první monografii pojednávající o šarce „Šarka po slivit'. Edna nova virusna bolest'“. O rok později bylo onemocnění potvrzeno také na meruňkách v Bulharsku a broskvoních v Maďarsku (Atanassov, 1932; Christoff, 1934; Németh, 1963).

Epidemie šarky brzy zasáhla celý Balkán. Postupně se rozšířila z Bulharska do Rumunska, kde byla potvrzena roku 1922 (Minoiu, 1997), bývalé Jugoslávie roku 1935 (Josifovic', 1937) a Maďarska roku 1938 (Szirmai, 1948). V bývalém Československu byla šarka švestky ohlášena roku 1952 (Smolák a Novák, 1956), ale její symptomy zde byly pozorovány již ve 30. letech. V Albánii byla zaznamenána roku 1947 (Papingyi, 1965), v Německu 1956 (Schuch, 1957), v Polsku 1958 (Szczygieł, 1962; Pieniazek, 1962), v Rakousku 1961 (Vukovits, 1961), na území dnešní Moldávie roku 1962 (Verderevskaya, 1965), v Nizozemí 1966 (Meijneke, 1967) a v Řecku (Demetriades a Castimbas, 1968) roku 1967. Roku 1968 byla šarka ohlášena ve Velké Británii (Cropley, 1968) a Turecku (Sahtiyanci, 1969). Dále roku 1973 v Itálii (Canova a kol., 1977) a 1974 v Belgii (Maroquin a Rassel, 1976). Až o deset let později byl výskyt šarky potvrzen také ve Španělsku (Llácer a kol., 1985), Portugalsku (Louro a Corvo, 1986) a poprvé mimo kontinentální Evropu v Egyptě, Syrii a na Kypru (Dunéz, 1987). Později roku 1992 byla šarka zaznamenána i v Čile (Acuña, 1993) a za další rok na Azorských ostrovech (Mendonca a kol., 1997). V USA byl výskyt PPV potvrzen roku 1999 v Pensylvánii (Levy a kol., 2000a) a v Kanadě roku 2000 v provinciích Ontario a New Scotland (Thompson a kol., 2001). Infekce PPV byla ohlášena také roku 2003 v Kazachstánu (Spiegel a kol., 2004), 2004 v Argentině (Zotto a kol., 2006), 2005 v Číně (Navrátil a kol., 2005), 2006 v Pákistánu (Kollerová a kol., 2006), 2010 v Japonsku (Maejima a kol., 2010), 2014 v Brazílii (Rezende a kol., 2016) a 2015 ve Finsku (Santala a Soukainen, 2015). Nyní je virus rozšířen celosvětově s výjimkou Austrálie a Nového Zélandu (García a Cambra, 2007; Gildow a kol., 2004a). Ačkoli jeho výskyt globální, žádná oblast není zasažena všemi kmeny.

3.3.4.1. Distribuce viru šarky švestky v Evropě

S ohledem na nerovnoměrnou distribuci PPV, historický vývoj epidemie a současný areál rozšíření Roy a Smith (1994) rozdělují Evropu do tří geografických zón:

- (1) střední a východní Evropa (Srbsko, Bulharsko, Kosovo, Maďarsko, Rumunsko, Slovensko, Česká republika, Polsko, Moldávie)

Patří sem země s epidemickým výskytem PPV. Šarka se zde rozšířila relativně brzy. Důkazem jejího dlouhodobého působení a koevoluce s širokou škálou hostitelů je přítomnost hned několika virových kmenů. Ve většině zemí včetně České republiky se vyskytují kmeny PPV-D, -M a -Rec (Polák a Komínek, 2009; García a kol., 2014). V Bulharsku (Topchiiska, 1997) a Maďarsku (Kölber a kol., 1997) a Moldávii (Kalashyan a kol., 1994) byl potvrzen výskyt kmene PPV-C. Epidemii šarky lze preventivními opatřeními a eradikací pouze zpomalit, ne zastavit. Jediným efektivním řešením je zde striktní pěstování pouze rezistentních kultivarů. V České republice byla šarka potvrzena roku 1952, pravděpodobně se zde však vyskytovala už dříve. Nejrozšířenějším kmenem u nás je PPV-D a poskytuje slabší symptomy než méně častý, ale agresivnější PPV-M. Nej náchylnější k infekci je ve většině oblastí švestka domácí (Candresse a kol., 1994; Jarauscha kol., 2004; Laimer a kol., 2005; Glasa, 2006; Wang a kol., 2006; Dallot a kol., 2008; Bazzoni a kol., 2008; Karayiannis a Ledbetter, 2009; Palmisano a kol., 2010; Dondini a kol., 2010, 2011). V Bulharsku, Maďarsku a Rumunsku se nachází PPV infikovaných mandloní. V Bulharsku byl PPV na mandloních obecných zaznamenán v 1,5 % a také mandloně trojlaločné a višně žlaznaté jsou tamějšími hostiteli viru (Topchiiska, 1996; Kamenova a Milusheva, 2005). V Maďarsku byly zjištěny 2 případy infekcí PPV-M na mandloních obecných a 1 případ PPV-D na divoké mandloni (Kölber a kol., 2003).

(2) severní a západní Evropa (Německo, Rakousko, Belgie, Nizozemí, Lucembursko, Dánsko, Francie, Velká Británie, Irsko, Estonsko, Lotyšsko, Litva, Finsko, Norsko, Švédsko)

Jedná se o země s lokálním výskytem PPV, kde je incidence šarky velmi různorodá. Nejběžnějším kmenem je Dideron, častý je i Marcus. Ve Francii a Německu se vyskytuje Recombinant a v Litvě byl potvrzen výskyt kmene Winona (Glasa a kol., 2011; Svanella-Dumas a kol., 2015). Zdejší klimatické podmínky většinou neumožňují průmyslové pěstování teplomilných hostitelů, jako jsou meruňky a broskvoně, což přímo ovlivňuje složení virových populací. Nižšími teplotami je omezena také přenosnost mšicemi, jejichž populace zde nejsou natolik početné, a rozmanité jako v teplejších oblastech. Mšice kolonizují stromy jen krátce, a pokud nezimují ve sklenících, nepřežijí dlouhé zimní období. Také preventivní a eradikační opatření zde přispívají k mírnějšímu rozšíření PPV (Glasa a kol., 2004; Laimer a kol., 2005; Dallot a kol., 2008).

(3) středomoří (Itálie, Slovinsko, Španělsko, Portugalsko, Chorvatsko, Řecko, Albánie, Malta, Kypr)

Virus se zde rozšířil poměrně nedávno, ale riziko dalšího šíření zůstává nadále vážnou hrozbou. Převládá zde kmen Dideron, méně rozšířený je Marcus. Ve Slovinsku a Itálii byl zaznamenán kmen Recombinant a v Itálii navíc i kmen Cherry (Crescenzi a kol., 1995, 1997). Zdejší tolerantní kultivary jsou pouze prevencí proti sníženému výnosu, nezabraňují však dalšímu šíření viru (Cambra a kol., 2004, 2006a; Varveri, 2006; Di Terlizzi a Boscia, 2006; Bazzoni a kol., 2008).

Rozšíření PPV v Evropě je možná ještě závažnější než dokládají jednotlivé průzkumy, do kterých často nejsou zahrnovány stromy ze soukromých pozemků (Pest Risk Analysis for PPV, 2011).

Distribuce viru šarky švestky v Turecku

Šarka švestky byla v Turecku poprvé zaznamenána roku 1968 na švestkách v Edirne v oblasti Thrace blízko hranic s Bulharskem (Sahtiyanci, 1969) a následně byla roku 1973 detekována také na meruňkách a švestkách v provincii Ankara (Kurçman, 1973). Nyní je PPV v Turecku rozšířen spíše lokálně na švestkách, meruňkách a broskvoních v soukromých zahradách nebo parcích (Serçe a kol., 2003, 2009; Elibüyük, 2004) a zatím nepředstavuje větší hrozbu pro zdejší ovocnou produkci. Šarka je nejrozšířenějším virovým onemocněním v provincii Ankara, kde je běžná na meruňkách, švestkách a broskvoních (Caglayan a kol., 2013). Ankara však nepatří k hlavním ovocnářským oblastem a v komerčních sadech se zde pěstují spíše třešně a višně (Elibüyük, 2004).

Nejběžnějším kmenem je zde PPV-T škodící nejvíce na švestkách. Vyskytuje se zde i PPV-M a PPV-D na švestkách, meruňkách a broskvoních. V městě Bursa v oblasti Isparta byl potvrzen jeden případ infekce slívy japonské kmenem PPV-Rec (Candresse a kol., 2007). Turecko je doposud jednou ze tří evropských zemí s výskytem PPV infikovaných mandloní (Akbaş a kol., 2011; Karabacak a Ilbaği, 2011; Ilbaği a Citiş, 2014). Jednotlivě se vykytující staré mandloně infikované PPV-T s projevy systemické infekce v podobě chloróz, nekros, mozaiky a deformace listů, jejich opadu, chřadnutí větví a předčasného opadu plodů byly poměrně nedávno zaznamenány v oblastech Babaeski (Kırklareli), Çorlu (Tekirdağ) a Keşan (Edirne) (Ilbaği a Citiş, 2014).

3.3.5. Molekulární charakteristika viru šarky švestky

Plum pox virus se řadí k virům s jednovláknovou lineární RNA s pozitivní polaritou (+ssRNA). Jejich mRNA je sama o sobě infekční a slouží přímo jako matriční RNA k translaci (Baltimore, 1971). Virové částice mají tvar zahnutých, neobalených vláknitých tyčinek s helikální symetrií. Jsou dlouhé přibližně 680 až 900 nm s průměrem 11 – 15 nm (Riechmann a kol., 1992; Barnett, 2012). Nukleová kyselina PPV je jediná molekula pravotočivé RNA, na jejímž 3' konci je vázaná terminální polyA sekvence a na 5' konci VPg protein (Viral protein genome-linked) namísto typické čepičky. Molekula RNA se skládá zhruba z 9741 - 9795 nukleotidů dlouhého vlákna chráněného zhruba 2000 spirálovitě uspořádanými podjednotkami kapsidového proteinu CP, který tvoří jednovrstevný vnější plášť. Plášťový protein se může lišit mezi jednotlivými virovými kmeny i jejich izoláty (Riechmann a kol., 1992; López-Moya a kol., 2000; Urcuqui-Inchima, 2001; Glasa a kol., 2013).

3.3.5.1. Organizace genomu a strategie exprese viru šarky švestky

Strategie exprese PPV je typická pro celý rod *Potyvirus*. Jejich polycistronický genom obsahuje nepřekládané oblasti (untranslated region, UTR), jež lemují dlouhý otevřený čtecí rámec (Large Open Reading Frame), kódující polypeptidový prekurzor s molekulovou hmotností ~ 355 kDa. Tento polyprotein je poté v devíti různých místech autokatalyticky štěpen 3 virovými proteázami P1, HC-Pro a NIa-Pro na produkty, které jsou dále upravovány na 10 menších funkčních produktů: **P1**, **HC-Pro**, **P3**, **6K₁**, **CI**, **6K₂**, **VPg**, **NIb**, **NIa-Pro**, kódující RNA-dependentní RNA polymerázu (RdRp), a **obalový protein CP** (Riechmann a kol., 1992). Další, protein **PIPO** je exprimován dle druhého, malého čtecího rámce (Pretty Interesting Potyviriidae ORF) jako fúzní protein s **P3**. Všechny 10 virových proteinů se podílí na amplifikaci genomu a s výjimkou 6K₁, 6K₂ a P3 se všechny váží na RNA (Urcuqui-Inchima, 2001; Chung a kol., 2008; Verma a kol., 2013).

Tyto nově exprimované proteinové produkty jsou označovány jako determinanty virulence. Mnohé z nich jsou multifunkční a ke své aktivitě vyžadují přísnou regulaci posttranslačními modifikacemi. Determinanty virulence se významně podílejí na procesu infekce, řídí replikaci, šíření v hostiteli a také proces blokace RNA silencingu, který slouží jako ochranný systém hostitele, jehož cílem je právě inhibice produkce těchto virových proteinů (García a kol., 2014).

Úspěšná infekce je výsledkem řady kompatibilních interakcí mezi virovými a hostitelskými faktory, které řídí celý životní cyklus těchto obligátních vnitrobuněčných parazitů – virovou translaci a replikaci, skládání virionů, pohyb na krátkou vzdálenost z buňky do buňky i na větší vzdálenost skrze vaskulární systém rostliny. Během raných fází infekce dochází v hostitelských buňkách k přestavbám buněčného obsahu i membrán a za účasti virových proteinů k formaci virosomů. Jsou to cytoplazmatické ultrastruktury tvaru větrníku, jež připomínají cylindrické inkluze a plní funkci virových továren. Tyto membránové vezikuly obsahují replikační komplexy a během infekce se přemísťují z buňky do buňky. Ohraničením membránou virosomy zvyšují efektivitu replikace a chrání se před hostitelským ochranným systémem, včetně působení proteáz a nukleáz. Replikace zahrnuje řadu komplexních interakcí a signalizací mezi viriony a buňkou. Virová RNA je replikována RNA-dependentní RNA polymerázou NIb (~ 59,8 kDa), která jako primer využívá uridylovaný VPg. Syntéza proteinů, replikace i skládání virionů vyžaduje energii, kterou systému poskytují shluky mitochondrií v blízkosti virosomů (López-Moya a kol., 2009).

P1 (~ 32,4 kDa) je serinová proteáza nacházející se na začátku virového genomu. Katalyzuje své vlastní vyštěpení z polyproteinu. V buňce je lokalizovaná na cytoplazmatických inkluzích. Ze všech produktů je nejvíce variabilní a to jak ve své délce, tak ve své aminokyselinové sekvenci.

Právě tato variabilita je příčinou vysoké adaptivity viru k hostitelům a celkového evolučního úspěchu rodu *Potyvirus*. P1 protein má zásadní vliv na interakci viru a hostitele, například na rychlost množení viru v buňce, šíření z buňky do buňky, infekčnost a symptomatiku viru (López-Moya a kol., 2000; Adams a kol., 2005, 2007; Valli a kol., 2007). P1 protein také zesiluje schopnost proteinu HC-Pro potlačovat RNA interferenci a zvyšuje patogenitu virů během synergických interakcí (Valli a kol., 2007).

HC-Pro (~ 52 kDa) je nestrukturní multifunkční protein se třemi doménami. Je nezbytný pro virový infekční cyklus všech zástupců *Potyvirus*, zvláště pro interakci s hostitelskými i jinými virovými proteiny. Účastní se mnoha procesů, představuje cysteinovou proteázu, potlačuje RNA interferenci a v kooperaci s CP usnadňuje systémový pohyb viru zvýšením limitní velikosti molekul (size exclusion limit, SEL), schopných procházet skrz cytoplazmatický prstenec neboli rukáv plasmodesmat. HC-Pro hraje významnou roli v přenosu viru vektory. Ta spočívá ve vazbě HC-Pro jak na virové částice, tak na stiletý mšice, čímž vytvoří můstek a zajistí zadržení virionů v maxilární dutině. Tato krátkodobá reverzibilní vazba je nutná a dostatečná k přenosu viru z jedné rostliny na druhou (Riechmann a kol., 1992; Blanc a kol., 1997, 1998). HC-Pro také zprostředkuje virový synergismus v případě koinfekce více viry (López-Moya a kol., 2000; Hasio'w-Jaroszewska a kol., 2013; Verma a kol., 2013).

N1a-Pro (~ 27,7 kDa) je sekvenčně specifická proteáza, která představuje C-koncovou doménu N1a a rozeznává nejméně 6 štěpných míst virového polyproteinu, který je dále zpracováván v cytoplasmě buňky. N1a-Pro rozpoznává specifickou konzervativní sekvenci 7 aminokyselin, ve které rozštěpí vazbu glutaminu s následující aminokyselinou (nejčastěji serin, threonin, alanin) (Mathur a kol., 2012; Verma a kol., 2013). Aktivní místa této proteázy tvoří heptapeptidová sekvence ohraničující každé štěpné místo s trojicí aminokyselin His-Asp-Cys. Mutace v této oblasti vede ke kompletní ztrátě katalytické funkce (Riechmann a kol., 1992). Přesná lokalizace N1a-Pro v jádrech infikovaných buněk je stále diskutována. Její akumulace se jeví jako krystalické buněčné inkluze a to především ke konci virového infekčního cyklu. N1a-Pro nespecificky degraduje hostitelskou dsDNA, čímž se výrazně podílí na průběhu infekčního cyklu (López-Moya a kol., 2000; Sochor a kol., 2012).

Oblast P3 – 6K₁ kóduje dva membránové proteiny. Je klíčová pro množení viru v buňce. Uvnitř cistronu P3 se nachází druhý, čtecí rámec potyvirů. Z cistronu P3 jsou exprimovány dva různé proteiny. První, P3 protein (~ 41,5 kDa) je exprimován dle hlavního čtecího rámce, a druhý fúzní protein P3N-PIPO dle druhého čtecího rámce. P3 protein je lokalizován v endoplazmatickém retikulu a zcela postrádá RNA vazebnou aktivitu. Ze všech zmíněných virových proteinů, P3 patří k těm nejméně prozkoumaným. Jeho přesná funkce není zatím zcela pochopena. Pravděpodobně se podílí na virové amplifikaci, pohybu a akumulaci virionů v hostiteli a

také na rozvoji symptomů šarky, což úzce souvisí s interakcemi P3 a proteinů hostitelské buňky. Funkce proteinu 6K₁ je stále nedostatečně prozkoumána, ale předpokládá se jeho role v procesu virové replikace a v pohybu z buňky do buňky (López-Moya a kol., 2000; Hillung a kol., 2013).

PIPO protein je exprimován dle druhého, malého čtecího rámce, jako fúzní protein P3N-PIPO spojením aminokyselin na N' konci P3 s nově syntetizovanými aminokyselinami z druhého čtecího rámce (Yusuke a kol., 2013).

CI oblast je lokalizována v centrální části polyproteinu a kóduje CI (~ 70 – 71,4 kDa), protein cytoplasmatických inkluzí, jež patří do skupiny movement proteinů a má také funkci RNA helikázy a nukleotidtrifosfátázy. N' terminální oblast obsahuje úseky s ATPásovou aktivitou, nezbytné pro replikaci virionů a pravděpodobně také pro jejich pohyb mezi buňkami (Riechmann a kol., 1992). CI protein tvoří agregáty podobné cylindrickým inkluzím, jež jsou pozorovatelné elektronovým mikroskopem v cytoplasmě infikovaných buněk, nejčastěji v blízkém okolí plasmodesmat (López-Moya a kol., 2000; Verma a kol., 2013).

6K₂ peptid (~ 21,7 kDa) nemá žádnou enzymatickou funkci, avšak jeho role zřejmě spočívá v tvorbě 6K₂-VPg nebo 6K₂-NIa polyproteinu, který umožňuje zacílení a následné ukotvení replikačního aparátu k membráně, v jejíž blízkosti se replikace odehrává (Riechmann a kol., 1992; López-Moya a kol., 2000).

VPg je multifunkční globulární protein, jež se přes tyrosinový zbytek kovalentně váže na 5' konec virové RNA, kde nahrazuje obvyklou strukturu methyl-guanosinové čepičky (Riechmann a kol., 1992). VPg obsahuje jaderný lokalizační signál nutný k zahájení replikace a také sekvenčně nespecifickou RNA-vazebnou doménu, kterou se váže na nově transkribovanou virovou RNA ihned po její syntéze. Ve struktuře je poměrně variabilní, protože jeho široké možnosti interakce vyžadují velkou flexibilitu (Léonard a kol., 2000; Grzela a kol., 2006; Verma a kol., 2013).

CP protein (~ 29,8 kDa) neboli plášťový či kapsidový protein je složený ze tří domén. Obsahuje N' a C' terminální domény exponované na povrchu virionu a vnitřní oblast (core region), která váže RNA. N' terminální oblast obsahuje vysoce konzervativní motiv DAG (specifická sekvence, asparagová kyselina - alanin - glycin), jež hraje roli v mechanismu šíření vektory. Mimo jeho hlavní enkapsidační funkci je CP protein, podobně jako HC-Pro, schopný zvětšit limitní velikost molekul (SEL) procházejících cytoplasmatickým prstencem. Dále se podílí na pohybu virionů mezi buňkami, na jejich systematickém pohybu v rostlině a také na regulaci amplifikace virové RNA. Mutacemi v centrální oblasti CP vznikají nefunkční viriony (López-Moya a kol., 2000; Verma a kol., 2013).

3.3.6. Způsoby ochrany před virem šarky švestky

PPV má velkou mutační schopnost a díky šíření vektory a širokému okruhu hostitelů jej lze jen obtížně kontrolovat. Strategie kontrolních opatření jsou trojího typu.

Prvním je profylaxe, jejímž cílem je redukovat nebo eliminovat zdroje virového inokula. Propagace certifikovaného pěstitelského materiálu, karantény, eradikační programy, pravidelné inspekce ve školkách i sadech a preventivní plošné testování jsou součástí této strategie, která představuje spíše momentální krátkodobou ochranu. Také lokalizací výsadeb mimo plošný výskyt šarky a dodržováním bezpečnostních vzdáleností minimálně 600 metrů od známých zdrojů infekce, používáním insekticidů, desinfekcí používaného nářadí, léčbou minerálními oleji (Vidal a kol., 2010, 2013) nebo pětováním po ochranných sítích lze snížit rychlost a intenzitu šíření PPV v již nakažených oblastech (EPPO, 2004; IPPC, 2012)

Druhou a zároveň jedinou dlouhodobou strategií a definitivní budoucí ochranou vůči PPV je hledání zdrojů rezistence a šlechtění genotypů slivoní odolných k infekci (Kegler a kol., 1998; Pascal a kol. 2001; Rubio a kol., 2003, 2005, 2013; Martínez-Gómez a kol., 2004a, 2004b; Decroocq a kol., 2005; Bassi, 2006; Bassi a Audergon, 2006; Llácer a Cambra, 2006; Badenes a Llacér, 2006; Karayiannis, 2006; Krška a kol., 2006; Hartmann a Neumüller, 2006; Vidal a kol., 2010; Rubio-Cabetas a kol., 2010; Salava a kol., 2013; Caglayan, 2013; Milusheva a kol., 2015).

Je-li ve výsadbě přítomen zdroj infekce, lze rychlost a intenzitu šíření viru pouze zpomalit nikoliv však zastavit. Nejohroženější jsou čerstvé výsadby, neboť mladé rostliny jsou k infekci nejnáchylnější (Németh, 1994; Pascal a kol., 2001). Výše zmíněné strategie ochrany jsou úspěšné pouze tehdy, jsou-li prosazovány ještě před samotnou introdukcí viru do dané oblasti a jsou-li v případě náhlého vypuknutí šarky striktně dodržovány.

Dalším poměrně neefektivním agronomickým řešením, které však neumožňuje kontrolu šíření PPV, je vysazování tolerantních kultivarů. Ani tyto „agronomicky rezistentní“ odrůdy však nejsou chráněné vůči infekci. Virus je infikuje, ale rostliny potlačují projevy onemocnění a nedochází k poškození plodů a velkým ekonomickým ztrátám. Infikovaná pletiva reagují rychlým úhynem a nedovolují tak další šíření viru. Zavádění tolerantních kultivarů sice zvyšuje šanci detekce PPV, ale zároveň umožňuje vznik neviditelného rezervoáru. Příkladem je situace z počátku 80. let na Slovensku, kde distribuce PPV infikovaných tolerantních švestek umožnila pozdější rapidní rozšíření PPV-Rec (Gadiou a kol., 2008).

3.3.7. Virus šarky švestky na mandloních

Mandloň obecná je některými autory považována za ojedinělého hostitele PPV, ale situace je v mnoha zemích nejasná. Šutić (1999) uvádí, že přestože mandloň není přirozeným hostitelem PPV, mohou její mladé semenáče sloužit jako indikátorové rostliny. Kölber (2001) zařadila PPV k nejzávažnějším patogenům mandloní a upozornila na pravděpodobnost jeho výskytu ve výsadbách v Maďarsku, Bulharsku, Rusku i České republice. Potvrzené případy přirozeně PPV infikovaných mandloní obecných jsou ve světě přesto spíše výjimečné. Výskyt PPV na mandloni obecné a blízké příbuzné mandloni trojlaločné a višni žláznaté byl prokázán v Bulharsku (Kamenova a Milusheva, 2005; Topchiiska, 1996) a na mandloních obecných později i v Rumunsku (Macovei a Diaconu, 2001).

Višeň žláznatá je považována za možného hostitele PPV a vhodnou indikátorovou rostlinu, naopak mandloň trojlaločná je tolerantní k PPV-M, -D, -C, a -EA (Kalinina a kol., 2007a). Sebestyen (2008) potvrdil infekci PPV na višni žláznaté v Maďarsku. V Maďarsku byly v roce 2003 zaznamenány 3 případy PPV infikovaných mandloní, u 2 mandloní obecných byl potvrzen kmen PPV-M a na jedné divoké mandloni PPV-D (Kölber a kol., 2003).

Aktuální zprávy o PPV infikovaných mandloních pochází z Turecka. V roce 2010 bylo 1,92 % zkoumaných stromů vyhodnoceno jako PPV pozitivních (Karabacak a Ilbaği, 2011). Dalšími potvrzenými patogeny ve vzorcích byly PNRSV v 81, PDV v 11 a jejich koinfekce ve 4 případech (Ilbaği a Citir, 2014). Ve stejném roce byl PPV detekován v 1,32 % testovaných mandloní. Vzorky pocházely ze 4 starých mandloní z provincie Tekirdağ (Akbaş a kol., 2011). Později bylo 5 PPV pozitivních vzorků z roku 2010 podrobena fylogenetické analýze, která potvrdila 95,82 až 96,61% identitu s izoláty kmene PPV-T.

Kromě Maďarska, Bulharska, Rumunska a Turecka nebyla zatím v dalších evropských zemích, kde se mandloně pěstují, infekce PPV prokázána (Dallot a kol., 1997; Šafářová a kol., 2017). Mimo Evropu byly mandloně infikované PPV zaznamenány pouze v Čile, kde byla infekce potvrzena v 2,6 % případů testovaných stromů (Herrera a kol., 1994, 2013). Pouze kmene PPV-M, -D a -T v současných podmínkách infikují mandloně (Pribék a kol., 2001; Kölber a kol., 2003; Damsteegt a kol., 2007a; Ilbaği a Citir, 2014).

PPV lze na mandloně experimentálně přenést roubováním na infekční podnože nebo také inokulací vektory (Dallot a kol., 1997; Petrov a Stoev, 2011). Damsteegt a kol. (2007a) infikovali v obdobných experimentech mandloň obecnou a několik příbuzných druhů kmene PPV-D a -M. Višeň žláznatou lze roubováním inokulovat PPV-D. Mandloň trojlaločná vykazuje po inokulaci

mšicemi i roubováním charakteristické chlorózy kolem žilnatiny a svinování listů. Mandloň Davidovu lze také infikovat, avšak bez zřetelných vizuálních symptomů.

Po inokulaci mandloně většinou nevykazují poškození plodů a nedochází ke ztrátám úrody. Zřídka projevují symptomy šarky na listech, například nerovnoměrné nekrózy žilnatiny nebo světlé skvrny. Tyto projevy jsou snadno zaměnitelné s jinými virózami indukujícími podobné symptomy (Festić, 1978; Németh, 1986; Llácer a Cambra, 2006; Damsteegt a kol., 2007a; Sochor a kol., 2012; Šafářová a kol., 2017). Obecně citlivější jsou mladší nežli starší dlouho plodící stromy (Festić 1978, 1980; García a kol., 2014). Vnímavost mandloní k PPV je ovlivná řadou faktorů - kmenem a izolátem viru, kultivarem a stavem hostitele a ekologickými podmínkami. S měnícím se prostředím se může změnit okruh hostitelů, rychlost a intenzita šíření i závažnost škod, způsobených infekcí PPV.

Dříve nebyla mandloním v souvislosti s epidemiologií PPV věnována příliš velká pozornost. Až se zavedením průmyslového pěstování v některých oblastech vyvstala potřeba zvážit rizika současná i potenciální, jež mohou nastat se změnou klimatu či introdukcí nových virulentnějších kmenů PPV. Je proto nutné dostatečně informovat soukromé i komerční pěstitele o nebezpečích, které šarka švestky představuje (Petrov a Stoev, 2011).

Vzhledem k nepřilíživému klimatu pro pěstování není mandloň obecná v České republice ekonomicky významná, ani nepředstavuje větší rizika v epidemii PPV nebo jako virový rezervoár. Mandloň je u nás pěstována pouze jednotlivě na soukromých zahradách a sadech nebo kolem cest. Větší výsadby nacházející se na některých nejteplejších lokalitách jižní Moravy nebo Polabí mají spíše estetický nežli ekonomický význam, zvláště v období kvetení (Šafářová a kol., 2017).

Přestože není aktuálně šarka švestky na mandloních vážným problémem evropské ovocné produkce, rizika, které další šíření viru představuje, nejsou zanedbatelná a mohou mít zásadní negativní dopad do budoucna. Mandloně mohou v zemích s dlouhodobým výskytem šarky prozatím plnit funkci rezervoáru, ze kterého může při změně ekologických poměrů dojít k rapidnímu šíření do mnohem většího okruhu hostitelů a pravděpodobně i ke zhoršení škod na jednotlivých plodinách. I malé mandloňové výsadby a solitérní stromy na soukromých pozemcích mohou vytvořit cestu pro pozdější rychlou disperzi patogena do doposud nezasažených oblastí nebo zapříčinit větší zamoření v oblastech s momentálně lokálním výskytem některých kmenů.

3.3.7.1. Rezistence mandloní k viru šarky švestky

Absence rozsáhlých reprodukčních bariér u mandloní umožňuje využití jejich bohatého genofondu ve šlechtitelství (Browicz a Zohary 1996; Gradziel a kol., 2001). Mnoho zemí se nyní zaměřuje

na vývoj PPV rezistentních genotypů slivoní. Tyto snahy kombinují klasické šlechtitelské postupy s novými biotechnologickými přístupy, jako například genetickou transformací využívající RNA silencing (Ravelonandro a kol. 1997, 2000; Scorza a Ravelonandro, 2006).

Zatím není znám žádný zdroj rezistence mezi broskvoněmi (Rubio a kol., 2012), ale případy určitých stupňů rezistence k různým kmenům PPV byly zaznamenány u klonu P1908 mandloně Davidovy (Decroocq a kol., 2005; Bassi, 2006), a některých kultivarů mandloně obecné (Pascal a kol. 2001; Martínez-Gómez a kol., 2004a, 2004b; Rubio-Cabetas a kol., 2010; Salava a kol., 2013) a mandlobroskvoně, například GF677 (*P. dulcis* x *P. persica*) nebo Cadaman (*P. davidiana* x *P. persica*) (Kegler a kol., 1998; Rubio a kol., 2003, 2005; Llácer a Cambra, 2006). Broskvomandloně (*P. dulcis* x *P. persica*) byly využívány pro šlechtění rezistentních podnoží například ve Francii, (Bernhard, 1949), v USA (Kester a Hansen, 1966), ve Španělsku (Felipe, 1975) a v bývalé Jugoslávii (Vlasic, 1977). Mandloňový kultivar „Garrigues“ po naroubování indukuje rezistenci k PPV-D na citlivých GF305 broskvoňových podnožích a lze jej využít jako přirozenou ochranu vůči PPV na broskvoních (Rubio a kol., 2003, 2013).

3.3.8. Metody detekce viru šarky švestky

Rostliny podezřelé z infekce PPV lze prověřovat několika způsoby – metodami (1) biologickými, (2) sérologickými nebo (3) molekulárními. Volba vhodné diagnostické metody se odvíjí od možné časové i finanční investice, celkového stavu a množství prověřovaných rostlin, jejich dalšímu účelu a také na typu a kvalitě vzorků (López a kol. 2009). Spolehlivá metoda musí být citlivá a specifická, zvláště pro posuzování zdraví rostlin určených k vegetativnímu množení (Helguera a kol., 2001), a výsledky je nutné ověřovat vždy kombinací minimálně 2 různých metod. Ve všech případech musí být v testování zahrnuty i pozitivní a negativní kontroly (EPPO, 2004; IPPC, 2012).

(1) Biologické testování (indexing) spočívá v roubování zkoumané rostliny na indikátory - semenáčky citlivé k infekci (Desvignes, 1999). Tento postup však neidentifikuje virový kmen, nedetekuje kmeny, které nevyvolávají symptomy, je časově náročný, vyžaduje specializované skleníky, symptomy jsou variabilní jejich hodnocení je subjektivní (Damsteegt a kol., 1997, 2007b; Gentit, 2006). K biologické detekci PPV na slivoních se užívá nejčastěji broskvoň (cv. GF305), která je vhodná také k testování rezistence slivoní k PPV (Rubio a kol., 2003, 2013), dále myrobalán (cv. GF31), *P. persica* × *P. davidiana* (cv. Nemaguard), nebo višěň plstnatá (EPPO, 2004; IPPC, 2012).

(2) V sérodiagnostice byly nejdříve dominantní primitivní metody precipitace protilátek s virovými antigeny. Existuje celá řada jejich modifikací vhodných k rostlinné diagnostice (Dounin a Minoiu,

1968; Schade, 1969, 1971; Casper, 1975). Výhodami jsou nízké náklady a nenáročnost provedení. Nevýhodami jsou hodnocení malého počtu vzorků, požadavek vysoké koncentrace virových antigenů a velká spotřeba použitého materiálu (López a kol. 2009; Boonham a kol., 2014). Imunoenzymatické stanovení (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, ELISA) je dodnes nejpoužívanější metodou, umožňující jak kvantitativní tak kvalitativní stanovení viru. Zavadení „double-antibody sandwich“ (DAS-ELISA) (Voller a kol., 1976; Clark a Adams, 1977) znamenalo v diagnostice značné zjednodušení. Pro nenáročnost provedení, rychlost, dobrou reprodukovatelnost a komerční dostupnost přístrojů i reagensií se ELISA rychle stala standardní metodou ve fyto-sanitární diagnostice. Její citlivost se odvíjí od druhu zkoumaného organismu, čerstvosti vzorku a koncentraci antigenu. Principem ELISA je reakce polyklonálních (Dunez, 1977; Adams, 1978) nebo více specifických monoklonálních protilátek (Navrátil a kol., 1992; Cambra a kol., 1994; Boscia a kol., 1997) s virovými antigeny. Často využívanou variantou je také DAS indirect-ELISA (DASI-ELISA), nazývaná také „triple-antibody sandwich“ (TAS-ELISA) (Cambra a kol., 1994, 2006c). ELISA je vhodná k plošnému testování velkého počtu vzorků (López a kol. 2009). Metoda však nedetekuje velmi nízké koncentrace viru a proto je nespolehlivá v případech vzorků sbíraných mimo vegetační období nebo v horkých letních dnech, kdy koncentrace viru v rostlinách klesá. Je také nutné zvážit jeho nerovnoměrnou distribuci a vzorky odebírat nejméně ze 4 různých míst v interních oblastech koruny stromu (EPPO, 2004; IPPC, 2012; Boonham a kol., 2014; Martinelli a kol., 2015).

(3) Metody založené na detekci nukleové kyseliny jsou považovány za nejcitlivější. Umožňují detekovat i nekultivovatelné patogeny, jako jsou viry a některé bakterie nebo fytoplazmy. Tyto metody jsou užívány buď k univerzální identifikaci viru nebo jeho specifického kmene (Wetzel a kol., 1991b). Polymerázové řetězové reakce (polymerase chain reaction, PCR) založené na mnohonásobné amplifikaci specifických úseků nukleové kyseliny v kombinaci s reverzní transkripcí umožňují citlivou, přesnou a rychlou detekci RNA virů. Předchází jim pečlivý odběr vzorků, jejich okamžité uskladnění a zajištění čerstvosti zamrazením (López a kol., 2009; Martinelli a kol., 2015). Nejspolehlivější jsou v hodnocení vzorků sesbíraných na jaře (Mekuria a kol., 2013). PCR metody dokáží detekovat cílovou sekvenci i ve směsných infekcích nebo detekovat více patogenů současně. Přes své mnohé přednosti mají i nevýhody - poměrně vysoká cena přístrojů i reagensií, riziko falešných negativních výsledků při nedostatečné kvalitě reagensií nebo degradaci cílové sekvence, falešných pozitivních výsledků v důsledku kontaminace mezi vzorky nebo také nespecifické produkty či artefakty díky špatnému nasednutí primerů (López a kol., 2009; Martinelli a kol., 2015). Existuje mnoho variant a kombinací těchto metod, které jsou hojně využívány v diagnostice - nested PCR (nPCR), cooperative PCR (Co-PCR), multiplex PCR (M-PCR), reverzní transkripce s následnou PCR (RT-PCR), real-time PCR, immunocapture RT-PCR (IC-RT-PCR) a další (Levy a Hadidi, 1994; Candresse a kol., 1998;

Olmos a kol., 1997; Mekuria a kol., 2003). Nejpoužívanější k detekci PPV je real-time-RT-PCR, která po zpětném přepisu z RNA do DNA souběžně amplifikuje i detekuje cílovou sekvenci. Tím odpadá potřeba dalšího zpracování výsledků, například gelovou elektroforézou, a tím se snižuje i časová náročnost a riziko kontaminace. Metoda má citlivost srovnatelnou s ELISA (Martinelli a kol., 2015). Citlivost a specifita mohou být ještě zvýšeny v kombinaci s nPCR (Helguera a kol., 2001), která ve dvou postupných amplifikacích využívá 2 páry primerů. Tento postup jednak zvyšuje riziko kontaminace (Roberts, 1996) a není vyloučená ani interference mezi primery (López a kol., 2009; Martinelli a kol., 2015). Některé metody mohou simultánně detekovat více virů najednou a slouží proto k praktickému a spolehlivému rutinnímu testování, například M-PCR (López a kol., 2009).

4. MATERIÁL a METODY

4.1. Biologický materiál

V rámci bakalářské práce bylo analyzováno celkem 62 stromů, z toho 48 mandloní obecných, 5 švestek domácích, 5 višní obecných, 2 broskvoně obecné, 1 meruňka obecná, 1 hybrid broskvoň x M49 a 1 hrušeň obecná (*Pyrus communis*). Stromy byly několikrát vizuálně prohlédnuty během květení a následně po vývoji listů. Byly nalezeny stromy se symptomy viróz i bezpříznakové stromy rostoucí v blízkosti zdroje infekce, a z nich byly náhodně sesbírány vzorky listů nebo květů. Testované stromy pochází ze 4 lokalit, souhrn viz Tabulka č. 1:

- (1) Slatinice (Kaple – Čelechovice) - výsadba podél silnice, 29 vzorků listů mandloní,
- (2) Lednice (genové zdroje MENDELu), celkem 11 vzorků listů, konkrétně ze 4 mandloní, 2 broskvoní, 2 švestek, meruňky, hrušně a hybridu broskvoň x M49,
- (3) Horní Věstonice – výsadba podél silnice, 3 vzorky listů mandloní,
- (4) Hustopeče – mandloňové sady Starý vrch a Kamenný vrch u Kurdějova, 12 vzorků květů mandloní.
- (5) Holovousy – celkem 8 vzorků listů z 5 višní a 3 švestek.

Mandloně se na našem území pěstují již od 17. století. Výsadby mandloní v Hustopečích jsou však dodnes středoevropskou raritou. Jde o pozůstatky rozsáhlých sadů založených roku 1949 na ploše přes 9 hektarů. Postupně se sady rozšiřovaly a v době největšího rozmachu, v šedesátých letech minulého století, měly rozlohu kolem 185 hektarů a čítaly kolem 50 000 stromů. Ztráta zájmu o mandle i postupné nahrazování mandloní meruňkami vedlo k zanedbání a chátrání neudržovaných sadů, které byly postupně obnovovány a revitalizovány až od roku 2007 díky

iniciativě obce Hustopeče. Dnes jsou tamějším nejčastěji pěstovaným kultivarem „Hustopeče“ (Čechová a kol., 2015). Mandloně na našem území kvetou zhruba od března do dubna.

Vzorky byly krátkodobě uchovávány při v hlubokomrazícím boxu při -67 °C, pro dlouhodobé uchovávání byly nejdříve lyofilizovány.

Obrázek č. 5: Fotografie mandloní z lokalit Hustopeče (vlevo) a Slatinice (vpravo) (D. Šafářová)



Tabulka č. 1: Seznam vzorků z vybraných lokalit

typ vzorku	datum sběru	lokality sběru	druh stromu	celkem vzorků
květ	29.3.2015	Hustopeče	<i>P. dulcis</i>	12
list	6.6.2015	Kaple, Čelechovice	<i>P. dulcis</i>	29
	28.7.2015	Horní Věstonice	<i>P. dulcis</i>	3
	28.7.2015	Lednice (genové zdroje)	<i>P. dulcis</i>	4
			<i>P. domestica</i>	2
			<i>P. armeniaca</i>	1
			<i>P. persica</i>	2
	27.7.2015	Holovousy	<i>P. persica x M49</i>	1
			<i>P. cerasus</i>	5
			<i>P. domestica</i>	3
celkový počet vzorků mandloní				48
celkový počet vzorků				62

Vzorky byly testovány na přítomnost *Plum pox virus* (PPV) z čeledi *Potyviridae* a *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV) a *Prune dwarf virus* (PDV), oba náležící do čeledi *Bromoviridae*.

4.2. Metody

4.2.1. Izolace RNA

4.2.1.1. Izolace celkové RNA z listů ('silica capture')

Pro izolaci celkové RNA z listů byla užitá metoda izolace nukleových kyselin na silikagelu, tzv. Silica capture, modifikovaný postup podle Ciešlínska a kol. (2004).

Před vlastní izolací bylo třeba připravit pracovní roztoky, viz Složení použitých roztoků. Do zkumavky s lyofilizovanými vzorky bylo přidáno 1,5 ml PBS – TPO pufru a materiál byl homogenizován v přístroji FastPrep (MP Biomedicals) po dobu 40 s, při 6 M/S. Zhomogenizovaný rostlinný materiál byl centrifugován 2 min při 12 000 rpm a 4°C. V mezičase byla připravena pracovní suspenze oxidu křemičitého. V mikrozkuhavce bylo smícháno 40 µl SC pufru a 900 µl pufru L6, zkumavka byla zvortexována do mléčného zakalení a ponechána 10 min stát při pokojové teplotě. K suspenzi bylo dále přidáno 50 µl supernatantu (extraktu) z homogenizovaných vzorků a směs byla opět zvortexována. Přebytek supernatantu byl pro pozdější použití dlouhodobě uchováván při teplotě – 67 °C. Mikrozkuhavky se směsí L6 a SC pufru byly ponechány 10 min stát při pokojové teplotě, poté znova zvortexovány a centrifugovány 16 s při 12 000 rpm. Pomocí vývěvy (Vakuová pumpa, MILLIPORE) byl pomocí špičky opatrně odstraněn supernatant. K sedimentu bylo přidáno 900 µl pufru L2, směs byla zvortexována a opětovně centrifugována 16 s při 12 000 rpm. Supernatant byl vývěvou znovu odstraněn a celý krok promývání pufrem L2 byl zopakován. K sedimentu bylo přidáno 900 µl 70% etanolu vychlazeného na 4 °C, zkumavky byly zvortexovány a centrifugovány 16 s při 12 000 rpm. Etanol byl poté odstraněn vývěvou a celý krok byl zopakován. Následně bylo k sedimentu přidáno 900 µl acetonu a zkumavky byly vortexovány a centrifugovány 16 s při 12 000 rpm. Aceton byl odstraněn vývěvou a zbylý sediment byl vysoušen po dobu 5 min v otevřené zkumavce umístěné v termobloku při teplotě 56 °C. K sedimentu bylo přidáno 50 µl sterilní deionizované vody, zkumavky byly krátce zvortexovány, centrifugovány a inkubovány 10 min při 56 °C v termobloku. Poté byly zkumavky krátce zvortexovány a centrifugovány 16 s při 12 000 rpm. Vodná fáze s eluovanou RNA byla opatrně odpipetována, aniž byl špičkou porušen sediment, a převedena do nových mikrozkuhovek. Koncentrace a čistota izolované RNA byla stanovena spektrofotometricky pomocí NanoDrop 1000 (Thermo Scientific). Vyizolované vzorky RNA byly pro pozdější práci uchovány při teplotě -67 °C.

4.2.1.2. Izolace celkové RNA z květů

Izolace celkové RNA z květů byla provedena pomocí NucleoSpin® RNA Plant kitu (Macherey-Nagel). Jednotlivé lyofilizované vzorky mandloňových květů byly umístěny do zkumavek a k rostlinnému materiálu bylo napipetováno 350 µl pufru RA1 a 3,5 µl β-merkaptoetanolu. Vzorky byly poté homogenizovány v přístroji FastPrep (MP Biomedicals) po dobu 40 s, při 6 M/S. Zkumavky se vzorky byly následně centrifugovány 20 s při 11 000 x g a poté krátce zvortexovány. NucleoSpin® filtrační kolony byly poté umístěny do sběrných zkumavek. Vzorky homogenátů byly napipetovány na filtry jednotlivých kolon a zkumavky byly centrifugovány 1 min při 11 000 x g. NucleoSpin® RNA Plant kolony byly umístěny do sběrných zkumavek a byl na ně napipetován lyzát. Vzorky byly centrifugovány 30 s při 11 000 x g. Kolony byly poté umístěny do nových sběrných 2ml zkumavek. Pro odsolení silica membrány bylo na kolonu napipetováno 350 µl MDB pufru a vzorky byly centrifugovány 1 min při 11 000 x g. V nové zkumavce byla mezitím připravena reakční směs k odstranění kontaminující DNA. Směs byla promíchána pipetováním. Do středu silica membrány bylo opatrně napipetováno 95 µl připravené reakční směsi a vzorky byly inkubovány 15 min při pokojové teplotě. Následuje promývání silica membrány ve třech krocích. Pro první promytí bylo do kolony napipetováno 200 µl RAW2 pufru, který inaktivuje rDNázy. Vzorky byly centrifugovány 30 s při 11 000 x g a poté byly kolony umístěny do nových sběrných zkumavek. V druhém kroku bylo na kolony pipetováno 600 µl RA3 pufru, vzorky byly opět centrifugovány 30 s při 11 000 x g, sběrné zkumavky byly vyprázdněny a kolony do nich zpět umístěny. K třetímu promytí bylo na kolony nanášeno 250 µl RA3 pufru a vzorky byly centrifugovány 2 min při 11 000 x g pro úplné vysušení membrány. Kolona byla posléze umístěna do nové 1,5ml sběrné zkumavky. V posledním kroku byla RNA eluována do 60 µl sterilní deionizované vody aplikované na kolonu. Zkumavky byly centrifugovány 1 min při 11 000 x g. Koncentrace a kvalita vyizolované RNA byla měřena spektrofotometricky pomocí NanoDrop 1000 (Thermo Scientific). Vzorky byly pro pozdější práci uchovávány v hlubokomrazicím boxu, při teplotě - 67 °C.

4.2.2. Reverzní transkripce

Pro přepsání virové RNA do komplementární DNA (cDNA) byla provedena reverzní transkripce za použití primeru PolyT(18) a reverzní transkriptázy AMV Reverse Transcriptase (Promega). S ohledem na počet analyzovaných vzorků byly namíchány 2 reakční směsi (premix I a II). Celý postup byl prováděn za sterilních podmínek v laminárním boxu a vzorky i připravené chemikálie byly drženy na ledu, aby nedošlo k nežádoucím změnám v chemikáliích a degradaci virové RNA. První reakční směs (premix I) byla připravena smícháním reagentů, složení viz Tabulka č. 2.

Směs byla krátce zvortexována, stočena na minicentrifuze a rozpipetována do 0,5ml PCR mikrozkušavek. Do každé mikrozkušavky byly přidány 3 μ l RNA vzorku. Mikrozkušavky byly zcentrifugovány a inkubovány 5 min při 70 °C v termobloku. Mezitím byla připravena druhá reakční směs (premix II), složení viz Tabulka č. 2. Po inkubaci v termobloku byly mikrozkušavky ihned přemístěny na led. Ke vzorkům bylo přidáno 27 μ l druhé reakční směsi a mikrozkušavky byly následně umístěny do termobloku, kde probíhala reverzní transkripce po dobu 60 min, při teplotě 42 °C.

Tabulka č. 2: Složení reakčních směsí pro reverzní transkripci

chemikálie	koncentrace pracovního roztoku	konečná koncentrace	1 test [μ l]
Premix I			
voda (dEPC)	-	-	9
primer PolyT(18)	20 pmol/ μ l	0,5 pmol/ μ l	1
objem vzorku [μl]		3	
celkový objem reakční směsi [μl]		10	
Premix II			
voda (dEPC)	-	-	15,5
pufř (AMV-RT-PCR)	5 \times	1 \times	8
dNTP mix	10 mM	500 μ M	2
Ribonuklease inhibitor (RNasin)	40 U/ μ l	20 U/ μ l	0,5
AMV RT pol	10 U/ μ l	10 U/ μ l	1
celkový objem reakční směsi [μl]		27	
objem reakce [μl]		40	

4.2.3. Detekce *Plum pox virus* (PPV)

Pro detekci PPV byla použita RT-PCR podle Wetzel a kol. (1992). PPV byl v získané cDNA detekován s použitím primerů PPV1, PPV2 a s použitím polymerázy MyTaq™ DNA Polymerase (Bioline). Byla připravena reakční směs s ohledem na počet analyzovaných vzorků, složení viz Tabulka č. 3. Reakční směs byla rozpipetována po 17 μ l do 0,2ml PCR zkušavek. K reakční směsi byly následně přidány 3 μ l cDNA, mikrozkušavky byly vloženy do termocykleru a byla provedena PCR reakce, podmínky viz Tabulka č. 4.

Tabulka č. 3: Složení reakční směsi pro PCR (detekce PPV)

chemikálie	koncentrace pracovního roztoku	konečná koncentrace	1 test [μl]
voda	-	-	13,4
pufř	5 ×	1 ×	4
primer PPV1	20 pmol/μl	0,2 μM	0,2
primer PPV2	20 pmol/μl	0,2 μM	0,2
Taq pol	5 U/μl	1 U/reakce	0,2
objem reakční směsi [μl]		18	
objem vzorku [μl]		2	
celkový objem reakce [μl]		20	

Tabulka č. 4: Teplotní podmínky a časový profil PCR (detekce PPV) dle Wetzel a kol. (1992)

krok č.	teplota [°C]	čas [min]	počet cyklů
1	94	3	1
2	94	0,5	40
3	62	0,5	
4	72	0,5	
5	72	10	1

4.2.4. Detekce *Prune dwarf virus* (PDV)

Prune dwarf virus byl detekován pomocí MyTaq™ One-step RT-PCR kitu (Bioline) dvěma různými postupy, a to dle Jarošová a Kundu (2010b) s použitím primerů PDV2F a PDV2R, a podle Mekuria a kol. (2003) s použitím primerů PDV1F a PDV1R. V obou případech byla nejdříve namíchána reakční směs s ohledem na počet analyzovaných vzorků. Postup byl prováděn za sterilních podmínek, chemikálie a vzorky byly drženy na ledu. Reakční směs byla připravena napipetováním jednotlivých reagensů, složení viz Tabulka č. 5., a následně byla rozpipetována po 22 μl. K reakční směsi ve zkumavce pak byly přidány 3 μl RNA vzorku. Směs byla zcentrifugována a zkumavky byly umístěny do termocykleru. RT-PCR reakce probíhala za podmínek dle Jarošová a Kundu (2010b) nebo dle Mekuria a kol., (2003) – viz Tabulky č. 6 a 7.

Tabulka č. 5: Složení reakční směsi pro OneStep RT- PCR (detekce PDV)

Chemikálie	koncentrace pracovního roztoku	konečná koncentrace	1 test [μl]
voda	-	-	7,5
pufr	2 ×	1 ×	12,5
primer F	20 pmol/μl	0,4 μM	0,5
primer R	20 pmol/μl	0,4 μM	0,5
reverzní transkriptáza	5 U/μl	2,5 U/reakce	0,5
RiboSafe RNase inhibitor	5 U/μl	2,5 U/reakce	0,5
objem reakční směsi [μl]		22	
objem vzorku [μl]		3	
celkový objem reakce [μl]		25	

Vysvětlivky: primer F (forward): PDV1F nebo PDV2F
 primer R (reverse): PDV1R nebo PDV2R

Tabulky č. 6 a 7 : Teplotní a časový průběh OneStep RT- PCR reakce dle Jarošová a Kundu (2010b) (vlevo) a dle Mekuria a kol. (2003) (vpravo)

krok č.	teplota [°C]	čas [min]	počet cyklů
1	48	30	1
2	95	2	1
3	95	0,5	40
4	60	0,5	
5	72	0,5	
6	72	7	1

krok č.	teplota [°C]	čas [min]	počet cyklů
1	94	1	1
2	94	0,5	35
3	56	0,5	
4	72	0,5	
5	72	5	1

4.2.5. Detekce *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV)

Pro detekci PNRSV byla použita RT-PCR podle Marbot a kol. (2003) s použitím primerů PNRSV 10F a PNRSV 10R a MyTaq™ One-Step RT-PCR kitu (Bioline). Reakční směs byla namíchána do 1,5ml mikrozkušavky, složení viz Tabulka č. 5 a to s ohledem na počet analyzovaných vzorků. Práce byla prováděna za sterilních podmínek, chemikálie a vzorky byly drženy na ledu. Směs ve zkumavce byla krátce zvortexována, stočena na minicentrifuze a rozpipetována po 22 μl do 0,2ml PCR mikrozkušavek. Do každé mikrozkušavky byly přidány 3 μl RNA vzorku. Mikrozkušavky byly zcentrifugovány a umístěny do termocykleru. PCR reakce probíhala za modifikovaných podmínek podle Marbot a kol., 2003 – viz Tabulka č. 8.

Tabulka č. 8: Teplotní podmínky a časový profil OneStep RT-PCR dle Marbot a kol. (2003)

krok č.	teplota [°C]	čas [min]	počet cyklů
1	45	20	1
2	95	2	1×
3	95	0,5	39
4	55	0,5	
5	72	0,5	
6	72	7	1×

Tabulka č. 9: Přehled primerů použitých k jednotlivým detekcím

typ primeru	název primeru	sekvence primeru 5' - 3'	velikost produktu (bp)	citace
F	PPV1	CCCTCACATCACCAGAGCCA	243	Wetzel a kol.(1992)
R	PPV2	CAGACTACAGCCTCGCCAGA		
F	PDV 2F	CGATTGGTTAACTCACTTTG	812	Jarošová a Kundu (2010b)
R	PDV 2R	AGCAGCATTTCCTCACTACGA		
F	PDV1F	GTATGATATCTCGTACCGAG	241	Mekuria a kol. (2003)
R	PDV1R	CTGGCTTGTTTCGCTGTGAA		
F	PNRSV 10F	TTCTTGAAGGACCAACCGAGAGG	348	Marbot a kol. (2003)
R	PNRSV 10R	GCTAACGCAGGTAAGATTTCCAAGC		

4.2.6. Elektroforetická separace v agarózovém gelu

Produkty PCR reakce byly detekovány pomocí elektroforetické separace v 1,5% agarózovém gelu v TAE pufru. Zásobní roztok 1,5% agarózového gelu byl připraven smícháním 3,5 g agarózy (Agarose I, AMRESCO) a 300 ml 1x TAE pufru a jejím rozvařením v mikrovlnné troubě. Rozvařený gel byl okamžitě použit, nebo byl dlouhodobě uchováván v chladničce při 4 °C pro pozdější použití. 50 ml rozehřáté agarózy bylo smícháno se 3 µl fluorescenčního barviva GoodView (GoodView™ Nucleic Acid Stain, SBS Genetech) a gel byl poté nalit do elektroforetické vaničky s vloženými hřebínky a ponechán tuhnout zhruba 45 min při pokojové teplotě. Gel byl následně přelit 1x TAE puftrem. Po vyjmutí hřebínku, byly do první jamky napipetovány 2 µl standardu molekulové hmotnosti GeneRuler 100bp DNA (Fermentas), do dalších jamek bylo pipetováno 5 µl jednotlivých PCR produktů smíchaných se 2 µl 0,1% bromfenolové modři. Elektroforetická separace probíhala při 70 – 80V po dobu 30 – 45 min. Výsledek byl vizualizován a následně dokumentován na UV trasluminátoru pomocí dokumentačního zařízení Syngene (G:BOX, Syngene).

4.3. Použité chemikálie a roztoky, přístroje, laboratorní vybavení

Veškeré chemikálie, roztoky a přístroje, které byly při práci používány, jsou uvedeny abecedně seřazené v následujících podkapitolách.

4.3.1. Použité chemikálie a roztoky

0,1% roztok bromfenolové modři v 30% glycerínu, Promega

0,1M Tris/Cl, pH 6,4 (2,42 g Tris, 160 ml vody, doplněno vodou na 200 ml, pH 6,4)

70% etanol

Agarose ITM, Biotechnology Grade, AMRESCO

AMV Reverse Transcriptase, Promega

deionizovaná voda

Gene RulerTM 100 bp DNA Ladder, Fermentas

GoodViewTM Nucleic Acid Stain, SBS Genetech

L2 pufr (60 g guanidin thiokyanát, 50 ml 0,1M Tris, pH 6,4)

L6 pufr (30 g guanidin thiokyanát, 25 ml 0,1M Tris, pH 6,4, 5,5 ml 0,2M EDTA, pH 8,0, 0,65 g Triton X-100)

Suspenze oxidu křemičitého – SC (60 g oxidu křemičitého (Sigma S5631), 0,5 l vody, po 24 hod odstraněno 430 ml tekuté části nad sedimentem, doplněno na 500 ml, protřepáno, necháno 5 hod sedimentovat, odstraněno 440 ml tekuté části, zbytek promíchán a přidáno pár kapek 32% HCl pro ustálení pH na hodnotě 2, suspenze sterilizována autoklávováním

PBS – T (0,5 ml 10% roztoku Tween-20, 100 ml PBS)

PBS – TPO (2 g PVP-40 a 0,2 g ovalbuminu rozetřeno s malým množstvím PBS – T a doplněno roztokem PBS – T na 100 ml)

PBS pufr (800 ml vody, 8 g NaCl, 7,2 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O, 0,2 g KH₂PO₄ a 0,2 g KCl, pH 7,4 a doplněno vodou na 1 l)

rRNasin ® RNase inhibitor, Promega

TAE pufr 1x

MyTaqTM DNA Polymerase (Bioline)

TBE pufr 10x (108 g Tris base, 55 g kyseliny borité, 40 ml 0,5M EDTA, doplněno vodou na 1 l, pH 8)

4.3.2. Přístroje a laboratorní vybavení

Analytické váhy A&D EK 200G, A&D Co. Ltd.

Centrifuga Biofuge pico, Heraeus

Centrifuga Spectrafuge 24D, Labnet

Elektroforetická komora HU 10 (Scie-Plas)

Homogenizátor FastPrep-24, MP Biomedicals

Laminární box PV-100, Telstar

Mikrovlonná trouba MA 85050, OTF

Minicentrifuga Spectrafuge™ MINI, Labnet

Minicentrifuga Prism™ Mini Centrifuge, Labnet

NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer, Thermo Scientific

Přístroj na tvorbu ledu Icematic F100, Compact Ice flakem, Gemini FV

Termoblok Mixing Block MB-102, Bioer

Termocykler T100™, BIO-RAD

Termocykler T-Personal, Biometra

UV Transluminátor Syngene G:BOX, dokumentační systém Gene Snap, Herolab

UV transluminátor UVT-14 L, Herolab

Váhy AND EK-200G, A&D Co. Ltd.

Vakuová pumpa XF54 230 50, Millipore

Vortex TTS 2 Yellowline, Maneko

Zdroj stejnosměrného proudu Power Station 300, Labnet a MP-250V, BioTech

5. VÝSLEDKY

V rámci této bakalářské práce bylo analyzováno celkem 62 stromů, z toho 48 mandloní obecných (*P. dulcis* (Mill.) D. A. Webb), ze kterých byly 4 vzorky poskytnuty z genových zdrojů (Lednice) a zbývajících 44 vzorků bylo sesbíráno na 4 různých lokalitách v České republice.

Z 12 mandloní pocházejících ze dvou sadů v Hustopečích byly na konci března sesbírány vzorky květů s atypickým zbarvením. Z mandloňové výsadby kolem silnice mezi obcemi Kaple a Čelechovice bylo počátkem června odebráno 29 vzorků listů. Z mandloní z Horních Věstonic byly na konci července získány 3 vzorky. Dalších 14 testovaných stromů představovalo 5 švestek domácích (*P. domestica* L.) zastoupených 2 vzorky z genových zdrojů a 3 vzorky z obce Holovousy, dále 5 višní obecných (*P. cerasus* subsp. *eucerasus* var. *caproniana*) z obce Holovousy a 2 broskvoně obecné (*P. persica* L.), meruňka obecná (*P. armeniaca* L.) a hybrid broskvoň x M49, jejichž vzorky pocházely rovněž z genových zdrojů. Jako negativní kontrola byla použita hrušeň obecná (*Pyrus communis*) (viz Tabulka č. 1).

Přibližně dvě třetiny testovaných mandloní (31/48) byly bezpříznakové. Jedna mandloň z Horních Věstonic projevovala na listech symptomy možné virové infekce, jako jsou chlorózy, mozaika a zesvětlení nervatury. Mandloně z této lokality rostly pod infekčním tlakem PPV-D, kterým byly infikovány okolní slivoně. Také barevné anomálie květů 12 mandloní z Hustopečí mohly být projevem virové infekce. 4 mandloně, jejichž vzorky pocházely z genových zdrojů, projevovaly na listech ve dvou případech žloutnutí a v dalších případech chlorotickou nebo bílou mozaiku.

Detekce *Plum pox virus*

K detekci PPV byla použita standardní metoda RT-PCR podle Wetzel a kol. (1992). Testováno bylo celkem 34 mandloní obecných. Jednalo se o 4 mandloně z genových zdrojů Lednice, 10 vybraných mandloní z Hustopečí s atypicky zbarvenými květy, 3 mandloně z Horních Věstonic a dále 17 mandloní z výsadby podél cesty mezi obcemi Kaple a Čelechovice. Přítomnost PPV byla hodnocena také na dalších 14 slivoních. Jednalo se o 5 višní obecných a 3 švestky domácí z Holovousů a 2 švestky domácí, 2 broskvoně obecné, meruňka obecná a broskvoň x M49 z genových zdrojů v Lednici (viz Tabulka č. 10). V souboru celkem 48 zkoumaných stromů nebyl PPV detekován v žádném případě, přestože některé rostliny vykazovaly barevné diskolorace a symptomy podobné virové infekci. Mezi ně patřila mandloň z Horních Věstonic s šarce podobnými symptomy na listech, 10 mandloní z Hustopečí s atypickým zbarvením květů a 4 příznakové mandloně z genových zdrojů, které nesly na listech známky žloutnutí a také chlorotickou mozaiku.

Obrázek č. 6: Příklad detekce PPV



(GR: GeneRuler 100 bp DNA ladder, Fermentas, 101-113 testované vzorky, 114 : PPV pozitivní kontrola)

Tabulka č. 10: Detekce PPV, PDV a PNRSV ve vzorcích

sběr					RT-PCR detekce virů			
typ vzorku	datum	lokalita	druh stromu	celkem vzorků	PPV	PDV (a)	PDV (b)	PNRSV
květ	29.3.2015	Hustopeče	<i>P. dulcis</i>	12	0 / 10	0 / 0	12 / 12	0 / 0
list	6.6.2015	Kaple, Čelechovice	<i>P. dulcis</i>	29	0 / 17	3 / 28	17 / 28	5 / 18
	28.7.2015	Horní Věstonice	<i>P. dulcis</i>	3	0 / 3	0 / 0	1 / 3	0 / 3
	28.7.2015	Lednice	<i>P. dulcis</i>	4	0 / 4	0 / 0	0 / 4	0 / 4
			<i>P. domestica</i>	2	0 / 2	0 / 0	0 / 2	
			<i>P. armeniaca</i>	1	0 / 1	0 / 0	0 / 1	
			<i>P. persica</i>	2	0 / 2	0 / 0	0 / 2	
			<i>P. persica x M49</i>	1	0 / 1	0 / 0	0 / 1	
	27.7.2015	Holovousy	<i>P. cerasus</i>	5	0 / 5	0 / 2	2 / 5	5 / 5
			<i>P. domestica</i>	3	0 / 3	0 / 0	3 / 3	1 / 3
celkový počet stromů				62	0 / 48	3 / 30	35 / 61	11 / 39
celkový počet mandloní				48	0 / 34	3 / 28	30 / 47	5 / 25

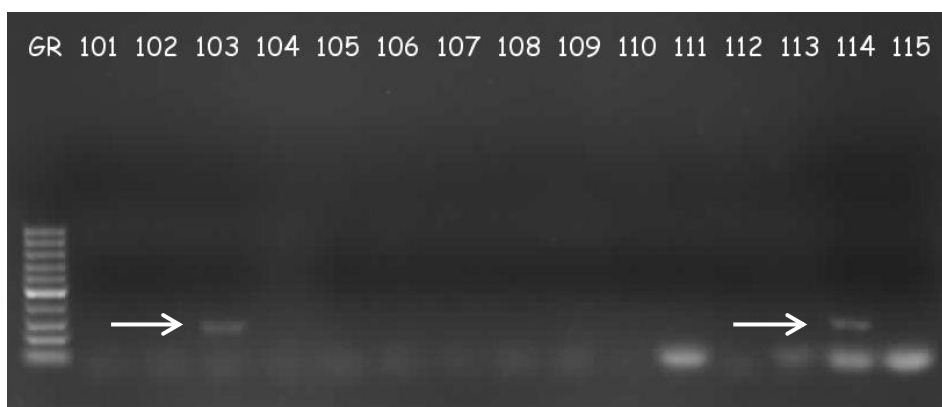
Detekce *Prune dwarf virus*

K detekci PDV byly použity dva postupy RT-PCR a to podle (1) Jarošová a Kundu (2010b) a (2) Mekuria a kol. (2003).

(1) V případě detekce dle Jarošová a Kundu (2010b) bylo testováno celkem 61 stromů, z toho 47 mandloní obecných. Jednalo se o 12 mandloní z Hustopečí, 28 z Kaple Čelechovice, 3 z Horních Věstonic a 4 z genových zdrojů. Zbývajících 14 stromů představovalo 5 švestek domácích (*P. domestica* L.) zastoupených 2 vzorky z Lednice a 3 vzorky z obce Holovousy, dále 5 višňů obecných (*P. cerasus* subsp. *eucerasus* var. *caproniana*) ze stejné lokality a 2 broskvoně obecné (*P. persica* L.), meruňka obecná (*P. armeniaca* L.) a hybrid broskvoň x M49 se vzorky z genových zdrojů (viz Tabulka č. 1). Více než třetina (17/47) testovaných mandloní vykazovala nějaké změny zbarvení květů nebo listů, které mohly být buď fyziologického původu, nebo mohly být způsobeny některým virovým onemocněním. V souboru celkem 61 testovaných stromů byl PDV potvrzen v 35 z nich. Infekce PDV byla zaznamenána na 30 mandloních, tedy přibližně v 63,8 % mandloní. 100 % mandloní z Hustopečí a více než 60 % (17/28) z výsadby vedle Kaple-Čelechovice bylo PDV pozitivních. 1 ze 3 mandloní z Horních Věstonic byla také infikována. Všechny stromy původem z genových zdrojů, byly vyhodnoceny jako negativní. Z obce Holovousy byly všechny 3 švestky a 2 z 5 višňů pozitivní (viz Tabulka č. 10).

(2) V případě druhé metody detekce dle Mekuria a kol. (2003) bylo testováno celkem 30 stromů. Jednalo se o 28 mandloní původem z lokality Kapele-Čelechovice, a 2 višně z obce Holovousy (viz Tabulka č. 1). PDV byl zjištěn pouze ve 3 z 28 testovaných mandloní. Jednalo se o odlišné mandloně nežli potvrdila druhá, citlivější metoda detekce dle Jarošová a Kundu (2010b). (viz Tabulka č. 10)

Obrázek č. 7: Příklad detekce PDV

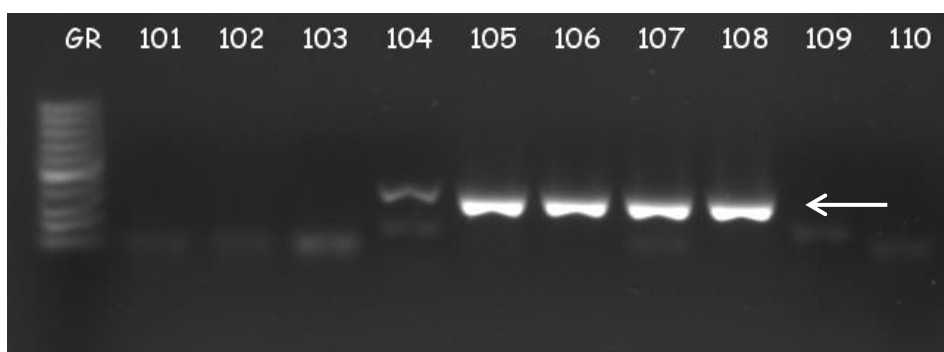


(GR: GeneRuler 100 bp DNA ladder, Fermentas, 101 - 115 : jednotlivé vzorky, šipky značí očekávané produkty)

Detekce *Prunus necrotic ringspot virus*

K detekci PNRSV byla použita metoda RT-PCR podle Marbot a kol. (2003). Testováno bylo 40 stromů. 25 z nich představovaly mandloně ze 3 lokalit – 18 z nich pocházelo z Kaple-Čelechovice, 3 z Horních Věstonic a 4 z Lednice. Zbývajících 14 testovaných stromů bylo 5 švestek domácích (*P. domestica* L.) zastoupených 2 vzorky z genových zdrojů a 3 vzorky z obce Holovousy, dále 5 višňí obecných (*P. cerasus* subsp. *eucerasus* var. *caproniana*) z téže lokality a 2 broskvoně obecné (*P. persica* L.), meruňka obecná (*P. armeniaca* L.) a hybrid broskvoň x M49, se vzorky z genových zdrojů (viz Tabulka č. 1). Z celkového počtu 40 stromů, 11 z nich bylo vyhodnoceno jako pozitivních na přítomnost PNRSV. Virus byl detekován ve 20 % hodnocených mandloní (5/25), dále na všech testovaných višňích (5/5) a na 1/5 švestek (viz Tabulka č. 10).

Obrázek č. 8: Příklad detekce PNRSV



(GR: GeneRuler 100 bp DNA ladder, Fermentas, 101 – 110: jednotlivé vzorky, šipka značí očekávané produkty)

Výskyt PPV nebyl potvrzen na žádné ze 4 zkoumaných lokalit. Mandloně pocházející z Hustopečí byly infikovány pouze PDV a to ve všech 12 případech. Na 28 testovaných mandloních z Kaple-Čelechovice byly v případě první metody detekovány 3 jednotlivé infekce PDV a v případě druhé, citlivější metody 17 pozitivních případů PDV infekce. Koinfekce PDV a PNRSV byla zaznamenána v 5 případech. Z 3 mandloní rostoucích v Horních Věstonicích byla pouze 1 infikována PDV. U 4 mandloní, jejichž vzorky byly poskytnuty z genových zdrojů, nebyla prokázána infekce ani jedním ze tří virů.

6. DISKUZE

Plum pox virus z rodu *Potyvirus* patří k nejnebezpečnějším patogenům peckovin, infikuje mnohé zástupce rodu *Prunus* a způsobuje na nich neléčitelné onemocnění šarka švestky vážně ohrožující celosvětovou ovocnou produkci. Mandloň obecná bývá pouze vzácně přirozeně infikována PPV a to bez výrazných symptomů. Slabé symptomy mohou být často zcela přehlédnuty. Ojedinelé, šarce podobné symptomy, nejsou spolehlivým indikátorem infekce PPV a přítomnost viru musí být potvrzena kombinací více detekčních metod. Někdy mohou být zaměněny za velmi obdobné symptomy ACLSV, které jsou proto často nazývány „pseudošarkou“ (Posnette a Ellenberger, 1963). Případy výskytu intenzivních symptomů šarky švestky jsou na mandloních velmi výjimečné (Ilbaği a Citir, 2014).

Aktuální případy mandloní prokazatelně infikovaných virem šarky švestky byly ohlášeny v Turecku. V regionu Trakya bylo v roce 2010 potvrzeno 5 případů a o 4 roky později dalších 5 (Karabacak a Ilbaği, 2011; Ilbaği a Citir, 2014). Také v provincii Tekirdağ byly v roce 2010 potvrzeny 4 případy (Akbaş a kol., 2011). Mezi země kde byly PPV pozitivní mandloně již dříve zaznamenány patří Maďarsko (Kölber a kol., 2003), Bulharsko (Topchiiska, 1996; Kamenova a Milusheva 2005) a Rumunsko (Macovei a Diaconu, 2001). Jedná se o oblasti s dlouhodobým výskytem hned několika kmenů PPV a širokým okruhem jeho teplomilných hostitelů. Infekce však byly potvrzeny převážně na základě ELISA testování, méně často i RT-PCR detekce a jsou proto nutné aktuálnější informace. Mimo Evropu jsou známy případy pouze z Čile (Herrera a kol., 1994, 2013).

Některé příbuzné druhy mohou být také infikovány PPV. Víšeň žlaznatá, mandloň trojlaločná a mandloň Davidova byly infikovány PPV, avšak s různě intenzivními symptomy (Topchiiska, 1996; Kamenova a Milusheva, 2005; Damsteegt a kol, 2007a; Kalinina a kol., 2007a; Sebestyen, 2008; Decroocq a kol., 2005; Bassi, 2006).

Globálně má mandloň obecná i její divoké či okrasné druhy velký význam ve šlechtitelství zaměřeném na využívání genů rezistence k PPV a vývoji nových genotypů slivoní (Kegler a kol., 1998; Rubio a kol., 2003, 2005; Llácer a Cambra, 2006; Decroocq a kol., 2005; Bassi, 2006; Pascal a kol. 2001; Martínez-Gómez a kol., 2004a, 2004b; Rubio-Cabetas a kol., 2010; Salava a kol., 2013).

V rámci experimentální části této bakalářské práce bylo celkem 62 stromů, z toho 48 mandloní obecných (*P. dulcis* (Mill.) D. A. Webb) hodnoceno na přítomnost 3 významných virů mandloní. Hlavním cílem bylo zhodnotit výskyt PPV na mandloních s ohledem na mandloň jako přirozeného hostitele a potenciální rezervoár viru. Vybrané mandloně, ze kterých byly vzorky k detekcím

sesbírány, pocházely ze 4 lokalit: Kaple - Čelechovice - výsadba podél silnice, Lednice (genové zdroje MENDELU), Horní Věstonice – výsadba podél silnice a Hustopeče – mandloňový sad (Mandloňová stezka). Přibližně dvě třetiny všech testovaných mandloní (31/48) byly zcela bezpříznakové a vzorky z nich byly odebrány náhodně. Třetina mandloní naopak vykazovala symptomy možné virové infekce - atypické zbarvení květů, chlorózy a žlutou mozaiku na listech nebo zesvětlení jejich nervatury. Některé mandloně rostly i desítky let v bezprostřední blízkosti švestek a myrobalánů prokazatelně infikovaných PPV-D (Šafářová a kol., 2017). Dalšími 14 hodnocenými stromy byly 2 švestky domácí (*P. domestica* L.) a 5 višňi obecných (*P. cerasus* subsp. *eucerasus* var. *caproniana*) z Holovousů, 2 švestky domácí, 2 broskvoně obecné (*P. persica* L.), meruňka obecná (*P. armeniaca* L.) a hybrid broskvoň x M49, všechny z genových zdrojů (Lednice). Také některé z těchto slivoní byly příznakové a vyskytovaly se v bezprostřední blízkosti testovaných mandloní.

V souboru celkem 48 vzorků mandloní byla testována přítomnost virů *Plum pox virus* (PPV) z čeledi *Potyviriidae*, *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV) a *Prune dwarf virus* (PDV), oba z čeledi *Bromoviridae*.

Výskyt PPV nebyl potvrzen na žádném z hodnocených stromů. Byly však nalezeny jednotlivé i směsné infekce PDV a PNRSV. Mandloň z Hustopeče byly infikovány pouze PDV a to ve všech 12 případech. Na 28 testovaných mandloních z Kaple - Čelechovice byly v případě první metody detekovány 3 jednotlivé infekce PDV a v případě druhé, citlivější metody 17 případů. Směsná infekce PDV a PNRSV byla zaznamenána v 5 případech mandloní z této lokality. Ze tří mandloní rostoucích v Horních Věstonicích pouze jedna byla infikována PDV. U 4 mandloní, jejichž vzorky byly poskytnuty z genových zdrojů Lednice, nebyla prokázána infekce ani jedním z hledaných virů. PNRSV byl dále detekován na 1 švestce a 5 višních z obce Holovousy. PDV byl mimo mandloní potvrzen pouze na 3 švestkách a 2 višních taktéž z obce Holovousy.

Zvolený postup detekce PPV není příliš spolehlivý, jelikož často poskytuje nespecifické produkty. Metoda detekce PDV dle Jarošová a Kundu (2010b) se prokázala být citlivější nežli metoda dle Mekuria a kol. (2003). Výsledky obou detekcí by měly být ideálně ověřeny jinou metodou testování nebo sekvenováním.

Výsledky virových detekcí vyvrátily mandloň obecnou jako možného přirozeného hostitele viru šarky švestky v České republice, jak dříve navrhl Kölber (2001). Mandloň na našem území není pěstována ve velkém rozsahu a má spíše okrasný význam. Zdejší klima sice dovoluje pěstování mandloní, ale jarní mrazíky a vlhké počasí znehodnocují jejich úrodu.

Predominantním kmenem PPV je v České republice Dideron, ale lokálně se vyskytují také Marcus a Recombinant. Testované mandloně rostly v oblastech, kde byly dlouhodobě vystaveny infekci

PPV-D, přesto však nebyly infikovány. Do současnosti není na našem území znám historicky žádný případ šarky švestky na mandloních, přestože v sousedních zemích byla tato situace několikrát popsána.

Šafářová a kol. (2017) prováděli screening většího počtu vzorků z různých lokalit a dospěli ke stejnému závěru - mandloň obecná nehraje v současnosti roli v epidemiologii PPV na našem území. Situace se však může zhoršit se změnou ekologických poměrů nebo rozšířením nových izolatů viru. Také zájem o mandloně postupně vzrůstá a tím se zvyšuje i riziko zavlečení dalších kmenů viru do jimi doposud nezasažených oblastí.

Přítomnost symptomů na mandloních není spolehlivým indikátorem PPV infekce a mohla být pravděpodobně způsobena jiným patogenem, například ACLSV. Ten indukuje symptomy velmi podobné šarce („pseudošarka“).

Obrázek č. 9: Symptomy „pseudošarky“ na listech mandloní obecných (foto D. Šafářová)



7. ZÁVĚR

PPV vyvolává na ovocných dřevinách rodu *Prunus* závažné onemocnění šarka švestky. Role mandloní jako rezervoáru PPV stále není zcela jasná, přestože výskyt PPV infikovaných mandloní byl v několika sousedních zemích ohlášen. Mandloně prozatím nepředstavují v České republice závažné epidemiologické riziko. Za vhodných podmínek mohou být mandloně hostiteli experimentálními (Dallot a kol., 1997; Damsteegt a kol., 2007a; Petrov a Stoev, 2011). Pouze kmeny PPV-M, -D a -T nyní infikují mandloně v Turecku (Kölber a kol., 2003; Ilbagi a Citir, 2014), Maďarsku (Kölber a kol., 2003), Bulharsku (Topchiiska, 1996; Kamenova a Milusheva 2005), Rumunsku (Macovei a Diaconu, 2001) a Čile (Herrera a kol., 1994, 2013).

V souboru 62 testovaných vzorků, z toho 48 mandloní obecných, původem z různých lokalit České republiky nebyla v žádném případě zjištěna infekce tímto závažným virem, přestože velká část z testovaných stromů vykazovala symptomy nějakého virového onemocnění. Ve vzorcích však byly potvrzeny případy jednotlivých i směsných infekcí PDV a PNRSV, které patří k nejčastějším virovým patogenům mandloní. Koinfekce PNRSV a PDV byla zaznamenána na 5 mandloních, jednotlivé infekce PNRSV pouze na 5 višních a 1 švestce. PDV byl detekován na všech 12 mandloních z Hustopečí, 1 mandloni z Holovous a celkem z 28 mandloní z Kaple - Čelechovice byla jeho přítomnost potvrzena ve 3 případech první metodou a v 17 případech druhou metodou. PDV infikoval také 3 švestky a 2 višně rostoucí v obci Holovousy.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY:

- Acuña, R.** (1993). Outbreaks of *Plum pox virus* in Chile. In European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) Conference *Plum pox virus*, Bordeaux, France. 5-8.
- Adams, A.** (1978). The detection of *Plum pox virus* in *Prunus* species by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Annals of Applied Biology*. 90. 215 - 221.
- Adams, M. J., Antoniw, J. F., Fauquet, C. M.** (2005). Molecular criteria for genus and species discrimination within the family *Potyviridae*. *Archives Virology*. 150. 459-479.
- Adams, M. J., Shi, Y., Chen, J., Hong, X.** (2007). A potyvirus P1 protein interacts with the Rieske Fe/S protein of its host. *Molecular Plant Pathology*. 8. 785-790.
- Akbaş, B., Değirmenci, K., Çiftçi, O., Kaya, A., Yurtmen, M., Uzunogullari, N., Çelik, N., Türkölmez, Ş.** (2011). Update on *Plum Pox Virus* Distribution in Turkey. *Phytopathologia Mediterranea*. 50. 75-83.
- Atanassov, D.** (1932). Plum pox. A new virus disease. *Annals of the University of Sofia Faculty of Agriculture and Silviculture*. 11. 49-69.
- Badenes, M. L., & Llácer, G.** (2006). Breeding for resistance: breeding for *Plum pox virus* resistant apricots (*Prunus armeniaca* L.) in Spain. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*. 36. 323-326.
- Baltimore, D.** (1971). Expression of animal virus genomes. *Bacteriological Reviews*. 35. 235-241.
- Barba, M., Pasquini, G., Quacquarelli, A.** (1986). Role of seeds in the epidemiology of two almond viruses. *Acta Horticulturae*. 193. 127-130.
- Barnett, O. W. (Ed.)**. (2012). *Potyvirus taxonomy* (Vol. 5). Springer Science & Business Media.
- Bassi, D.** (2006). Breeding for resistance: Breeding for resistance to *Plum pox virus* in Italy. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*. 36. 327-329.
- Bassi, D., Audergon, J. M.** (2006). Apricot breeding: Update and perspectives. *Acta Horticulturae*. 701. 279-294.
- Baumgartnerova, H.** (1996). First findings of *Plum pox virus* in walnut trees (*Juglans regia* L.). *Acta Virologica*. 40. 59-60.
- Bazzoni, A., Didonna, A., Savino, V., Palmisano, F.** (2008). Preliminary results of trials evaluating the behaviour to *Plum pox virus* of different apricot crosses. *Acta Horticulturae*. 781. 295-302.

- Bernad, D.** (1995). Characterization of Some Self-compatible Almonds. II. Flower Phenology and Morphology. *HortScience*. 30. 321-324.
- Bernhard, R.** (1949). The peach-almond and its utilization. *Revue Horticole*. 121. 97-101.
- Blanc, S., Ammar, E. D., García-Lampasona, S., Dolja, V. V., Llave, C., Baker, J., & Pirone, T. P.** (1998). Mutations in the potyvirus helper component protein: effects on interactions with virions and aphid stylets. *Journal of General Virology*. 79. 3119-3122.
- Blanc, S., López-Moya, J. J., Wang, R., García-Lampasona, S., Thornbury, D. W., & Pirone, T. P.** (1997). A specific interaction between coat protein and helper component correlates with aphid transmission of a *Potyvirus*. *Virology*. 231. 141-147.
- Bodin, M., Glasa, M., Verger, D., Costes, E., & Dosba, F.** (2003). Distribution of the sour cherry isolate of *Plum pox virus* in infected *Prunus* rootstocks. *Journal of Phytopathology*. 151. 625-630.
- Boonham, N., Kreuze, J., Winter, S., van der Vlugt, R., Bergervoet, J., Tomlinson, J., & Mumford, R.** (2014). Methods in virus diagnostics: from ELISA to next generation sequencing. *Virus Research*. 186. 20-31.
- Borgstrom, B., Johansen, I. E.** (2001). Mutations in *Pea seed-borne mosaic virus* genome-linked protein VPg after pathotype-specific virulence in *Pisum sativum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 14. 707-714.
- Browicz, K.** (1989). Conspectus and chorology of the genera *Amygdalus* L. and *Louiseania* Carriere. *Arbor. Kornickie*. 34. 31-54.
- Browicz, K., Zohary, D.** (1996). The genus *Amygdalus* L. (*Rosaceae*). species relationships, distribution and evolution under domestication. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 43. 229-247.
- Brunt, A. A.** (1992). The general properties of potyviruses. *Archives of Virology Supplementum*. 5. 3-16.
- Boscia, D., Zeramardini, H., Cambra, M. A., Potere, O., Gorris, M. T., Myrta, A., Di Terlizzi, B., & Savino, V.** (1997). Production and characterization of a monoclonal antibody specific to the M serotype of *Plum pox potyvirus*. *European Journal of Plant Pathology*. 103. 477-480.
- Caglayan, K., Serce, C. U., Gazel, M., Kaya, K., Cengiz, F. C., Vidal, E., & Cambra, M. A.** (2013). Evaluation of the susceptibility of different *Prunus* rootstocks to natural infection of Plum pox virus-T. *Journal of Plant Pathology*. 579-586.

- Cambra, M. A., Asensio, M., Gorris, M. T., Pérez, E., Camarasa, E., Garcia, J. A., Moya, J. J., López-Abella, D., Vela, C., & Sanz, A.** (1994). Detection of *Plum pox potyvirus* using monoclonal antibodies to structural and non-structural proteins. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*. 24. 569-577.
- Cambra, M. A., Capote, N., Cambra, M., Llácer, G., Botella, P. & Lopez-Quílez, A.** (2006a). Epidemiology of sharka disease in Spain. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*. 36. 271-275.
- Cambra, M. A., Capote, N., Myrta, A. & Llácer, G.** (2006b). *Plum pox virus* & the estimated costs associated with sharka disease. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*. 36. 202-204.
- Cambra, M. A., Boscia, D., Myrta, A., Palkovics, L., Navrátil, M., Barba, Goris M. T., Capote, N.** (2006c). Detection and characterization of *Plum pox virus*: serological methods. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*. 36. 254-261.
- Cambra, M., Crespo, J., Gorris, M. T., Martínez, M. C., Olmos, A., Capote, N., Cambra, M.** (2004). Detection and eradication of *Plum pox virus* Marcus Type in Aragón (Spain). *Acta Horticulturae*. 657. 231-235.
- Candresse, T., Cambra, M. A.** (2006). Causal agent of sharka disease: historical perspective and current status of *Plum pox virus* strains. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*. 36. 239-246.
- Candresse, T., Cambra, M., Dallot, S., Lanneau, M., Asensio, M., Gorris, M., Revers, F., Macquaire, G., Olmos, A., Boscia, D., Quiot, J. B., Dunez, J.** (1998). Comparison of monoclonal antibodies and polymerase chain reaction assays for the typing of isolates belonging to the D and M serotypes of *Plum pox potyvirus*. *Phytopathology*. 88. 198-204.
- Candresse, T., Svanella-Dumas, L., Gentit, P., Caglayan, K. & Çevik, B.** (2007). First report of the presence of *Plum pox virus* Rec strain in Turkey. *Plant Disease*. 91. 331-331.
- Candresse, T., Macquaire, G., Lanneau, M., Bousalem, M., Wetzels, T., Quiot-Douine, L., Quiot, J. B., Dunez, J.** (1994). Detection of *Plum pox potyvirus* and analysis of its molecular variability using immunocapture-PCR. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*. 24. 585-594.
- Canova, A., Giunchedi, L., Credi, R., Alberini, A., & Nicoli, C.** (1977). Sharka or plum pox of apricot and plum in Italy. *Frutticoltura*. 39. 17-23.
- Capote, N., Cambra, M. A., Botella, P., Gorris, M. T., Martínez, M. C., López-Quílez, A., Cambra, M.** (2010). Detection, characterization, epidemiology and eradication of *Plum pox virus* Marcus type in Spain. *Journal of Plant Pathology*. 92. 619-628.
- Casper, R.** (1975). Serodiagnosis of *Plum pox virus*. *Acta Horticulture*. 44. 171-172.

- Cervera, M. T., Riechmann, J. L., Martin, M. T. & García, J. A.** (1993). Y-Terminal sequence of the *Plum pox virus* PS and o6 isolates: evidence for RNA recombination within the *Potyvirus* group. *Journal of General Virology*. 74. 329-334.
- Cieślińska, M.** (2004). Detection of Strawberry mottle virus (SMoV) using RT-PCR – comparison of two RNA extraction methods. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*. 12. 17-22.
- Clark, M. F., & Adams, A. N.** (1977). Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology*. 34. 475-483.
- Cole, A., Mink, G. I., & Regev, S.** (1982). Location of *Prunes necrotic ringspot virus* on pollen grains from infected almond and cherry trees. *Phytopathology*. 72. 1542-1545.
- Coman, T., & Cociu, V.** (1976). Transmission de la sharka par le pollen et par les graines. *Bulletin d'Information Sharka*. 2. 15-21.
- Crescenzi, A., d'Aquino, L., Comes, S., Nuzzaci, M., Piazzolla, P., Boscia, D., & Hadidi, A.** (1997). Characterization of the sweet cherry isolate of *Plum pox potyvirus*. *Plant Disease*. 81. 711-714.
- Crescenzi, A., Nuzzaci, M., Piazzolla, P., Levy, L., & Hadidi, A.** (1995). *Plum pox virus* (PPV) in sweet cherry. *Acta Horticulturae*. 386. 219-225.
- Cropley, R.** (1968). The identification of plum pox (Sharka) virus in England. *Plant Pathology*. 17. 66-70.
- Čechová, J., Baránek, M., Holleínová, V.** (2015). Identification of unknown almond genotypes by SSR analysis. *Acta Horticulturae*. 1100. 149-153.
- Dallot, S., Bousalem, M., Boeglin, M., Renaud, L. Y., Quiot, J. B.** (1997). Potential role of almond in sharka epidemics: susceptibility under controlled conditions to the main types of *Plum pox potyvirus* and survey for natural infections in France. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*. 27. 539–546.
- Dallot, S., Glasa, M., Jevremović, D., Kamenova, I., Paunovic, S., Labonne, G.** (2011). Mediterranean and central-eastern European countries host viruses of two different clades of *Plum pox virus* strain M. *Archives of Virology*. 156. 539-542.
- Dallot, S., Gottwald, T., Labonne, G. & Quiot, J. B.** (2004). Factors affecting the spread of *Plum pox virus* strain M in peach orchards subjected to roguing in France. *Phytopathology*. 94. 1390-1398.

- Dallot, S., Kamenova, I., Glasa, M., Pittnerova, S., Kominek, P., Virscek-Marn, M., Mavric Plesko, I., Paunović, S., Jevremović, D. & Milusheva, S. (2008).** Prevalence and genetic structure of PPV-M in six European countries. *Acta Horticulturae*. 781. 227-234.
- Dallot, S., Labonne, G., Boeglin, M., Quiot-Douine, L., Quiot, J. B. & Candresse, T. (1998).** Peculiar *Plum pox potyvirus* D-populations are epidemic in peach trees. *Acta Horticulturae*. 472. 355-365.
- Damsteegt, V. D., Scorza, R., Stone, A. L., Schneider W. L., Webb, K., Demuth, M., Gildow, F. E. (2007a).** Prunus host range of *Plum pox virus* (PPV) in the United States by aphid and graft inoculation. *Plant Disease*. 91. 18-23.
- Damsteegt, V. D., Stone, A. L., Schneider, W. L., Lister, W. D. & Gildow, F. E. (2007b).** Potential Prunus host range of PPV-PENN isolates by aphid transmission. *Acta Horticulturae*. 657. 201-205.
- Damsteegt, V. D., Waterworth, H. E., Mink, G. I., Howell, W. E., & Levy, L. (1997).** *Prunus tomentosa* as a diagnostic host for detection of *Plum pox virus* and other Prunus viruses. *Plant Disease*. 81. 329-332.
- Deborré, G., Jelkman, W., & Maiss, E. (1995).** Biological and molecular biological investigations of several *Plum pox virus* (PPV) isolates. *Acta Horticulturae*. 386. 253-262.
- Decroocq, V., Foulongne, M., Lambert, P., Gall, O. L., Mantin, C., Pascal, T., Schurdi-Levraud, V., & Kervella, J. (2005).** Analogues of virus resistance genes map to QTLs for resistance to sharka disease in *Prunus davidiana*. *Molecular Genetics and Genomics*. 272. 680-689.
- Demetriades, S. D., & Catsimbas, C. (1968).** Attaques et nouveaux ennemis signales (Sharka). *Bulletin Phytosanitaire*. 16. 10-11.
- Desvignes, J. C., Boyé, R., Cornaggia, D., Grasseau, N., Hurtt, S., & Waterworth, H. (1999).** Virus diseases of fruit trees. (Diseases due to viroids, viruses, phytoplasmas and other undetermined infectious agents). Centre Technique Interprofessionnel des Fruits et Légumes (CTIFL).
- Desvignes, J. C., Grasseau, N., Boyé, R., & Gentit, P. (1997).** Cherry plum pox potyvirus: receptivity of cherry trees and hosts of the sour cherry strain. *Acta Horticulturae*. 472. 351-354.
- Di Terlizzi, B., Boscia, D. (2006).** *Plum pox virus* (PPV) in Italy. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*. 36. 210.

- Dicenta, F., & García, J. E.** (1993). Inheritance of the kernel flavour in almond. *Heredity*. 70. 308-312.
- Dondini, L., Adami, M., Guidarelli, M., Gaiotti, F., Negri, P., Tartarini, S., Palmisano, F., Bazzoni, A., Castellano, M., Savino, V., Lain, O., Testolin, R., Rizzo, M., Vivoli, D., Geuna, F., Bassi, D., Boscia, D. & Minafra, A.** (2010). Strategies to confer resistance to Sharka (PPV) in apricot. *Acta Horticulturae*. 862. 477-482.
- Dondini, L., Lain, O., Vendramin, V., Rizzo, M., Vivoli, D., Adami, M., Guidarelli, M., Gaiotti, F., Palmisano, F., Bazzoni, A., Boscia, D., Geuna, F., Tartarini, S., Negri, P., Castellano, M., Savino, V., Bassi, D. & Testolin, R.** (2011). Identification of QTL for resistance to *Plum pox virus* strains M and D in Lito and Harcot apricot cultivars. *Molecular Breeding*. 27. 289-299.
- Dosba, F., Lansac, M., Eyguard, J. P., Bonnet, A., & Salesses, G.** (1994). Behavior towards PPV of *Prunus* interspecific hybrids and plums varieties. *Acta Horticulturae*. 359. 136-144.
- Dosba, F., Maison, P., Lansac, M., & Massonie, G.** (1987). Experimental transmission of *Plum pox virus* (PPV) to *Prunus mahaleb* and *Prunus avium*. *Journal of Phytopathology*. 120. 199-204.
- Dounin, M. S., & Minoiu, N.** (1968). On serodiagnosis of *Plum pox virus*. *Deut Akad Landwirtschaftswiss Tagungsber*.
- Dunez, J.** (1977). Application des techniques immunoenzymatiques a la detection de certains virus pathogenes des vegetaux. la methode ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). *Annales de Phytopathologie*.
- Elibüyük, I. O.** (2004). Current situation of sharka disease in Ankara, Turkey. *Phytoparasitica*. 32. 417-420.
- European and Mediterranean Plant Protection Organization – EPPO.** 2004. Diagnostic protocol for regulated pests. *Plum pox potyvirus*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*. 34. 247–56.
- European and Mediterranean Plant Protection Organization - EPPO.** 2006. Current status of *Plum pox virus* and sharka disease worldwide. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*. 36. 205–218.
- Esfahlan, A. J., Jamei, R., & Esfahlan, R. J.** (2010). The importance of almond (*Prunus amygdalus* L.) and its by-products. *Food Chemistry*. 120. 349-360.
- Eynard, A., Roggero, P., Lenzi, R., Conti, M., & Milne, R. G.** (1991). Test for pollen and seed transmission of *Plum pox virus* (Sharka) in two apricot cultivars. *Advances in Horticultural Science*. 104-106.

- Felipe, A. J.** (1975). F1 hybrids of peach and almond trees as a model for both species. *Agricultura*. 44. 661-663.
- Felipe, A. J.** (1994). Flower quality and fruit quality in almond: Conflicting objectives?. *Progress in Temperate Fruit Breeding* (pp. 245-248). Springer Netherlands.
- Festić, H.** (1978). Investigation of new sharka virus hosts. *Acta Horticulturae*. 74. 233-237.
- Fulton, R. W.** (1970a). *Prunus necrotic ringspot virus*. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses. 5.
- Fulton, R. W.** (1970b). *Prune dwarf virus*. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses. 1.
- Gadiou, S., Šafářová, D., Navrátil, M.** (2008). Genetic variability of *Plum pox virus* isolates in the Czech Republic. *European Journal of Plant Pathology*. 121. 513-517.
- García, J. A., Cambra, M. A.** (2007). *Plum pox virus* and sharka disease. *Plant Viruses*. 1. 69-79.
- García, J. A., Glasa, M., Cambra, M., & Candresse, T.** (2014). *Plum pox virus* and sharka: a model potyvirus and a major disease. *Molecular Plant Pathology*. 15. 226-241.
- Gentit, P.** (2006). Detection of *Plum pox virus*: biological methods. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*. 36. 251-253.
- Gibbs, A. J., Ohshima, K., Phillips, M. J., & Gibbs, M. J.** (2008). The prehistory of Potyviruses: their initial radiation was during the dawn of agriculture. *PLoS One*, 3. e2523.
- Gildow, F. E., Levy, L., Damsteegt, V. D., Stone, A. L., Schneider, W. L. & Luster, D. G.** (2004a). Transmission of the three north american isolates of *Plum pox virus*: identification of aphid vectors and species-specific transmission from infected stone fruits. *Acta Horticulturae*. 657. 207-211.
- Gildow, F., Damsteegt, V., Stone, A., Schneider, W., Luster, D., & Levy, L.** (2004b). Plum pox in North America: Identification of aphid vectors and a potential role for fruit in virus spread. *Phytopathology*. 94. 868-874.
- Glasa, M.** (2006). *Plum pox virus* (PPV) in Slovakia. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*. 36. 214-214.
- Glasa, M., & Candresse, T.** (2005). Partial sequence analysis of an atypical Turkish isolate provides further information on the evolutionary history of *Plum pox virus* (PPV). *Virus Research*. 108. 199-206.

Glasa, M., & Candresse, T. (2009). *Plum pox virus*. Desk Encyclopedia of Plant and Fungal Virology. 280.

Glasa, M., Hricovsky, I., & Kudela, O. (1999). Evidence for non-transmission of *Plum pox virus* by seed in infected plum and myrobalan. *Biologia-Bratislava*. 54. 481-488.

Glasa, M., & Šubr, Z. W. (2005). The complete nucleotide sequence of a natural recombinant *Plum pox virus* (PPV) isolate. *Phytopathologia Polonica*. 36. 41-46.

Glasa, M., Boeglin, M., & Labonne, G. (2004a). Aphid transmission of natural recombinant *Plum pox virus* isolates to different *Prunus* spp.- A contribution for understanding the epidemiology of an atypical PPV. *Acta Horticulturae*. 657. 217-220.

Glasa, M., Malinowski, T., Predajňa, L., Pupola, N., Dekena, D., Michalczyk, L., Candresse, T. (2011). Sequence variability, recombination analysis, and specific detection of the W strain of *Plum pox virus*. *Phytopathology*. 101. 980-985.

Glasa, M., Marie-Jeanne, V., Labonne, G., Šubr, Z., Kúdela, O., & Quiot, J. B. (2002). A natural population of recombinant *Plum pox virus* is viable and competitive under field conditions. *European Journal of Plant Pathology*. 108. 843-853.

Glasa, M., Palkovics, L., Komínek, P., Labonne, G., Pittnerová, S., Kúdela, O., Candresse, T., Šubr, Z. (2004b). Geographically and temporally distant natural recombinant isolates of *Plum pox virus* (PPV) are genetically very similar and form a unique PPV subgroup. *Journal of General Virology*. 85. 2671-2681.

Glasa, M., Prihodko, Y., Predajňa, L., Nagyová, A., Shneyder, Y., Zhivaeva, T., Šubr, Z., Cambra, M. A., Candresse, T. (2013). Characterization of sour cherry isolates of *Plum pox virus* from the Volga basin in Russia reveals a new cherry strain of the virus. *Phytopathology*. 103. 972-979.

Gottwald, T. R., Avinent, L., Llácer, G., Hermoso De Mendoza, A. & Cambra, M. A. (1995). Analysis of the spatial spread of sharka (*Plum pox virus*) in apricot and peach orchards in Eastern Spain. *Plant Disease*. 79. 266-278.

Gradziel, T. M. (2009). Almond (*Prunus dulcis*) Breeding. *Breeding Plantation Tree Crops: Temperate Species*. 1-31.

Gradziel, T. M. (2011). 2 Origin and Dissemination of Almond. *Horticultural Reviews*. 38, 23.

- Gradziel, T. M., Martínez-Gómez, P., Dicenta, F., & Kester, D. E.** (2001). The utilization of related *Prunus* species for almond variety improvement. *Journal of the American Pomological Society*. 55. 100.
- Greber, R. S., Klose, M. J., Milne, J. R., & Teakle, D. S.** (1991). Transmission of *Prunus necrotic ringspot virus* using plum pollen and thrips. *Annals of Applied Biology*. 118. 589-593.
- Greber, R. S., Teakle, D. S., & Mink, G. I.** (1992). Thrips-facilitated transmission of Prune dwarf and *Prunus necrotic ringspot* viruses from cherry pollen to cucumber. *Plant Disease*. 76. 1039-1041.
- Grzela, R., Andrieu, J. P., Dublet, B., Chroboczek, J., Stokovska, L., Zagorski, W.** (2006). *Potyvirus* terminal protein VPg, effector of host eukaryotic initiation factor eIF4E. *Biochimie*. 88. 887-896.
- Gürcan, K., Ceylan, A.** (2016). Strain identification and sequence variability of *Plum pox virus* in Turkey. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*. 40. 746-760.
- Hartmann, W., & Neumüller, M.** (2006). Breeding for resistance: Breeding for *Plum pox virus* resistant plums (*Prunus domestica* L.) in Germany. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*. 36. 332-336.
- Hasio´w-Jaroszewska, B., Fares, M. A., Elena, S. F.** (2013). Molecular Evolution of Viral Multifunctional Proteins: The Case of *Potyvirus* HC-Pro. *Journal of Molecular Evolution*. 78. 75-86.
- Helguera, P. R., Taborda, R., Docampo, D. M., & Ducasse, D. A.** (2001). Immunocapture reverse transcription-polymerase chain reaction combined with nested PCR greatly increases the detection of *Prunus necrotic ring spot virus* in the peach. *Journal of Virological Methods*. 95. 93-100.
- Herrera, G.** (2013). Investigations of the *Plum pox virus* in Chile in the past 20 years. *Chilean Journal of Agricultural Research*. 73. 60-65.
- Herrera, M.** (1994). Detection of Sharka disease (*Plum pox virus*) in an old stone fruit collection at Los Tilos Experimental Substation (INIA), Chile. *Agricultura Técnica (Santiago)*. 54. 187-191.
- Hluchý, M., Ackermann, P., Zacharda, M., Bagar, M., Jetmarová, E., & Vanek, G.** (1997). *Obrazový atlas chorob a škůdců ovocných dřevin a révy vinné*. Brno, Biocont Laboratory sro.
- Hillung, J., Elena, S. F., Cuevas, J. M.** (2013). Intra-specific variability and biological relevance of P3N-PIPO protein length in *Potyvirus*s. *BMC Evolutionary Biology*. 13. 249.

- Hummer, K. E., & Janick, J.** (2009). *Rosaceae*: taxonomy, economic importance, genomics. In Genetics and genomics of *Rosaceae* (pp. 1-17). Springer New York.
- Chirkov, S. Peter Ivanov, P., and Sheveleva, A.** (2013). Detection and partial molecular characterization of atypical *Plum pox virus* isolates from naturally infected sour cherry. Archives of Virology. 158. 1383-1387.
- Christoff, A.** (1934). Mosaikkrankheit oder Viruschlorose, bei Apfeln. Eine neue Viruskrankheit. Phytopathology. 7. 521-536.
- Chung, B. Y., Atkins, J. F., Firth A. E., Miller, W. A.** (2008). An overlapping essential gene in the *Potyviridae*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105. 5897-5902.
- Ilbagi, H., Citir, A.** (2014). Detection and partial molecular characterization of *Plum pox virus* on almond trees in Turkey. Phytoparasitica. 42. 485-491.
- International Standards for Phytosanitary Measures - IPPC, 2012: Plum Pox Virus.** Rome, Italy: FAO, ISPM 27, www.ippc.int/en/publications/637/
- James, D. & Varga, A.** (2005). Nucleotide sequence analysis of *Plum pox virus* isolate W3174: evidence of a new strain. Virus Reserach. 110. 143-150.
- James, D., Thompson, D.** (2006). Hosts and symptoms of *Plum pox virus*: ornamental and wild Prunus species. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin. 36. 222-224.
- James, D., Varga, A., Thompson, D., Hayes, S.** (2003). Detection of a new and unusual isolate of *Plum pox virus* in plum (*P. domestica*). Plant Disease. 87. 1119-1124.
- Jarausch, W., Baßler, A., Molla, N. & Krczal, G.** (2004). First detection and molecular characterisation of PPV-M strains in plum orchards in South-Western Germany. Acta Horticulturae. 657. 159-164.
- Jarošová, J., & Kundu, J. K.** (2010b). Detection of *Prune dwarf virus* by one-step RT-PCR and its quantitation by real-time PCR. Journal of Virological Methods. 164. 139-144.
- Josifovic, M.** (1937). Mosaic of plum. Arch Minister Poljopriv. 4. 131-143.
- Kalashyan, Y. A., Bilkey, N. D., Verderevskaya, T. D., Rubina, E. V.** (1994). *Plum pox potyvirus* on sour cherry in Moldova. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin. 24. 645-649.
- Kalinina, A., & Brown, D. C.** (2007a). Micropropagation of ornamental *Prunus spp.* and GF305 peach, a *Prunus* viral indicator. Plant Cell Reports. 26. 927-935.

- Kalinina, A., Brown, D., & Ravelonandro, M.** (2007b). Susceptibility of ornamental *Prunus* to *Plum pox potyvirus* infection. *Acta Horticulturae*. 738. 601-605.
- Kamenova, I.** (2014). A Recombinant strain of *Plum pox virus* in peach in Bulgaria. *Journal of Plant Pathology*. 96. 411-414.
- Kamenova, I., & Milusheva, S.** (2005). Sharka disease in Bulgaria: past, present and future. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 19. 22-40.
- Kamenova, I., Dallot, S., Bozkova, V., & Milusheva, S.** (2011). First report of the *Plum pox virus* recombinant strain on peach in Bulgaria. *Plant Disease*. 95. 1320-1320.
- Kamenova, I., Lohuis, D., & Peters, D.** (1978). Comparison of aphid transmission of *Plum pox virus* isolates and purification of their helper virus components. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*. 4. 9-16.
- Karabacak, M., & Ilbađı, H.** (2011). Description and Detection of Almond Virus Diseases in The Trakya Region of Turkey. *The Journal Of Turkish Phytopathology*. 40. 1-3.
- Karayiannis, I. & Ledbetter, C.** (2009). Susceptibility of certain apricot and plumcot cultivars to *Plum pox virus* infection. *Acta Horticulturae*. 825. 153-156.
- Karayiannis, I.** (2006). Breeding for resistance: conventional breeding for *Plum pox virus* resistant apricots (*Prunus armeniaca* L.) in Greece. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*. 36. 319-322.
- Kegler, H., Fuchs, E., Grüntzig, M., & Schwarz, S.** (1998). Some results of 50 years of research on the resistance to *Plum pox virus*. *Acta Virologica*, 42. 200-215.
- Kerlan, C., Dunez, J.** (1979). Différenciation biologique et sérologique des souches du virus de la sharka. *Annales de Phytopathologie*. 11. 241-250.
- Kester, D. E., & Hansen, C. J.** (1966). Rootstock potentialities of F1 hybrids between peach (*Prunus persica* L.) and almond (*Prunus amygdalus* Batsch.). *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 89. 100-109.
- Kester, D. E., Gradziel, T. M., & Grasselly, C.** (1991). Almonds (*Prunus*). *Genetic Resources of Temperate Fruit and Nut Crops*. 290. 701-760.
- Kester, D. E., T. M. Gradziel.** (1996). Almonds. J.N. Moore, and J. Janick (eds.) *Fruit Breeding*. John Wiley & Sons, New York, USA. 1-97

- Kölber M., Németh M., Chernets A., Kalashyan Y., Dulic-Markovic I., Glasa M., Isac M., Kriska B., Malinowski T., Zawadska B., Minoiu N., Myrta A., Navrátil M., Prichodko Y., Slovakova L., Topchiiska M.** (2001). Current situation of plum pox disease on stone fruits in middle and eastern Europa. *Acta Horticulturae*. 550. 73-78.
- Kölber, M.** (2006). *Plum pox virus* (PPV) in Hungary. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*. 36. 210-210.
- Kölber, M., Németh, M., Krizbai, L., Ember, I.** (2003). Characterization of Hungaria *Plum Pox Virus* isolates in Myrta, A., Di Terlizzi, B., Savino, V. (eds.). *Virus and virus-like diseases of stone fruits, with particular reference to the Mediterranean region Bari: CIHEAM. Options Méditerranéennes: Série B. Etudes et Recherches*. 45. 73-78.
- Kölber, M., Németh, M., Tokes, G., Krizbai, L., Szonyegi, S., Ember, I., Bereczky, Zs., Pocsai E., Hangyál, R., Vollent, Á., & Bencze, E.** (1997). A five-year study to determine the eventual occurrence of *Plum pox virus* in cherry cultivars in Hungary. *Acta Horticulture*. 472. 495-502.
- Kollerová, E., Nováková, S., Subr, Z., & Glasa, M.** (2006). 1171501. *Plum pox virus* Mixed Infection Detected on Apricot in Pakistan. *Plant Disease*. 90. 1108-1108.
- Küden, A. B., Küden, A., & Kaska, N.** (1993). Adaptations of some selected almonds to Mediterranean region of Turkey. I International Congress on Almond. 373. 83-90.
- Kurçman, S.** (1973). Nachweis des sharka-virus an aprikosen und pflaumenbaumen aumenbaumen in Ankara. *Journal of Turkish Phytopathology*. 2. 124-129.
- Labonne, G. & Dalot, S.** (2006). Epidemiology of sharka disease in France. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*. 36. 267-270.
- Labonne, G., Yvon, M., Quiot, J. B., Avinent, L. & Llácer, G.** (1995). Aphids as potential vectors of *Plum pox virus*: comparison of methods of testing and epidemiological consequences. *Acta Horticulturae*. 386. 207–218.
- Laimer, M., Mendonca, D., Myrta, A., Boscia, D. & Katinger, H.** (2005). Molecular characterisation of Austrian *Plum pox virus* (PPV) isolates. *Phytopathologia Polonica*. 36. 25-32.
- Lansac, M., Detienne, G., Bernhard, R., & Dunez, J.** (1979). Analysis of nine isolates of almond mosaic. In XI International Symposium on Fruit Tree Virus Diseases. 94. 359-366.
- Léonard, S., Daigneault, N., Fortin, M. G., Laliberte, J. F., Plante, D., Wittmann, S.** (2000). Complex formation between *Potyvirus* VPg and translation eukaryotic initiation factor 4E correlates with virus infectivity. *Journal of Virology*. 74. 7730-7737.

- Levy, L., & Hadidi, A.** (1994). A simple and rapid method for processing tissue infected with plum pox potyvirus for use with specific 3'non-coding region RT-PCR assays. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*. 24. 595-604.
- Levy L., Damsteegt V. & Welliver, R.** (2000a). First report of *Plum pox virus* (sharka disease) in *Prunus persicae* in the United States. *Plant Disease*. 84. 202.
- Levy, L., Damsteegt, V., Scorza, R., & Kolber, M.** (2000b). *Plum pox potyvirus* disease of stone fruits. *American Phytopathological Society* <http://www.apsnet.org/online/feature/PlumPox>.
- Llácer, G.** (2006). Hosts and symptoms of *Plum pox virus*: Herbaceous hosts. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*. 36. 227-228.
- Llácer, G., Cambra, M. A.** (2006). Hosts and symptoms of *Plum pox virus*: fruiting *Prunus* species. *OEPP/EPPO Bulletin*, 36. 219-221.
- Llácer, G., Cambra, M. A., & Lavina, A.** (1985). Detection of *Plum pox virus* in Spain. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*. 15. 325-329.
- López-Moya, J. J., Fernández-Fernández, M. R., Cambra, M. A., & García, J. A.** (2000). Biotechnological aspects of *Plum pox virus*. *Journal of Biotechnology*. 76. 121-136.
- López, M. M., Llop, P., Olmos, A., Marco-Noales, E., Cambra, M. A., & Bertolini, E.** (2009). Are molecular tools solving the challenges posed by detection of plant pathogenic bacteria and viruses?. *Current Issues in Molecular Biology*. 11. 13.
- Louro, D., & Corvo, L.** (1986). Occurrence of sharka in Portugal. *Acta Horticulture*. 193. 183-186.
- Macovei, A., and Diaconu, M.** (2001). Viro-geographic data concerning the actual spreading status of the *Plum pox virus potyvirus* in Romania. *Abstracts of Papers and Posters. Middle European Meeting on Plum Pox, Pitesci-Maracineti, Romania. 27-29, 2001.*
- Maejima, K., Hoshi, H., Hashimoto, M., Himeno, M., Kawanishi, T., Komatsu, K., & Namba, S.** (2010). First report of *Plum pox virus* infecting Japanese apricot (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.) in Japan. *Journal of General Plant Pathology*. 76. 229-231.
- Maroquin, C., & Rassel, A.** (1976). Caractérisation du *Plum pox virus* sur un prunier en Belgique. *Parasitica*. 32. 93-108.
- Martinelli, F., Scalenghe, R., Davino, S., Panno, S., Scuderi, G., Ruisi, P., Villa, P., Stroppiana, D., Boschetti, M., Goulart, L. R., Dandekar, A. M., & Davis, C. E.** (2015).

Advanced methods of plant disease detection. A review. *Agronomy for Sustainable Development*. 35. 1-25.

Martínez-Gómez, P., Rubio, M., Dicenta, F., & Gradziel, T. M. (2004a). Resistance to *Plum pox virus* (Dideron isolate RB3. 30) in a group of California almonds and transfer of resistance to peach. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 129. 544-548.

Martínez-Gómez, P., Rubio, M., Dicenta, F., & Gradziel, T. M. (2004b). Utilization of almond as source of *Plum pox virus* resistance in peach breeding. *Acta Horticulturae*. 657. 289-293.

Mathur, C. H. S. Savithri (2012). Novel ATPase activity of the polyprotein intermediate, Viral Protein genome-linked-Nuclear Inclusion-a protease, of Pepper vein banding potyvirus. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 427. 113-118.

Maxim, A., Ravelonandro, M., Isac, M., & Zagrai, I. (2002). *Plum pox virus* in cherry-trees. XVIII International Plant Virus Epidemiology Symposium, Aschersleben, Germany. Abstracts, 101-102.

Meijneke, C. A. R. (1967). Sharka in plums and peaches. *Fruittelt*. 57. 251-252.

Mekuria, G., Ramesh, S. A., Alberts, E., Bertozzi, T., Wirthensohn, M., Collins, G., & Sedgley, M. (2003). Comparison of ELISA and RT-PCR for the detection of *Prunus necrotic ring spot virus* and *Prune dwarf virus* in almond (*Prunus dulcis*). *Journal of Virological Methods*. 114. 65-69.

Mendonca, D., Lopes, M. S., da Câmara Machado, A., & Laimer da Câmara Machado, M. (1997). Diagnosis of viral diseases in stone fruits cultivated in the Azorean islands Terceira and Graciosa. *Acta Horticulturae*. 472. 537-541.

Milusheva, S., Bozhkova, V., & Kamenova, I. (2015). Results from survey on resistance of plum cultivar 'Jojo' to *Plum pox virus*. *Acta Horticulturae*. 1063. 93-97.

Milusheva, S., Gercheva, P., Bozhkova, V., & Kamenova, I. (2008). Experiments on transmission of *Plum pox virus* through *Prunus* seeds. *Journal of Plant Pathology*. 90. 23-S1.

Milusheva, S., Rankova, Z. (2002). *Plum pox potyvirus* detection in weed species under field conditions. *Acta Horticulturae*. 577. 283-287.

Mink, G. I. (1993). Pollen and seed-transmitted viruses and viroids. *Annual Review of Phytopathology*. 31. 375-402.

- Minoiu, N.** (1997). Plum diseases and pests.: Cociu I, Botu I, Minoiu NI, Modoran I (eds) The Plum. Editure Conphys, Pitesti. 343–374.
- Morvan, G.** (1988). The epidemiology of *Plum pox virus* in the apricot orchards of southern France: Description of computer tools and main observations. *Acta Horticulturae*. 235. 263-270.
- Mumford, R. A.** (2006). *Plum pox virus* (PPV) in the United Kingdom. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*. 36. 217.
- Myrta, A., Boscia, D., Potere, O., Kölber, M., Németh, M., Di Terlizzi, B., Cambra, M. A. & Savino, V.** (2001). Existence of two serological subclusters of *Plum pox virus*, strain M. *European Journal of Plant Pathology*. 107. 845-848.
- Myrta, A., Di Terlizzi, B., & Savino, V.** (1998). Study on the transmission of *Plum pox potyvirus* through seeds. *Phytopathologia Mediterranea*. 37. 41-44.
- Navrátil, M., Šafářová, D., Crescenzi, A., Fanigliulo, A., Comes, S., Petrzik, K., Karešová, R.** (2004). The occurrence of PPV in cherry trees in the Czech Republic. *Acta Horticulturae*. 657. 237-244.
- Navrátil, M., Cikanek, D., Hilgert, I., Křištofová, H., & Karešová, R.** (1992). Monoclonal antibodies against *Plum pox virus*. *Acta Horticulturae*. 309. 169-174.
- Navrátil, M., Šafářová, D., Karešová, R., & Petrzik, K.** (2005). First incidence of *Plum pox virus* on apricot trees in China. *Plant Disease*. 89. 338-338.
- Németh, M.** (1963). Field and greenhouse experiments with *Plum pox virus*. *Phytopathologia Mediterranea*. 162-166.
- Németh, M.** (1986). Virus, mycoplasma and rickettsia diseases of fruit trees. Martinus Nijhoff Publishers, Akademiai Kiado, Budapest (1986).
- Németh, M.** (1994). History and importance of plum pox in stone-fruit production. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*. 24. 525-536.
- Németh, M., & Kölber, M.** (1983). Additional evidence on seed transmission of *Plum pox virus* in apricot, peach and plum proved by ELISA. *Acta Horticulturae*. 130. 293-300.
- Nemchinov, L., Hadidi, A. Maiss, E., Cambra, M. A., Candresse, T. & Damsteegt, V.** (1996). Sour cherry strain of *Plum pox potyvirus* (PPV). Molecular and serological evidence for a new subgroup of PPV strains. *Phytopathology*. 86. 1215-1221.

- Nyland, G., Gilmer, R. M., & Moore, J. D.** (1976). Prunus' ringspot group. Virus diseases and noninfectious disorders of stone fruits in North America. 104-132.
- Olmos, A., Cambra, M. A., Dasi, M. A., Candresse, T., Esteban, O., Gorris, M. T., & Asensio, M.** (1997). Simultaneous detection and typing of *Plum pox potyvirus* (PPV) isolates by heminested-PCR and PCR-ELISA. Journal of Virological Methods, 68. 127-137.
- Palmisano, F., Bazzoni, A., Tavano, D., Didonna, A., Castellano, M., & Savino, V.** (2010). Experimental screening of an apricot cross for resistance to *Plum pox virus* (M and D strains). Acta Horticulturae. 862. 501-506.
- Palmisano, F., Boscia, D., Minafra, A., Myrta, A., Candresse, T.** (2012). An atypical Albanian isolate of *Plum pox virus* could be the progenitor of the Marcus strain. 22nd International Conference on Virus and Other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops, Rome, Book of Abstracts. 33.
- Palmisano, F., Minafra, A., Myrta, A., & Boscia, D.** (2015). First report of *Plum pox virus* strain PPV-T in Albania. Journal of Plant Pathology. 97. 403.
- Papingyi, A.** (1965). Lija në formë unaze e kumbullës. Plum ring pox on plum. Bull Shke Bujq, Tirane. 2. 31-32.
- Pascal, T., Pfeiffer, F., & Kervella, J.** (2001). Preliminary observations on the resistance to Sharka in peach and related species. Acta Horticulturae. 592. 699-704.
- Pasquini, G., & Barba, M.** (2006). The question of seed transmissibility of *Plum pox virus*. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin. 36. 287-292.
- Pasquini, G., Simeone, A. M., Conte, L., & Barba, M.** (2000). RT-PCR evidence of the non-transmission through seed of *Plum pox virus* strains D and M. Journal of Plant Pathology. 82. 221-226.
- Pasquini, G., Simeone, A. M., Conte, L., & Barba, M.** (1998). Detection of *Plum pox virus* in apricot seeds. Acta Virologica. 42. 260-263.
- Pest Risk Analysis for Plum Pox Virus** (2011). Plant Protection Service, Ministry of Economic Affairs, Agriculture and Innovation, the Netherlands.
- Petrov, N., Stoev, A.** (2011). Almond (*Prunus dulcis*) as a host of *Plum pox virus*. Acta Horticulturae. 899. 73-78.

- Pieniasek, S. A.** (1962). Survey on fruit tree virus diseases present in Poland. Proceedings 5th European Symposium Fruit Tree Virus Diseases. Bologna. 1962.
- Polák, J.** (1997). The role of *Prunus spinosa* L. in epidemiology of *Plum pox virus* in the Czech Republic. Dehne, H. a kol. (eds). Diagnosis and identification of plant pathogens. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- Polák, J.** (2000). European spindle tree and common privet a new natural hosts of *Plum pox virus*. Acta Horticulturae. 550. 125-128.
- Polák, J.** (2002). Distribution of *Plum pox virus* in the Czech Republic. Plant Protection Science. 38. 98-102.
- Polák, J.** (2006). Hosts and symptoms of *Plum pox virus*: woody species other than fruit and ornamental species of *Prunus*. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin. 36. 225–226.
- Polák, J.** (2007). Viruses of blackthorn and road-bordering trees of plum, myrobalan, sweet and sour cherries in the Czech Republic. Plant Protection Science. 43. 1-4.
- Polák, J., Komínek, P.** (2009). Distribution of *Plum pox virus* strains in natural sources in the Czech Republic. Plant Protection Science. 45. 144-147.
- Posnette, A. F. & Ellenberger, C. E.,** (1963). A disease resembling plum pox in England. Plant Pathology. 12. 115–117.
- Pribék, D., Palkovics, L., Gáborjányi, R.** (2001). Molecular characterization of *Plum pox virus* almond isolate. Acta Horticulturae. 550. 91-96.
- Quiot, J. B., Boeglin, M., Admolle, C., Candresse, T., Labonne, G. & Renaud, L. Y.** (1995). Behaviour of two isolates of *Plum pox virus* inoculated on peach and apricot trees: First results. Acta Horticulturae. 386. 290-297.
- Ravelonandro, M., Scorza, R., Bachelier, J. C., Labonne, G., Levy, L., Damsteegt, V., Callahan, A. M., & Dunez, J.** (1997). Resistance of transgenic *Prunus domestica* to *Plum pox virus* infection. Plant Disease. 81. 1231-1235.
- Ravelonandro, M., Scorza, R., Callahan, A., Levy, L., Jacquet, C., Monsion, M., & Damsteegt, V.** (2000). The use of transgenic fruit trees as a resistance strategy for virus epidemics: the plum pox (sharka) model. Virus Research. 71. 63-69.

- Rezende, J. A. M., Camelo, V. M., & Kitajima, E. W.** (2016). First report on detection of *Plum pox virus* in imported peach fruits in Brazil. *Plant Disease*. 100. 869-869.
- Riechmann, J. L., Lain, S., & García, J. A.** (1992). Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. *Journal of General Virology*. 73. 1-16.
- Roy, A.S. & Smith, I. M.** (1994). Plum pox situation in Europe. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*. 24. 515-523.
- Rubio, M., Martínez-Gómez, P., Dicenta, F.** (2003). Resistance of almond cultivars to *Plum pox virus* (sharka). *Plant Breeding*. 122. 462-464.
- Rubio, M., Martínez-Gómez, P., García, J. A., Dicenta, F.** (2013). Interspecific transfer of resistance to *Plum pox virus* in *Prunus* by grafting. *Acta Horticulturae*. 1063. 117-122.
- Rubio, M., Martínez-Gómez, P., García-Brunton, J., Pascal, T., García-Ibarra, A., & Dicenta, F.** (2012). Sensitivity of peach cultivars against a Dideron isolate of *Plum pox virus*. *Scientia Horticulturae*, 144. 81-86.
- Rubio, M., Martínez-Gómez, P., Pinochet, J., & Dicenta, F.** (2005). Evaluation of resistance to sharka (*Plum pox virus*) of several *Prunus* rootstocks. *Plant Breeding*. 124. 67-70.
- Rubio-Cabetas J. M., Alonso J. M., Kodad O., Gomez Aparisi J.** (2010). An overview of almond cultivars and rootstocks: challenges and perspectives. *Options Méditerranéennes. Série A, Séminaires Méditerranéens*. 94. 205-214.
- Sahitiyanci, S.** (1969). Virus de la sharka chez le prunier. *Bulletin Phytosanitaire*. 17, 69.
- Salamon, P., Palkovics, L.** (2002). Characterization of *Plum pox virus* PPVBT-H isolated from naturally infected blackthorn (*Prunus spinosa*) in Hungary. *European Journal of Plant Pathology*. 108. 903-907.
- Salava, J., Polak, J., & Oukropec, I.** (2013). Evaluation of the *Prunus* interspecific progenies for resistance to *Plum pox virus*. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*. 49. 65-69.
- Santala, J., & Soukainen, M.** (2015). First report of *Plum pox virus* on plum in Finland. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*. 45. 193-194.
- Scorza, R., & Ravelonandro, M.** (2006). Control of *Plum pox virus* through the use of genetically modified plants. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*. 36. 337-340.

- Sebestyén, D., Kölber, M., Németh, M., Hangyál, R.** (2004). Ornamental Prunus species/cultivars as new natural hosts of *Plum pox virus*. Book of Abstracts, European Meeting '04 on Plum Pox. 44.
- Serçe, C. U., Candresse, T., Svanella-Dumas, L., Krizbai, L., Gazel, M. & Kadriye Caglayan, K.** (2009). Further characterization of a new recombinant group of *Plum pox virus* isolates, PPV-T, found in orchards in the Ankara province of Turkey. *Virus Research*. 142. 121–126.
- Sertkaya, G., Serçe, Ç. U., Çağlayan, K.** (2003). Detection and characterization of *Plum pox potyvirus* (PPV) by DAS-ELISA and RT-PCR/RFLP analysis in Turkey. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*. 27. 213-220.
- Schade, C.** (1969). Properties and serology of the sarka virus of the plum. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Zweite naturwissenschaftliche Abstrakt: Allgemeine, landwirtschaftliche und technische Mikrobiologie*. 123. 299-304.
- Schade, C.** (1971). Detection of necrotic and chlorotic ringspot viruses in cherry by the fast latex method. *Archiv für Phytopathologie und Pflanzenschutz*. 7. 207-216.
- Shahidi, F., Zhong, Y., Wijeratne, S. S., & Ho, C. T.** (2009). 8 Almond and Almond Products: Nutraceutical Components. *Tree Nuts: Composition, Phytochemicals, and Health Effects*. 127.
- Schimanski, H. H., Grüntzig, M., & Fuchs, E.** (1988). Non-transmission of the *Plum pox virus* in plum and apricot seed source clones. *Zentralblatt für Mikrobiologie*. 143. 121-123.
- Scholthof, K. B. G., Adkins, S., Czosnek, H., Palukaitis, P., Jacquot, E., Hohn, T., Hohn, B., Saunders, K., Candresse, T., Ahlquist, P., Hemenway, C.** (2011). Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*. 12. 938-954.
- Schuch, K.** (1957). Virus diseases and similar phenomena in fruit crops. *Mitt. Biologischen Bundesanstalt für Land-und Forstwirtschaft*. 88. 126-128.
- Sihelská, N., Glasa, M., & Šubr, Z. W.** (2017). Host preference of the major strains of *Plum pox virus*-opinions based on regional and world-wide sequence data. *Journal of Integrative Agriculture*. 16. 510-515.
- Smolák, J. & Novák, J. B.** (1956). A contribution to the virology of fruit trees. *Acta Universitatis Agriculturae*. 1. 99-118.
- Sochor, J., Babula, P., Adam, V., Krska, B., Kizek, R.** (2012). Sharka: The Past, The Present and The Future. *Viruses*. 4. 2853-2901.

- Socias i Company, R.** (1998). Fruit tree genetics at a turning point: the almond example. TAG Theoretical and Applied Genetics. 96. 588-601.
- Spiegel, S.** (2008). *Prunus necrotic ringspot virus*. Characterization, diagnosis & management of plant viruses. Volume 2: Horticultural Crops. 267-286.
- Spiegel, S., Kovalenko, E. M., Varga, A., & James, D.** (2004). Detection and partial molecular characterization of two *Plum pox virus* isolates from plum and wild apricot in southeast Kazakhstan. Plant Disease. 88. 973-979.
- Spiegel-Roy, P., & Kochba, J.** (1981). Inheritance of nut and kernel traits in almond (*Prunus amygdalus* Batsch). Euphytica. 30. 167-174.
- Srinivasan, C., Padilla, I. M., & Scorza, R.** (2004). 18.3 *Prunus* spp. Almond, Apricot, Cherry, Nectarine, Peach and Plum. General Editor: Gabrielle J. Persley, The Doyle Foundation, Glasgow, Scotland. 512.
- Sus, J. a kol.** (2003). Obrazový atlas peckovin 2. (Rozšířený o další druhy ovoce). Odrůdy teplomilných peckovin, skořápkovin, maliníku, ostružiníku a netradičního ovoce. Květ. Praha.
- Savulescu, A., & Macovei, A.** (1965). Studies on Sharka (plum pox) and related pattern line virus. Zastida Bilja. 16. 357-366.
- Svanella-Dumas, L., Candresse, T., Maurice, I., Blin, V., Quaren, R., & Birgaentzle, C.** (2015). First report of the presence of *Plum pox virus* Rec strain in France. Plant Disease. 99. 421-421.
- Szczygiel, A.** (1962). Pojawienie się w Polsce groźnej choroby wirusowej szarki *Prunus virus-7*. Ochr. Rośl, 1-2.
- Szirmai, J.** (1948). Virus disease of apricot. Magyar Bor és Gyümölcs, 3. 7-8.
- Szirmai, J.** (1961). Report on fruit tree virus diseases in Hungary. Tidsskrift for Planteavl. 65. 220-229.
- Šafářová, D., Neoralová, V., James, D. and Navrátil, M.** (2017). Almond (*Prunus dulcis* L.) - not a natural host of *Plum pox virus* in the Czech Republic. Acta Horticulturae. 1163. 123-128.
- Šubr, Z., & Glasa, M.** (2008). *Plum pox virus* variability detected by the advanced analytical methods. Acta Virologica. 52. 75-90.
- Šutić, D. D., Ford, R. E., & Tosić, M. T.** (1999). Handbook of plant virus diseases. CRC Press.

- Šutić, D. D., Jordovic, M., Rankovic, M., & Festić, H.** (1971). Comparative studies of some sharka (plum pox) virus isolates. Proceedings, European Symposium on Fruit Tree Virus Diseases
- Takhtajan, A.** (1997). Diversity and classification of flowering plants. Columbia University Press New York. USA.
- Thompson, D., McCann, M., MacLeod, M., Lye, D., Green, M., & James, D.** (2001). First report of *Plum pox potyvirus* in Ontario, Canada. *Plant Disease*. 85. 97-97.
- Thompson, D., Varga, A., De Costa, H., Birch, C., Glasa, M., & James, D.** (2009). First report of *Plum pox virus* recombinant strain on *Prunus* spp. in Canada. *Plant Disease*. 93. 674-674.
- Topchiiska, M.** (1996). *Plum pox virus* (Sharka) in some *Prunus* spp. in Bulgaria. p. 27 Abstracts of Papers and Posters. Middle European Meeting '96 on Plum Pox, Budapest, 2-6 October.
- Topchiiska, M.** (1997). Sweet and sour cherries-natural hosts of plum pox (sharka) virus. Proceedings of the Middle European Meeting on Plum Pox, Budapest, Hungary. 91-93.
- Travis, J. W.** (2001). *Plum pox virus* and other diseases of stone fruits: A field guide. College of Agricultural Sciences, Agricultural Research and Cooperation Extension.
- Urcuqui-Inchima, S., Haenni, A. L., & Bernardi, F.** (2001). Potyvirus proteins: A wealth of functions. *Virus Research*. 74. 157-175.
- Urruzola, I., Robles, E., Serrano, L., & Labidi, J.** (2014). Nanopaper from almond (*Prunus dulcis*) shell. *Cellulose*. 21. 1619-1629.
- Uyemoto, J., Scott, S.** (1992). Important diseases of *Prunus* caused by viruses and other graft-transmissible pathogens in California and South Carolina. *Plant Disease*. 76. 5-10.
- Valli, A., Lopez-Moya, J. J., & Garcia, J. A.** (2007). Recombination and gene duplication in the evolutionary diversification of P1 proteins in the family *Potyviridae*. *Journal of General Virology*. 88. 1016-1028.
- Varveri, C.** (2006). Epidemiology of *Plum pox virus* strain M in Greece. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*. 36. 276-278.
- Verderevskaya, T.** (1965). Virus diseases of fruit trees in Moldavia. *Zascita Bilya*. 16. 509-512.
- Verma, R. K., Mishra, R., Sharma, P., Choudhary, D. K., & Gaur, R. K.** (2013). Systemic infection of *Potyvirus*: a compatible interaction between host and viral proteins. Approaches to plant stress and their management. 353.

- Vidal, E., Moreno, A., Bertolini, E., Pérez-Panadés, J., Carbonell, E. A., & Cambra, M. A.** (2010). Susceptibility of *Prunus* rootstocks to natural infection of *Plum pox virus* and effect of mineral oil treatments. *Annals of Applied Biology*. 157. 447-457.
- Vidal, E., Zagrai, L., Milusheva, S., Bozhkova, V., Tasheva-Terzieva, E., Kamenova, I., Zagrai, I., & Cambra, M. A.** (2013). Horticultural mineral oil treatments in nurseries during aphid flights reduce *Plum pox virus* incidence under different ecological conditions. *Annals of Applied Biology*. 162. 299-308.
- Viršček, M., Mavrič, I., Urbančič-Zemljič, M. and Škerlavaj, V.** (2004). Detection of *Plum pox potyvirus* in weeds. *Acta Horticulturae*. 657. 251-254.
- Vlasic, A.** (1977). L'*Amygdalus webbi* Spach ed I suoi ibridi col pesco com portaninnestro del mandorlo. 3d Colloque GREMPA. Bari, Italy. 80-81.
- Voller, A., Bartlett, A., Bidwell, D. E., Clark, M. F., & Adams, A. N.** (1976). The detection of viruses by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Journal of General Virology*. 33. 165-167.
- Vukovits, G.** (1961). Presence of virus diseases in Austrian orchards. *Tidskrift for Planteavl*, 65. 204-210.
- Wallis, C. M., Fleischer, S. J., Luster, D., & Gildow, F. E.** (2005). Aphid (Hemiptera: *Aphididae*) species composition and potential aphid vectors of *Plum pox virus* in Pennsylvania peach orchards. *Journal of Economic Entomology*. 98. 1441-1450.
- Wang, A., Sanfacon, H., Stobbs, L. W., James, D., Thompson, D., Svircev, A. M., Brown, D. C. W.** (2006). *Plum pox virus* in Canada: Progress in research and future prospects for disease control. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 28. 182-196.
- Wetzel, T., Candresse, T., Macquaire, G., Ravelonandro M., Dunez, J.** (1992). A highly sensitive immunocapture polymerase chain reaction method for *Plum pox potyvirus* detection. *Journal of Virological Methods*. 39. 27-37.
- Wetzel, T., Candresse, T., Ravelonandro, M., & Dunez, J.** (1991b). A polymerase chain reaction assay adapted to *Plum pox potyvirus* detection. *Journal of Virological Methods*. 33. 355-365.
- Wetzel, T., Candresse, T., Ravelonandro, M., Delbos, R., Mazyad, H., Aboul-Ata, A., Dunez, J.** (1991a). Nucleotide sequence of the 3' terminal region of the RNA of the El Amar strain of *Plum pox potyvirus*. *Journal of General Virology*. 72. 1741-1746.

- Yazbek, M., & Oh, S. H.** (2013). Peaches and almonds: Phylogeny of *Prunus subg. Amygdalus* (*Rosaceae*) based on DNA sequences and morphology. *Plant Systematics and Evolution*. 299. 1403-1418.
- Yoshikawa, N.** (2001). Apple chlorotic leaf spot virus. *CMI/AAB Description of Plant Viruses*. 386.
- Yusuke, H., Suzuki, H., Atsumi, G., Choi, S. H., Nakahara, K. S., Uyeda, I.** (2013). P3N-PIPO of Clover yellow vein virus exacerbates symptoms in pea infected with White clove mosaic virus and is implicated in viral synergism. *Virology*. 449. 200-206.
- Zacha, V., Vanek, G., & Nováková, J.** (1989). Atlas chorôb a škodcov ovocných drevín a viniča. *Príroda, sro.*
- Zotto, A. D., Ortego, J. M., Raigon, J. M., Caloggero, S., Rossini, M., & Ducasse, D. A.** (2006). First report in Argentina of *Plum pox virus* causing Sharka disease in *Prunus*. *Plant Disease*. 90. 523-523.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

6K₁	6 kDa protein 1
6K₂	6 kDa protein 2
ACLSV	<i>Apple chlorotic leafspot virus</i> , virus chlorotické skvrnitosti jabloně
ApMV	<i>Apple mosaic virus</i> , virus mozaiky jabloně
bp	base pairs, páry bází
CI	protein cytoplasmatických / cylindrických inkluzí
CP	coat / capsid protein, plášťový / kapsidový protein
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DAS-ELISA	double antibody sandwich ELISA
ELISA	enzym-linked immunosorbent assay
f-primer	forward primer, přímý primer
HC-Pro	helper component-proteinase
ICTVdB	The International Committee on Taxonomy of Viruses database
kDa	jednotka 'kilodalton'
MPs	movement proteins, movement proteiny
NIa	protein nuclear inclusion a, protein jaderných inkluzí a
NIb	protein nuclear inclusion b, protein jaderných inkluzí b
ORF	open reading frame, otevřený čtecí rámeček
P1	P1 proteináza
P3	P3 protein
PCR	polymerase chain reaction, polymerázová řetězová reakce
PIPO	Pretty Interesting Potyviridae ORF
PPV	<i>Plum pox virus</i> , virus šarky švestky
PDV	<i>Prune dwarf virus</i> , virus zakrslosti slivoně
PNRSV	<i>Prune necrotic ringspot virus</i> , virus nekrotické kroužkovitosti třešně
RNA	ribonukleová kyselina
rpm	otáčky za minutu
r-primer	reverse primer, zpětný primer
RT	reverse transkriptase, reverzní transkripce
VPg	viral genome-linked protein, protein spojený s virovým genomem
ssRNA(+)	pozitivně orientovaná jednovláknová RNA
UTR	untranslated region, nepřeládaná oblast genomu
SEL	size exclusion limit, limitní velikost molekul procházejících skrz cytoplasmatický prstenec plasmodesmat

Almond (*Prunus dulcis* L.) - non-host of Plum pox virus in the Czech Republic



Dana ŠAFÁŘOVÁ¹, Veronika NEORALOVÁ¹, Delano JAMES², Milan NAVRÁTIL¹

¹ Faculty of Science, Palacký University, Olomouc, Czech Republic

² Sidney Laboratory, Canadian Food Inspection Agency, North Saanich, British Columbia, Canada
dana.safarova@upol.cz

Introduction

Plum pox virus (PPV) is ranked among the top ten plant viruses in molecular plant pathology and it is the most important virus infecting stone fruit trees (*Prunus* spp.). Almond (*Prunus dulcis* L.) is accepted generally as a host plant, but the current situation is not clear. It is believed that PPV infected almond trees show only a few symptoms, the infections reported from various countries are sporadic.

It is unclear if almond could be infected naturally or only due to use of PPV-infected rootstock as the both possibilities have been reported. The susceptibility of almonds to PPV could be the result of specific interactions between PPV strain, almond cultivar, rootstock/scion combinations and climatic conditions.



Almond plantations: (a) orchard, Starý vrch; (b) Almond's street, Horní Věstonice

Locality	Inspected trees	RT-PCR virus detection			
		PPV	PDV	PNRSV	ACLSV
Orchards					
Hustopeče – Starý vrch	665	0/62	10/62	3/62	0/62
Hustopeče – Kamenný vrch	150	0/10	0/10	0/10	0/10
Prague – Petřín	200	0/23	9/23	9/23	0/23
Road trees					
Kaple	60	0/28	6/28	7/28	0/28
Horní Věstonice	105	0/20	1/20	5/20	2/20
Germplasm					
Lednice	10	0/5	0/5	1/5	0/5
Total number of trees	1190	0/148	26/148	25/148	2/148



Physiological flower discoloration

Aim of work

Survey of almond plantations in the Czech Republic for PPV infections.
Determination of the importance of almonds in natural PPV spread.



Symptoms associated with PNRSV infection



PDV+PNRSV associated symptoms



Symptoms associated with PDV infection



ACLSV associated symptoms

Results

The results of our analyses showed that despite the symptoms observed, PPV was not detected in any of the analysed almond trees. PPV-D strain presence was detected only in surrounding plums and myrobalanes.

Symptom occurrence was not a reliable indicator of PPV infections. Although some almond trees showed intensive symptoms (vein clearing, yellow mosaics and chlorotic rings), and they were evaluated as PPV suspicious by antigen-antibody reaction (AgriStrip), the presence of PPV was not confirmed by the RT-PCR tests but Apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV), the known causal agent of 'pseudopox' disease, was detected. The flowers discolorations were noticed too, but their presence could be associated with the ilarviruses, *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV) and *Prune dwarf virus* (PDV). These viruses were also detected in almond trees showing yellow mosaics on leaves, and in non-symptomatic trees.

Material and Methods

***P. dulcis* plantations:** six localities - orchards in Hustopeče (Kamenný vrch, Starý vrch) and Prague (Petřín); germplasm collection in Lednice; and trees around roads in Kaple and Horní Věstonice - were visually inspected for the symptoms of virus infection in 2015-2016.

Sampling was done randomly and from symptomatic trees; flowers or leaves were collected. Symptomatic plums, myrobalanes or apricots from the same locality were selected as positive controls.

Total RNA was extracted using a silica capture method (leaves) or by NucleoSpin RNA isolation kit, Macherey-Nagel (flowers).

PPV screening was done by RT-PCR using P1 and P2 primers according to Wetzel *et al.* (1991) and IC-RT PCR according to Glasa *et al.* (2002); strains were identified as described by Šubr *et al.* (2004). Symptomatic plants were fast screened using PPV AgriStrip (Bioreba) prior to RT-PCR. Detection of other viruses commonly infecting almonds was carried using MyTaq One-step RT-PCR kit as follows: **PDV** as described by Jarošová *et al.* (2010) and Mekuria *et al.* (2003), **PNRSV** (Mekuria *et al.*, 2003); and for **ACLSV** using PDO nested RT-PCR (Foissac *et al.*, 2005)

References

- Foissac *et al.* (2005) *Phytopathology* 95(6):817-25.
 Glasa *et al.* (2002) *Eur J Plant Pathol* 108:843-853.
 Jarošová *et al.* (2010) *J Virol Methods* 164(1-2):139-144.
 Mekuria *et al.* (2003) *J Virol Methods* 114(1):65-69.
 Šubr *et al.* (2004) *Acta Virol* 48:173-176.
 Wetzel *et al.* (1991) *J Virol Methods* 33:355-366.

Acknowledgement

This research is supported by the MEYS CZ project LD15048.
The authors would like to acknowledge the contribution of the COST Action FA 1407 – DIVAS.

Conclusions

Our study indicates that even when grown under high PPV-D infection pressure, even over a period from ten to fifty years, almond trees were not naturally infected by PPV.

PPV-like symptoms are not a reliable indicator of PPV infections.

The almond trees do not appear to represent any potential risk as a reservoir for the existing isolates of PPV or play a role in virus spread under conditions in the Czech Republic.

